

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DE PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS



Danielle Pereira Batista

**Prospecção de inibidores de Nek1
empregando compostos
pirimidínicos: Avaliação *in silico*,
síntese e ensaios *in vitro***

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre
2021

Danielle Pereira Batista

**Prospecção de inibidores de Nek1
empregando compostos
pirimidínicos: Avaliação *in silico*,
síntese e ensaios *in vitro***

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre
como requisito para a obtenção do grau
de Mestre.

Orientadora: Dra. Dinara Jaqueline Moura
Coorientadora: Dra. Marla Narciso Godoi

Porto Alegre
2021

INSTITUIÇÃO E FONTE FINANCIADORA

Esse trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Farmocociências e Genética Toxicológica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), com suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) - **Chamada FAPERGS/MS/CNPq/SESRS n. 03/2017 – PPSUS (processo número 17/2551-0001 388- 3).**

AGRADECIMENTOS

A vida é feita de surpresas e esses anos de mestrado descrevem exatamente isso. Os desafios enfrentados tanto na vida acadêmica, como pessoal com certeza me tornaram uma pesquisadora e pessoa melhores.

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, sem Ele nada seria possível.

Ao meu esposo Jéferson, por todo apoio e paciência durante esses anos e ao meu filho Rafael, que chegou a tão pouco tempo neste mundo, mas que me trouxe uma força sem explicação. Amo vocês infinitamente.

À minha orientadora, professora Dinara, obrigada por acreditar em mim, pelas cobranças e pela paciência em ensinar o mundo das biológicas. É desafiador e fascinante! Acredito que em meio a tantos obstáculos obtive uma excelente formação acadêmica.

À minha coorientadora, professora Marla Godoi, que oportunizou a realização de um sonho, que era fazer mestrado. Obrigada por abrir as portas da UFCSPA, por me ensinar a ser uma química orgânica e por acreditar que somente com a Química a ciência vai além. Minha admiração pela pessoa que és.

Aos meus colegas de laboratório, Jeferson obrigada pela paciência e madrugadas de salvação com cálculos e gráficos. À Ana, uma das pessoas mais difíceis e inteligentes que já conheci, demorei, mas sei que ganhei seu coração, assim como ganhastes o meu. À Paulinha, agradeço por toda ajuda e conselhos na ciência, foram essenciais em dias de desespero. À Thaís, minha dupla perfeita, obrigada por tudo. Foram muitas horas de estudo, aulas práticas, apresentações, mini infartos, entre outros. Você foi a melhor dupla da vida. Tenho certeza que levarei a amizade de vocês além da ciência. Aos demais colegas do Gentox, minha eterna gratidão por cada ensinamento, aprendi muito com cada um de vocês.

Paulo, João e Luiza, os melhores ICs que eu poderia ter. Tenham certeza que aprendi mais com vocês do que possam imaginar. Pude ver a dedicação, a busca por conhecimento e compromisso de cada um durante todo esse período.

Através do empenho de vocês este trabalho foi adiante. Gratidão por ter tido alunos tão incríveis.

A vida acadêmica também me proporcionou ter em minha vida duas pessoas incríveis, Sabrina e Jussânia. Que presente! Não tenho palavras para agradecer por todo apoio e amizade durante este mestrado. Foram muitos risos, choros e cafés. Amo vocês.

Ao professor Paulo Schneider, por abrir as portas do seu laboratório na UFRGS e à colega Bianca Dalberto, do LAMOCA –UFRGS, pela parceria com as análises de RMN.

Ao colega Pablo pela colaboração na realização da parte *in silico* do trabalho.

A todos os integrantes do laboratório de Farmacociências, da UFCSPA.

A FAPERGS pelo financiamento da pesquisa.

RESUMO

Os gliomas são as doenças malignas primárias de ocorrência mais frequentes no sistema nervoso central (SNC). A Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou os gliomas em quatro estágios. O glioblastoma multiforme (GBM) classificado como grau IV é o mais prevalente e agressivo. Os glioblastomas apresentaram baixa sobrevida, que é de 9 a 12 meses, e os tratamentos incluem cirurgia, radioterapia e quimioterapia a base de temozolomida (TMZ). Vários estudos demonstraram que a proteína Nek1, membro da família NIMA de serina/treonina cinases, é superexpresso em glioblastomas. A função dessa proteína tem sido relacionada a danos ao DNA e ao controle da progressão do ciclo celular. Diidropirimidinonas (DHPMs), por exemplo, são moléculas que se destacaram nas últimas décadas por apresentarem bioatividade, com ação antiviral, antiinflamatória, antibacteriana, anti-hipertensiva e antitumoral. Diante da dificuldade no tratamento dos glioblastomas, o objetivo deste trabalho foi a busca de novo(s) inibidor(es) derivado(s) de DHPMs, tendo como alvo a proteína Nek1, utilizando estratégias *in silico* e *in vitro* de avaliação. A partir de ensaios *in silico* de eficácia e segurança, oito DHPMs foram selecionadas e, posteriormente sintetizadas, através da reação de Biginelli, e submetidas à avaliação farmacológica *in vitro*. Para avaliar a citotoxicidade celular, fibroblastos normais (MRC5) e linhagens de células tumorais (T98 e U87) foram analisadas por ensaio de vermelho neutro, sendo expostas a tratamentos com concentrações variando de 1 a 1000 μM , em tempos de 24 e 72 horas. Todos os compostos apresentaram efeito citotóxico nas três linhagens, porém o composto (1a) apresentou resultado significativo quanto à citotoxicidade, além da alta seletividade em relação à linhagem U87, após 24h de exposição. Além disso, avaliou-se a indução de morte do composto 1a e o resultado sugere que o composto foi capaz de levar células tumorais à morte pelo processo de apoptose e posterior necrose (morte), diminuindo significativamente as células viáveis. A união de técnicas *in silico* e *in vitro* permitiu selecionar e avaliar um possível composto com ação antitumoral tendo como alvo a proteína Nek1. Entretanto, mais estudos são necessários para confirmar esta ação antitumoral.

ABSTRACT

Gliomas are the most common primary malignancies of the central nervous system (CNS). The World Health Organization (WHO) classifies gliomas into four stages. Glioblastoma multiforme (GBM) classified as grade IV is the most prevalent and aggressive. Glioblastomas have a low survival, which is 9 to 12 months, and treatments include surgery, radiotherapy and chemotherapy based on temozolomide (TMZ). Several studies have shown that Nek1, a member of the NIMA family of serine/threonine kinases, is overexpressed in glioblastomas. The function of this protein has been linked to DNA damage and control of cell cycle progression. Dihydropyrimidinones (DHPMs), for example, are molecules that have stood out in recent decades for their bioactivity, with antiviral, anti-inflammatory, antibacterial, antihypertensive and antitumor actions. Given the difficulty in treating glioblastomas, the aim of this work was to search for new inhibitor(s) derived from DHPMs, targeting the Nek1 protein, using *in silico* and *in vitro* evaluation strategies. From *in silico* efficacy and safety assays, eight DHPMs were selected and subsequently synthesized, through the Biginelli reaction, and submitted to *in vitro* pharmacological evaluation. To assess cell cytotoxicity, normal fibroblasts (MRC5) and tumor cell lines (T98 and U87) were analyzed by neutral red assay, being exposed to treatments with concentrations ranging from 1 to 1000 μM , at times of 24 and 72 hours. All compounds showed a cytotoxic effect in cell lines tested, but the compound (1a) showed a significant result in terms of cytotoxicity, in addition to the high selectivity in relation to strain U87, after 24 hours of exposure. Furthermore, the induction of death of compound 1a was evaluated and the result suggests that the compound was able to lead tumor cells to death by the process of apoptosis and subsequent necrosis, significantly reducing viable cells. The combination of *in silico* and *in vitro* techniques allowed selecting and evaluating a possible compound with antitumor action targeting the Nek1 protein. However, more studies are needed to confirm this antitumor activity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP – *Trifosfato de adenosina*

ATR – *Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein*

ATRX – *ATP-dependent helicase ATRX*

CDKs – *Cyclin-dependent kinase*

CDKN2A – *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*

CHK1 – *Checkpoint kinase 1*

DHPMs – *Dihydropyrimidinones*

DNA – *Deoxyribonucleic acid*

DSBs – *Double strand breaks*

EGFR– *receptor do fator de crescimento epidérmico (epidermal growth factor receptor)*

GMB – *Glioblastoma multiforme*

HR – *Homologous recombination*

H2AX – *histone protein from the H2A family*

IDH – *Isocitrate dehydrogenase*

INCA – *Instituto Nacional de Câncer*

IR – *Ionizing radiation*

Mre11 – *Double-strand break repair protein MRE11*

MGMT– *O⁶-metilguanina DNA metiltransferase*

NIMA – *Never in mitosis A*

OMS – *Organização Mundial da Saúde*

PI(3)K – *fosfatidilinoitol-3-OH cinase*

PTEN – *phosphatase and tensin homolog*

p53 – *tumor protein 53*

Rad54 – *DNA repair protein RAD54*

RMCs – *Reações multicomponentes*

RKT – *Receptor tyrosine kinase*

RNA – *Ribonucleic acid*

SNC – *Sistema Nervoso Central*

TLK1 – *Serine/threonine-protein kinase tousel-like 1*

TMZ – *temozolomida*

UV – *Ultraviolet radiation*

VDAC1 – *Voltage-dependent anion channel*

WHO – *World Health Organization*

^1H NMR – *Nuclear Magnetic Resonance of Hydrogen*

^{13}C NMR - *Nuclear Magnetic Resonance of Carbon*

Hz - *Hertz*

DMSO - *Dimethylsulfoxide*

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Exemplos de algumas reações multicomponentes	22
Esquema 2 - Reação multicomponente de Biginelli - Versão clássica (Kappe 2000).	22
Esquema 3 - Versão de Atwal para a reação de Biginelli. Adaptado de Pair, Levacher et al, 2015).	23

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Funções das Nek1 dentro do ciclo celular. Adaptado de (Fry, O'Regan et al. 2012). 16
- Figura 2 - Representação da via de sinalização da Nek1 através de inibidores. Figura cedida por Pablo Arantes. 17
- Figura 3 - Estruturas de heterocíclicos provenientes de RMC. Adaptado de Shumaila e Al- Thulaia, 2019. 23

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
1.1	Câncer	13
1.2	Gliomas	14
1.3	Principais alterações genéticas dos glioblastomas	15
1.4	Nek1	17
1.5	Abordagens computacionais	19
1.6	Reações Multicomponentes	20
1.6.1	Reação de Biginelli	22
1.6.1.1	Dihidropirimidinonas e suas atividades farmacológicas	24
2.	OBJETIVOS	26
2.1	Objetivo Geral	26
2.2	Objetivos Específicos	26
3.	ARTIGO CIENTÍFICO	28
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
5.	PERSPECTIVAS	53
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
7.	CURRÍCULO LATTES	60
8.	ANEXO	63

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer é uma doença multifatorial e atualmente compreender sua complexidade é um dos maiores desafios encontrados pela ciência. Progressos significativos vêm sendo realizados ao longo do tempo, o que trouxe melhorias no tratamento do câncer, através de diagnósticos rápidos e precisos, além de terapias específicas, porém ainda existem muitas limitações. As células neoplásicas resultam, em sua maioria, de processos mutagênicos e isso depende de interseções entre genes e fatores ambientais (Salehi et al., 2018). O crescimento descontrolado das células tumorais está associado a diversos mecanismos como indução da angiogênese, evasão de supressores de crescimento, resistência à morte celular, além da instabilidade genômica, que acelera sua proliferação e a inflamação (Hanahan & Weinberg, 2011).

As opções de tratamento para o manejo clínico do câncer englobam a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia (Guntuku et al., 2016). Para erradicar tumores localizados, a cirurgia e a radioterapia são eficientes, porém a maioria das células tumorais espalham-se rapidamente por todo o corpo, sendo assim, necessário o uso de quimioterápicos, de forma sistêmica, que apresentam limitações devido à quantidade insuficiente de agentes terapêuticos eficazes contra células de câncer (Aftab et al., 2018). Outros vieses encontrados na quimioterapia são a alta citotoxicidade dos quimioterápicos, baixa biodisponibilidade, baixa solubilidade em meio fisiológico, distribuição inespecífica e depuração rápida do sangue (Qin et al., 2017). Neste contexto de tratamento, a resistência aos quimioterápicos continua sendo um grande desafio devido ao desenvolvimento de inúmeros mecanismos potenciais de resistência (Doroshov, 2013). Como causa de mecanismos de resistência aos quimioterápicos temos a falha terapêutica provenientes de alterações genéticas e a indução por tratamento medicamentoso (Rebucci & Michiels, 2013). Considerando os desafios desta doença, a investigação sobre os mecanismos de resistência aos quimioterápicos possibilita o

descobrimiento e desenvolvimento de novas terapias eficazes, visando a diminuição dos efeitos colaterais e aumento da sobrevida.

O câncer tornou-se um problema de saúde mundial, sendo um dos principais motivos de morte precoce. A mortalidade e a incidência estão relacionadas ao envelhecimento populacional e exposição a fatores de risco, como maus hábitos e situação socioeconômica. Atualmente no Brasil, estima-se que para cada ano do triênio 2020-2022, serão diagnosticados em torno de 625 mil novos casos de câncer, sendo estimados 5.870 casos novos de câncer do sistema nervoso central em homens e 5.220 em mulheres (INCA, 2020).

1.2 Gliomas

Os gliomas são os tumores primários mais comuns do sistema nervoso central (SNC), afetando principalmente adultos, representando 78% dos tumores malignos do SNC. Estes tumores apresentam um prognóstico ruim devido a sua alta capacidade de infiltração, resistência à radioterapia e à quimioterapia e a dificuldade de penetração de quimioterápicos devido à barreira hematoencefálica (Vianna et al., 2012). Alguns tipos de gliomas são irremovíveis cirurgicamente e após diagnóstico em estágio avançado aumentam o nível de resistência à quimioterapia, tornando-os um dos tumores de mais difícil tratamento (Guntuku et al., 2016).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) os gliomas são classificados através de aspectos histopatológicos, como astrocitoma, astrocitoma anaplásico, oligodendroglioma anaplásico, oligoastrocitoma anaplásico e ependimomas anaplásicos, ou tumores em graus de malignidade, que vão de I a IV. Os gliomas de grau I, em população pediátrica geralmente são curáveis por ressecção. Os de grau II a IV, são altamente infiltrantes, não permitindo a ressecção, sendo considerados incuráveis na sua maioria (Donovan & Lassman, 2019). Os tumores de grau IV são conhecidos como glioblastomas multiforme (GBM) e são os mais prevalentes e agressivos (Bush et al., 2017). Sua agressividade ocorre através de fatores associados à heterogeneidade, alta taxa

de proliferação e localização do tumor. Algumas alterações genéticas e moleculares também são critérios utilizados na classificação dos gliomas, como é o caso de mutações nos genes da isocitrato desidrogenase (IDH) e presença de co-deleção dos braços cromossômicos 1p e 19p, assim como o status de expressão da enzima O⁶- metilguanina DNA metiltransferase (MGMT), que são utilizados como marcadores de prognóstico (Donovan & Lassman, 2019; Louis et al., 2016).

Radioterapia, ressecção cirúrgica e quimioterapia são os tratamentos usados no combate ao GBM, porém muitas vezes ineficientes (Jhaveri et al., 2018). Com base nos inúmeros quimioterápicos avaliados terapeuticamente, a temozolomida (TMZ) é o que apresenta os melhores resultados em relação a diminuição do tumor e sobrevida dos pacientes (Brandes, 2005). O mecanismo de ação da TMZ, um agente alquilante, ocorre por transferência de grupos metil ao DNA. Essa metilação pode ocorrer em diferentes locais do DNA, como a posição 7 do nitrogênio (N⁷) da guanina, seguida da posição 3 do nitrogênio (N³) da adenina e na posição 6 do oxigênio (O⁶) da guanina. Embora haja melhora no quadro de saúde do paciente, a taxa média de sobrevida ainda é baixa, cerca de 9 a 12 meses, e apenas 4,7% dos pacientes conseguem sobreviver acima de 5 anos (Guntuku et al., 2016; Vianna et al., 2012).

Uma das principais dificuldades encontradas no tratamento do GBM ocorre devido a resistência aos quimioterápicos, pois possuem baixa biodisponibilidade, redução da efetividade do fármaco devido a mecanismos de reparo do DNA, baixa capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e alta toxicidade para as células saudáveis (Ramalho et al., 2018). A justificativa pela busca por novos tratamentos, a fim de encontrar a cura e reduzir os efeitos colaterais é dada pela complexidade deste câncer (Jhaveri et al., 2018).

1.3 Principais alterações genéticas dos glioblastomas

Os glioblastomas são o subtipo de gliomas mais comuns e mais agressivos encontrados em adultos, e identificar as principais alterações genéticas têm sido um grande desafio. Durante muito tempo a classificação dos GBMs era apenas

histológica e a partir de 2016, a *World Health Organization* (WHO) passou a combinar a classificação molecular à histológica, com o objetivo de melhorar o diagnóstico e tratamento deste tipo de tumor (Perry & Wesseling, 2016).

Os GBMs surgem por duas vias distintas de progressão tumoral e abrangem alterações genéticas distintas. A amplificação do gene do receptor de crescimento epidermal (EGFR), a perda do gene supressor tumoral PTEN e a perda de inibidor de cinase dependente de ciclina 2A (CDKN2A) são características dos tumores primários. Já os GBMs secundários apresentam perda da função do fator de transcrição p53, resultante de mutações do seu gene (TP53) e mutações em IDH1 (Alifieris & Trafalis, 2015; Miller & Perry, 2007).

De acordo com a complexidade dos glioblastomas, o Atlas do Genoma do Câncer, realizou um mapeamento dos perfis genéticos dos GBMs para identificar a diferença das mutações entre GBMs primários e secundários e através desta análise identificou-se as principais vias de sinalização proteica deste tipo de tumor, destacam-se: a via de ativação dos genes receptores tirosina cinase (RTK); a via da fosfatidilinoitol-3-OH cinase (PI(3)k); e a via p53 e retinoblastoma (Parsons et al., 2008). Compreender as alterações nessas vias torna-se importante, pois poderiam ser realizadas abordagens direcionadas aos alvos como sinalização oncogênica, controle do ciclo celular e indução de apoptose (Le Rhun et al., 2019).

A Nek1 é uma proteína cuja função está associada com a resistência tumoral em células de gliomas. Observou-se que esta proteína está superexpressa em amostras de diferentes glioblastomas humanos e, diretamente correlacionada com o grau de agressividade do tumor, além da sua associação a resistência à temozolomida e proliferação celular (Zhu et al., 2016). A busca por novos marcadores tem sido uma constante entre estas proteínas e a Nek1 é uma das que tem merecido destaque.

1.4 Nek1

A Nek1 é um importante membro das *Never in mitosis A* (NIMA), que foi originalmente encontrada em *Aspergillus nidulans* (Zhu et al., 2016). Em humanos existem 11 Neks, conhecidas como Nek1 a Nek11 e são ortólogas à NIMA, pois apresentam domínio conservado do N- terminal e domínio regulador não catalítico do C- terminal (O'connell et al., 2003). Estas cinases desempenham funções variáveis (Liu et al., 2013), tais como: progressão mitótica, condensação da cromatina, quebra do envelope nuclear, sinalização de *checkpoint* do conjunto do eixo, citocinese e reparo de DNA (figura 1). Em particular, a Nek1 participa das funções ciliares, baseadas em microtúbulos, no reparo de DNA, além do controle mitótico, através de regulação do ciclo celular sinalizando a parada na fase G1-S e G2-M (Fry et al., 2012; Meirelles et al., 2014).

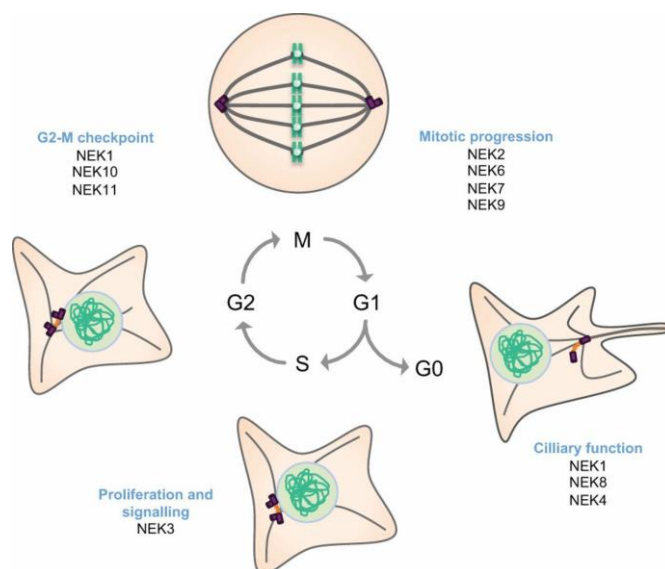


Figura 1 - Funções das Nek1 dentro do ciclo celular. Adaptado de (Fry et al., 2012).

Em 2016, Zhu et al. demonstraram que a superexpressão de Nek1 em gliomas está relacionado ao grau de agressividade do tumor e sua inibição pode induzir a apoptose, diminuir proliferação celular e resistência à temozolomida. Outros estudos mostrando o papel da Nek1 no contexto de reparo de DNA revelaram a interação desta proteína com a Rad54/ATRX e MRE11, ambas envolvidas no início da resposta às quebras duplas (*DSBs- double strand breaks*).

A Nek1 atua na fosforilação da Rad54 no resíduo Ser 572, etapa chave para o reparo por recombinação homóloga (HR) e promoção da estabilidade da forquilha de replicação (Peres de Oliveira et al., 2020). A Nek1 também promove ativação da Chk1 juntamente com as proteínas ATR-ATRIP, complexo responsável pela sinalização eficiente do dano ao DNA, e seu mau funcionamento causa instabilidade genômica.

Em células de tumor de próstata, a Nek1 foi descrita como sendo regulada pela TLK1, proteína envolvida na montagem de cromatina, replicação, transcrição, reparo do DNA e segregação cromossômica, que interage com a VDAC1, uma proteína de membrana mitocondrial, promovendo assim, sua ativação. Esse estudo propôs que a via TLK1<Nek1<VDAC1 tem importante relação em preservar as mitocôndrias, que além do desempenho energético, estão associadas à sinalização, proliferação e apoptose celular, neste tipo de tumor (Singh et al., 2019; Singh et al., 2020).

A Nek1 está associada a respostas após a exposição à radiação ionizante (IR), agentes alquilantes, radiação ultravioleta (UV), agentes de reticulação e estresse oxidativo, além da co-localização da Nek1 como marcadores de danos do DNA, como a proteína H2AX fosforilada, que estão envolvidas no reparo de DSBs (Freund et al., 2020).

Os mecanismos associados a Nek1 mostram a importância de sua compreensão devido aos inúmeros papéis que esta proteína desempenha dentro das células. Diante desta complexidade, encontrar um inibidor para esta proteína seria algo muito atraente (Singh et al., 2020). Além disso, a Nek1 parece ser uma boa candidata como alvo farmacológico em função da sua associação à resistência tumoral (Zhu et al., 2016). Neste sentido, Moraes et al. (2015) avaliaram Inibidores da atividade enzimática da proteína Nek1, pensando na estratégia de inibir a via de sinalização de danos no DNA desencadeada por esta proteína, como esquematizado na Figura 2. Neste estudo foram avaliados 85 inibidores comerciais frente a atividade da proteína Nek1, com destaque ao inibidor de JNK II, que reduziu a atividade enzimática da Nek1 em quase 30% a uma concentração de 50 µM. Além

disso, em teste *in silico* foi confirmada a interação deste inibidor com a proteína Nek1 (Moraes, Meirelles et al. 2015).

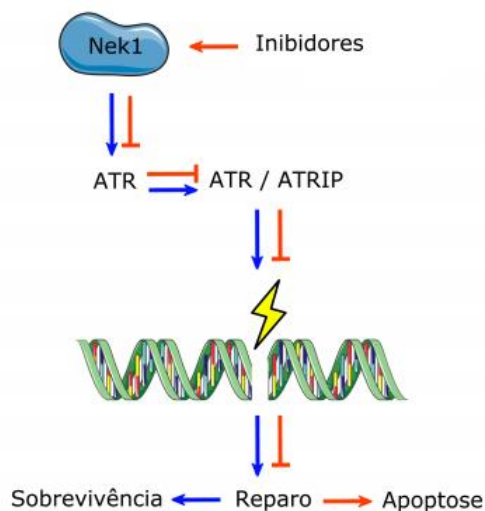


Figura 2 - Representação da via de sinalização da Nek1 através de inibidores. Figura cedida por Pablo Arantes.

Com base neste estudo e nos grupos funcionais encontrados nos inibidores comerciais acreditamos na possibilidade de encontrar um inibidor para Nek1 através de compostos heterocíclicos de Biginelli, pela diversidade estrutural e atividades farmacológicas já existentes.

1.5 Abordagens computacionais

A descoberta e o desenvolvimento de um novo fármaco são processos demorados e que apresentam alto custo. Um aspecto importante nesta busca tem sido a área de bioinformática, que vem auxiliando no entendimento do papel das vias bioquímicas e os mecanismos associados ao surgimento de doenças, que possam ser alvos para fármacos, com o objetivo maior de proporcionar uma melhora na qualidade de vida dos indivíduos (Guido et al., 2010). Nesse contexto, é preciso levar em consideração os efeitos colaterais, assim como a eficácia dos

medicamentos, e esses fatores muitas vezes comprometem a introdução desse fármaco ao mercado (Podlewska & Kafel, 2018).

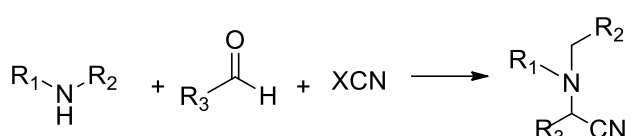
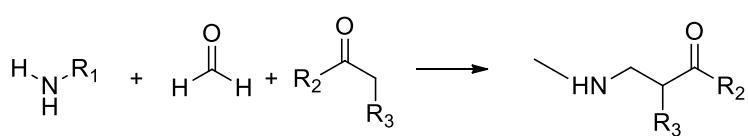
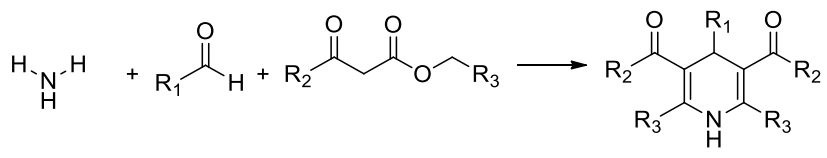
O desempenho na construção de um novo fármaco pode ser dividido em duas grandes fases: a pré-clínica e a clínica. Na fase pré-clínica podem ser realizadas as pesquisas das estruturas moleculares com potencial bioatividade, através de triagens reais, como biológicas e bioquímicas, ou de triagens computacionais através, por exemplo, de *docking* molecular, com produtos naturais, compostos sintéticos ou coleções combinatórias (Guido et al., 2010). As pesquisas tecnológicas para este fim, como a genômica e a proteômica, também apresentam informações relevantes quanto a novos e atrativos alvos moleculares e suas funções nos processos fisiológicos. Através das técnicas computacionais, tem-se o manejo de dados e estruturas 3D de alvos moleculares e ligantes, auxiliando no direcionamento da descoberta de um provável candidato a fármaco (Rodrigues et al., 2012).

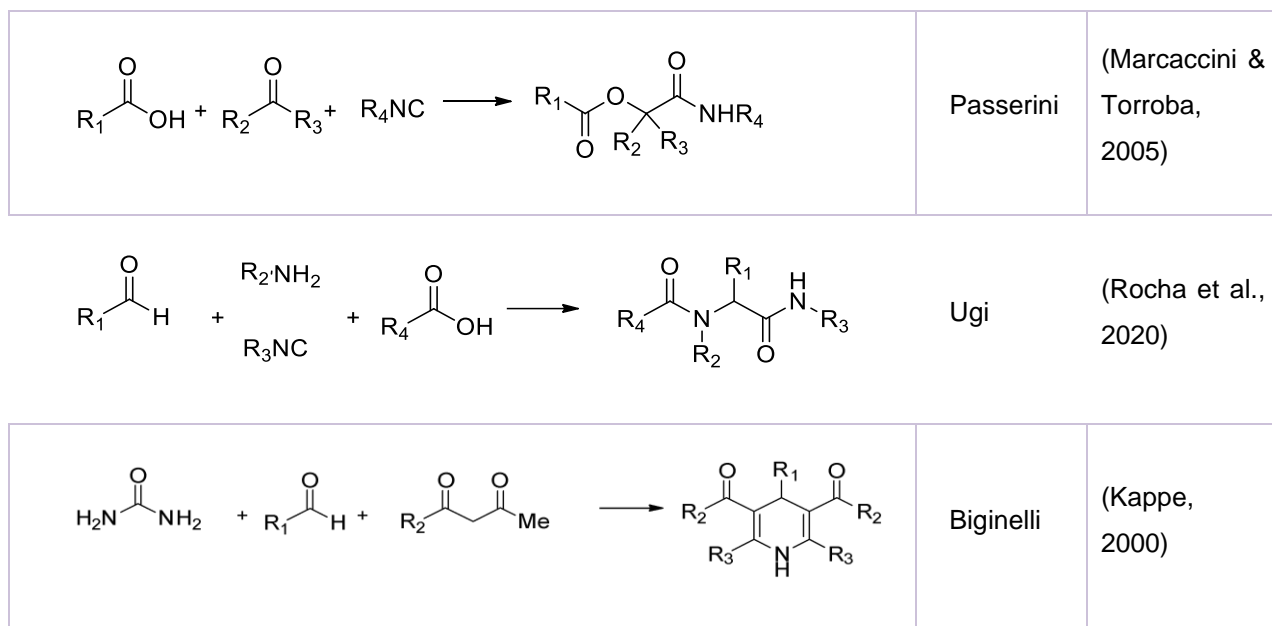
Por isso, a união de métodos experimentais e computacionais é de suma importância para a descoberta de um alvo molecular com bioatividade. Um dos métodos computacionais utilizados é a docagem molecular, que prediz a conformação bioativa de uma pequena molécula, ligante, no sítio de ligação de uma macromolécula, proteína-alvo, em que é feita uma observação de como ocorre essa ligação. Essa técnica tem como objetivo selecionar os compostos para teste através de análises de interação química-biológica (Guido et al., 2010). Por isso, o uso de estruturas de proteínas 3D tornou-se uma ferramenta indispensável na busca por novos alvos moleculares no combate às patologias humanas, principalmente as neoplasias. É através destas ferramentas que é possível identificarem o sítio de ligação entre a proteína (Nek1) e os possíveis inibidores.

1.6 Reações Multicomponentes

Os compostos heterocíclicos são importantes por fazerem parte da estrutura da grande maioria dos fármacos, além de integrarem moléculas biológicas do corpo humano, como o DNA e o RNA (Kaur et al., 2017). Diante disto, a busca por

metodologias sintéticas que visem à obtenção de compostos heterocíclicos que apresentem propriedades terapêuticas têm apresentado grande relevância na área da química orgânica e medicinal (Kappe, 2000). As reações multicomponentes (RMCs) têm se destacado como uma das abordagens mais utilizadas na química orgânica, por apresentarem a possibilidade de diversidade estrutural, eficiência e rapidez na construção de bibliotecas combinatórias na busca por novos fármacos (Russowsky et al., 2004). A abordagem utilizada pelas RMCs é extremamente vantajosa do ponto de vista da química verde, pois possibilita economia de átomos, o que minimiza formação de resíduos, além de apresentar purificações de baixo custo (Cimarelli, 2019). Por estes motivos, as RMCs representam uma química mais limpa e interessante. Dentre as RMCs descritas na literatura, as que apresentam maior interesse (esquema 1) incluem as reações de Biginelli, Mannich, Passerini, Ugi, Strecker, Hantzsch entre outras (Nagarajaiah et al., 2016).

<i>Reações Multicomponentes</i>	<i>Autores</i>	<i>Referências</i>
	Strecker	(Das et al., 2011)
	Mannich	(Chen et al., 2019)
	Hantzsch	(Santos et al., 2014)



Esquema 1 - Exemplos de algumas reações multicomponentes.

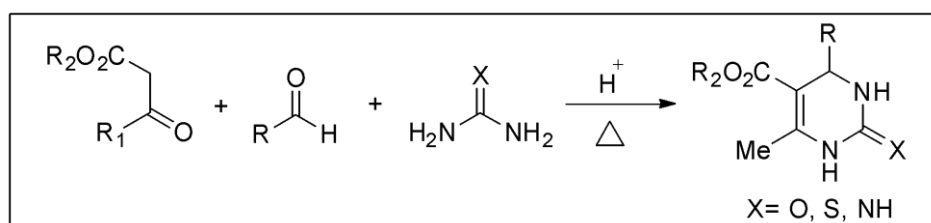
Dentre as classes de heterocíclicos obtidos através das reações multicomponentes têm-se destaque às moléculas conhecidas como dihidropirimidinonas, que são construídas através da reação multicomponente de Biginelli e se destacam pela facilidade sintética, onde três ou mais substratos reagem dando um único produto (Kaur et al., 2017).

1.6.1 Reação de Biginelli

Em 1893, Pietro Biginelli demonstrou ser possível a construção de dihidropirimidinonas (DHPMs) através de uma reação sob catálise ácida envolvendo apenas três reagentes comuns em um único recipiente (Nagarajiah et al., 2016). Ao longo de décadas esta reação ficou esquecida e pouco explorada por químicos sintéticos até que no final do século 20 passou a ser novamente investigada e vastamente utilizada para obtenção direta de dihidropirimidinonas. Diversas variantes e protocolos abordando catalisadores, meios e aspectos mecanísticos (Patil et al., 2019) vêm sendo demonstrados na literatura, sendo esta, com certeza, uma das reações multicomponentes mais robustas já conhecidas (Ould M'hamed et al., 2016).

A reação de Biginelli clássica é composta por um aldeído, uma ureia e um composto 1,3- dicarbonílico (esquema 2). Diante disso, a reação de Biginelli apresenta uma grande eficiência na síntese de DHPMs, além da vasta diversidade estrutural alcançada pela própria natureza multicomponente desta reação, tornando esta metodologia extremamente interessante e útil sinteticamente (Ould M'hamed et al., 2016).

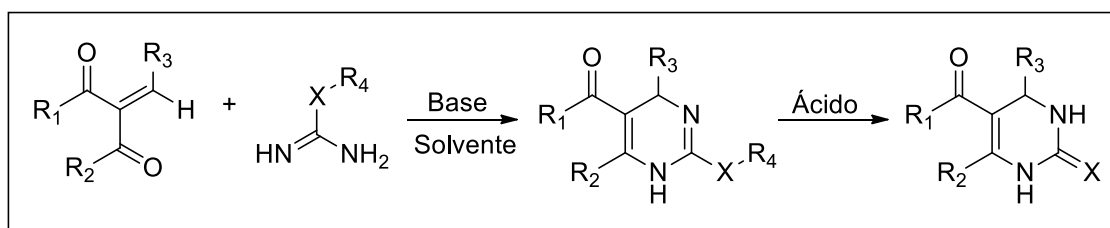
Como mencionado anteriormente, o protocolo experimental acessível da reação multicomponente de Biginelli permite a construção de bibliotecas de compostos que vêm sendo investigados quanto as mais variadas atividades farmacológicas, como antitumorais, por exemplo. (Kappe, 2000).



Esquema 2 - Reação multicomponente de Biginelli - Versão clássica (Kappe, 2000).

Reações clássicas de Biginelli não apresentam bons rendimentos, por isso faz-se necessário à busca por melhorias e aprimoramentos na metodologia desta reação (Wan & Liu, 2010). Desta forma, inúmeras são as abordagens utilizadas na síntese de DHPMs com o objetivo de melhorar a eficiência desta reação, como a utilização de diferentes catalisadores, diferentes condições do meio reacional, irradiação por microondas e irradiação por ultrassom. Estes estudos relatam uma boa perspectiva na utilização de diferentes catalisadores como ácidos de Lewis, halogênios, biocatalisadores, polímeros, sais de metais, líquidos iônicos, entre outros (Patil et al., 2019). Alguns estudos mostraram excelentes catalisadores como promotores eficientes na reação de Biginelli, aumentando seus rendimentos e que em condições sem solventes, diminuem o tempo reacional (Sachdeva & Dwivedi, 2012).

Na maioria dos estudos envolvendo esta metodologia as variações em seu protocolo buscam com frequência a maior eficácia bem como a ampliação do escopo reacional de forma a se alcançar o arcabouço estrutural almejado para determinado planejamento sintético. Com este intuito, algumas variações metodológicas surgiram, como a variação de Atwal que, em 1987, propôs modificações que permitiram a obtenção de novas dihidropirimidinonas (esquema 3) (Pair et al., 2015).



Esquema 3 - Versão de Atwal para a reação de Biginelli. Adaptado de Pair, Levacher et al, 2015).

1.6.1.1 Dihidropirimidinonas e suas atividades farmacológicas

As dihidropirimidinonas são encontradas em produtos de origem sintética e natural, se destacando pela ampla variedade de atividades farmacológicas: antivirais, antitumorais, antibacterianas, antifúngicas, inibidores de canais de cálcio, entre outras (de Fatima et al., 2015). Como exemplos de sínteses interessantes, destacam-se a da nifedipina (figura 3), que atua como bloqueadora dos canais de cálcio, do monastrol, como inibidor da proteína motora da cinesina mitótica Eg5, além de seu potencial antitumoral, do Gleevec®, inibidor de tirosina cinase, que também apresenta atividades antitumorais, além de alcalóides marinhos naturais, como batzeladina A e B, inibidores da ligação do HIV gp-120-CD4 (Heravi et al., 2013; Shumaila & Al-Thulaia, 2019).

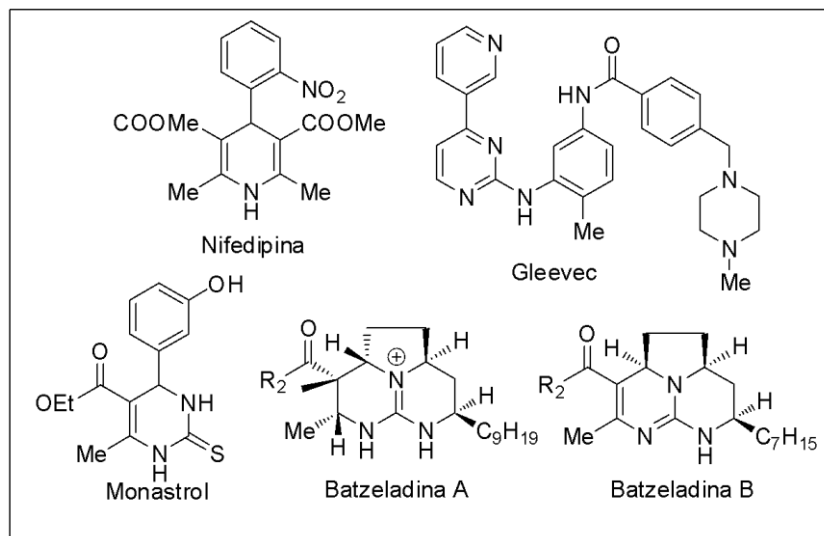


Figura 3 - Estruturas de heterocíclicos provenientes de RMC. Adaptado de Shumaila e Al- Thulaia, 2019.

Vale ressaltar que qualquer mudança estrutural no núcleo destes compostos resulta diretamente em diferença de atividade farmacológica (Matos et al., 2018). Um estudo mostrando a relação entre atividade farmacológica e modificação estrutural foi realizado utilizando a DHPM nifedipina, conhecida por sua atividade hipertensiva, porém seus análogos não obtiveram a mesma atividade (Kappe, 2000).

Dentro do contexto das atividades farmacológicas, encontradas nas dihidropirimidinonas, as antitumorais têm sido uma das mais interessantes. Em geral, os estudos preliminares são realizados através da correlação de valores de IC₅₀ para atividades citotóxicas para as células. Um estudo mostrou que DHPMs apresentaram capacidade de inibir a DNA ligase em células de câncer de fígado, enzima relacionada à processos de replicação, reparo e recombinação do DNA (Sashidhara et al., 2016). Outros estudos mostraram a eficiência de análogos do monastrol em células de: câncer de mama, cólon, renal, melanoma e ovário (Fátima et al., 2015). Diante dos inúmeros estudos e atividade antitumoral destas moléculas, as DHPMs têm se tornado um alvo de grande interesse.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Buscar novos compostos pirimidínicos com potencial inibição da proteína Nek1 usando estratégias *in silico*, sintetizar estes compostos e avaliar a citotoxicidade dessas moléculas em linhagens de glioblastomas.

2.2 Objetivos Específicos

1. Buscar estruturas moleculares baseadas em inibidores da proteína Nek1 e a partir destas propor novos compostos com estrutura química adequada.
2. Verificar a eficácia destes compostos químicos como inibidores da proteína Nek1 através de técnicas de docagem molecular.
3. Sintetizar as dihidropirimidinonas com potencial de inibição da Nek1, utilizando-se da reação multicomponente de Biginelli.
4. Verificar a eficácia destas moléculas na indução de morte em linhagens celulares de glioblastoma.

Os resultados obtidos durante o mestrado foram agrupados e serão apresentados na forma de um manuscrito intitulado “*Prospecting for Nek1 inhibitors employing compounds pyrimidinics: in silico, synthesis and in vitro analysis*” a ser submetido à revista *Current Topics in Medicinal Chemistry*. Para facilitar a leitura, as figuras estão inseridas ao longo do texto.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

**Prospecting for Nek1 inhibitors employing compounds pyrimidinics:
in silico, synthesis and in vitro analysis**

Danielle Pereira Batista¹, João Victor de Oliveira¹, Paulo R. Dornelles Júnior², Rafael Cáceres¹, Pablo Ricardo Arantes¹, Marla Narciso Godoi² and Dinara Jaqueline Moura^{1,2*}

¹Laboratory of Genetic Toxicology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brazil; ²Department of Pharmacosciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brazil.

Correspondence

Dinara Jaqueline Moura, ¹Laboratory of Genetic Toxicology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA)

Porto Alegre, RS, Brazil

Email: dinaram@ufcspa.edu.br

ABSTRACT

Gliomas are primary brain tumors responsible for 78% of all malignant tumors in the Central Nervous System (CNS). Surgery, radiation therapy and temozolomide-based chemotherapy (TMZ) are fundamental treatment options in clinical management. However, most gliomas are surgically irresistible and, when diagnosed at an advanced stage, such as glioblastomas, the level of resistance to conventional chemotherapy increases. Nek1 is one of the proteins that has been associated with tumor resistance in glioma cells. Due to its high expression in gliomas and its relationship with tumor aggressiveness, proliferation and chemotherapy resistance, the Nek1 protein may represent a therapeutic target with high potential in the treatment of glioblastomas. The elucidated structure of the Nek1 protein complexed to the inhibitor with a structure similar to that of the ATP molecule, allowed the choice of pyrimidine compounds such as dihydropyrimidinones (DHPM), as possible inhibitors of this enzyme. These compounds often have demonstrated potential bioactivity. Eight DHPMs were synthesized by Biginelli's reaction and evaluated for their cytotoxicity in normal fibroblasts (MRC5) and glioma tumor cells, T98 and U87, respectively. DHPM 1a showed an excellent cytotoxic effect and high selectivity. Based on this, it was evaluated the type of death induced by exposure to compound and we showed that the DHPM 1a was able to lead tumor cells to death by the process of apoptosis and subsequent necrosis, significantly reducing viable cells.

Keywords: Glioblastoma, Nek1, Dihydropyrimidinones, Molecular docking, antitumoral action, Necrosis

1. INTRODUCTION

Heterocyclic compounds are part of the structure of some medicinal drugs [1]. Due to its importance, the search for synthetic methodologies aimed to obtain heterocyclic compounds with therapeutic properties has shown great relevance in the organic and medicinal chemistry areas [2]. Multicomponent Reactions (RMCs) have stood out as one of the most used approaches in organic chemistry, presenting advantages such as the possibility of structural diversity, efficiency and speed in the construction of combinatorial libraries in the search for new drugs [3]. Additionally, the approach used by RMCs is extremely advantageous from the point of view of green chemistry once allows atom savings, which minimizes waste formation and enables low-cost purifications [4]. Dihydropyrimidinones (DHPMs), also known as Biginelli compounds, are a class of heterocycles compounds that has an especial interest in medicinal chemistry because of their diverse pharmacological activities [5], including antiviral, antitumor, antibacterial, antifungal, calcium channel inhibitors and others [6]. Examples of DHPM are nifedipine, which acts as a calcium channel blocker; monastrol, which acts as an inhibitor of the mitotic kinesin motor protein Eg5; Gleevec®, a tyrosine inhibitor kinase, which also has antitumor activities; and natural marine alkaloids, such as batzeladine A and B, which act as inhibitors of HIV binding gp-120-CD4 [7][8].

Understanding the complexity of cancer is one of the biggest challenges of science. The diagnosis of cancer is made through screening, where imaging exams, biomarkers, biopsies and cancerous markers are addressed [9]. Treatment options for the clinical management of cancer include surgery, radiation therapy and chemotherapy [10]. To eradicate localized tumors, surgery and radiotherapy are effective, but most tumor cells spread quickly throughout the body, so it is necessary to use chemotherapeutic agents, in a systemic way, which have limitations due to the insufficient amount of agents effective therapeutic against cells cancers [11]. Other biases found in chemotherapy are the high cytotoxicity of chemotherapeutic agents, low bioavailability, low solubility in physiological medium, non-specific distribution and rapid blood clearance [12]. Specifically, resistance to chemotherapy remains a major challenge due to the involvement of several potential resistance mechanisms [13]. Among the tumors, we highlight the gliomas that are the most common primary tumors of the central nervous system (CNS), affecting mainly adults, representing 78% of malignant CNS tumors. Gliomas are classified into degrees of malignancy, ranging from I to IV. Grade I gliomas in the pediatric population are generally curable by resection. Those from grade II to IV are highly infiltrating, not allowing resection, they are incurable [14]. Grade IV tumors are known as glioblastomas multiforme (GBM) and are the most prevalent and aggressive [15]. The average survival of these patients is still low, around 9 to 12 months, and only 4.7% of patients manage to survive above 5 years [10][16]. These tumors have a poor prognosis due to their high infiltration capacity, resistance to radiotherapy and chemotherapy and the difficulty of penetration of chemotherapeutic agents due to the blood-brain barrier [16]. One of the main difficulties found in the treatment of GBM occurs due to resistance to chemotherapy, since they have low bioavailability, reduced drug efficacy due to DNA repair mechanisms, low ability to cross the blood-brain barrier and high toxicity to healthy cells [17]. Understanding GBM signaling pathways becomes extremely important, as they are directly related to cell cycle control and apoptosis induction [18]. In addition, to evaluate the relationship of proteins found in GBMs, such as Nek1 in tumor resistance and DNA repair.

Never in mitosis A (NIMA)-related kinase 1 (Nek1) was described as a pattern overexpressed in high-grade glioma tissues and cell lines [19]. Nek1 performs a key role in several cellular functions like cell cycle progression and many DNA damage response pathways [20][21]. Furthermore, previous work showed that knockdown of Nek1 by siRNA was able to inhibit glioma cell growth and increased susceptibility to temozolomide (TMZ), the principal chemotherapeutic drug used to treat glioblastoma leading to apoptosis [19]. The study using commercial inhibitors was carried out to inhibit Nek1 and the compound JNK Inhibitor II reduced the enzyme activity of Nek1 by almost 30%. Furthermore, interactions between the compounds and the ATP binding site on the protein occurred [22]. Considering the possible involvement of Nek1 in the poor prognosis of glioblastomas, the search for inhibitors of this protein is interesting. Using *in silico* strategies, this work identifies DHPM-type compounds that present inhibition of the Nek1 protein by molecular docking. These compounds were synthesized by a multicomponent reaction and the efficacy was confirmed using *in vitro* assays to determine the induction of cytotoxicity.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Molecular modeling

The NEK1 complex was obtained through molecular modeling of missing loops of PDB ID 4APC model and ligand (ADP) transfer from PDBID 2W5A. The process was performed on Modeller v.9.19 [23]. For each model was build 1000 models and selected the one with the best stereochemical quality with DOPE assessment method evaluation. The quality of the model was checked with Procheck [24], Verify 3D [25] and MolProbity [26] softwares.

2.2. Ligand library

Thirty dihydropyrimidinones (guanidines, semicarbazides and indolic) derivatives were designed through PyMOL [27] and were parameterized employing Automated Topology Builder server [28]. The DataWarrior webservice [29] based on DrugBank [30] was employed in order to generate molecular conformers, totalizing 2026 distinct conformers.

2.3. Molecular docking protocol and validation

Molecular docking experiments were carried out using AutoDock Vina [31]. AutoDock Vina employs a gradient-based conformational search approach and defines the search space by a grid box defined by the box center coordinates and its dimensions of x, y and z in grid resolution internally assigned to 1 angstroms [31]. We set the number of binding modes to 1000 and exhaustiveness set to 200 in order to control how many times the calculations are repeated. The grid dimensions were 40 x 40 x 40 (x, y, z) points center on the ADP binding site -26.22 x 11.13 x 16.78 (x, y, z). The scoring of the generated docking poses and ranking of the ligands were based on the Vina empirical scoring function. All rotatable dihedral angles of NEK1 ligands were treated as flexible. The orientations of NEK1 ligands at the binding sites on PVA were selected from docked conformations as representative of the lower energy clusters generated by Autodock Vina.

2.4. ADMETox properties

All the design molecules were submitted to DataWarrior webserver [29] based on DrugBank [30] in order to establish the best-scored conformers - lower docking energy and none mutagenic, tumorigenic, irritant and reproductive effect. All those tools, when used together, generate a powerful mechanism, at least helpful, for selecting new NEK1 inhibitors as well as the ability to select ligands.

2.5. Chemicals

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), FBS (fetal bovine serum), newborn calf serum, PBS (phosphate-buffered saline), trypsin-EDTA, L-glutamine, penicillin/streptomycin and Trypan blue were obtained from Gibco-BRL (Grand Island, NY, USA). FITC Annexin V/dead cell apoptosis kit was purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA). All other reagents were analytical grade.

2.6. DHPMs synthesis, analysis and instruments

Dihydropyrimidinones and derivatives (1a-h) (Fig. 1) were synthesized from the reaction of Biginelli three components, represented in Scheme 1, using aromatic aldehydes 2 mmol (3a-e) (Fig. 2), ethyl acetoacetate (2a) or acetylacetone (2b) or 4,4,4-trifluoro-1-phenylbutane-1,3-dione (2c) 2 mmol and urea (4a) or thiourea (4b) 4 mmol was heated under reflux, in solvent-free conditions, catalyzed by HCl (5 drops), for 2h. After cooling, the reaction mixture was poured onto crushed ice (100 g) and the solid products were filtered, washed with a mixture of cold water/ethanol (1:1) (2 x 20 mL). The solid products were dried and recrystallized from hot ethanol to afford pure products. The structures of all compounds were confirmed by ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra, as well as by melting point analysis in according to literature data.

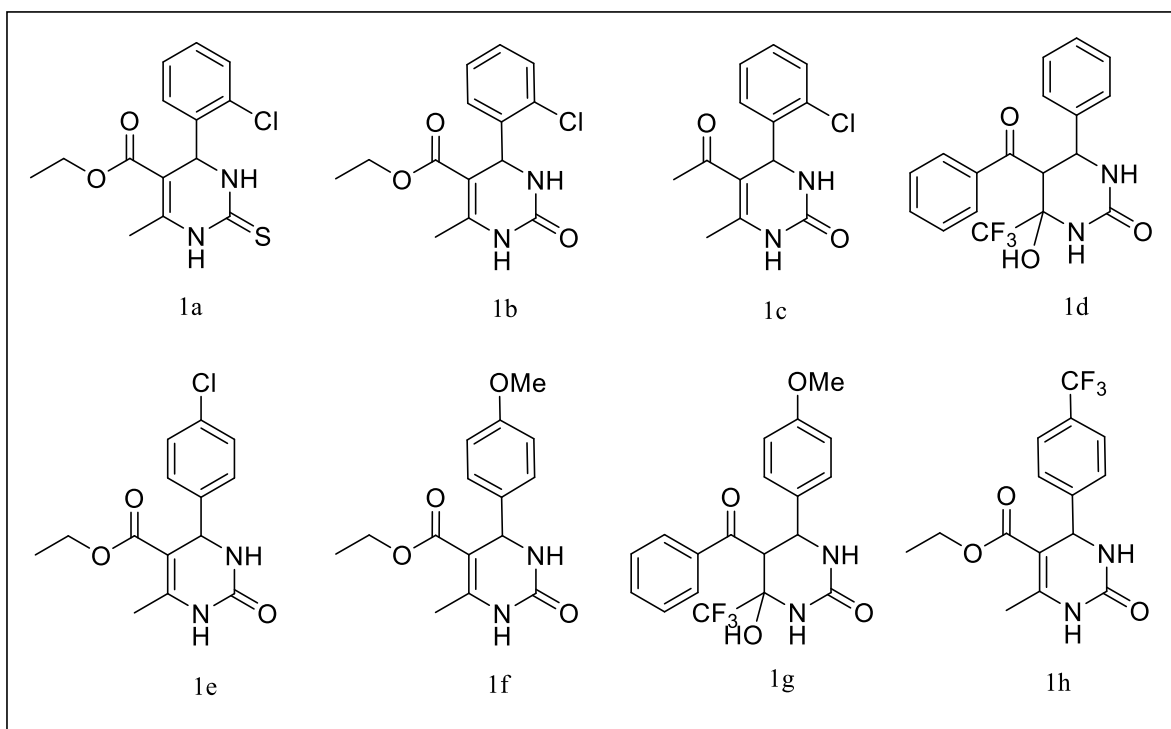
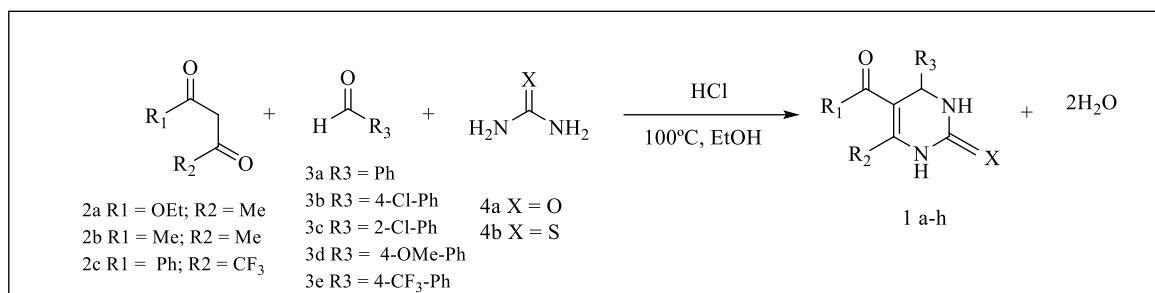


Fig. 1. Heterocyclic compounds synthesized in this work.



Scheme 1. Synthesis of heterocyclic compounds

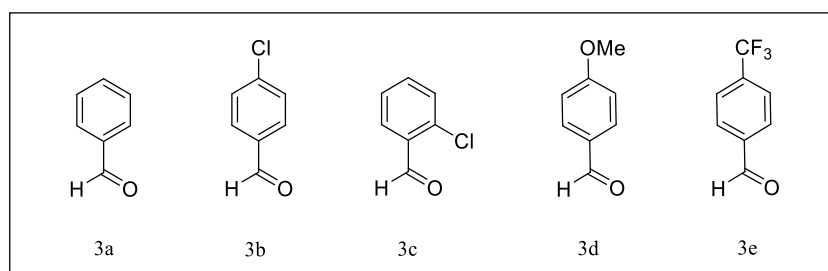


Fig. 2. Aromatic aldehydes (3a-e) used in the synthesis of the heterocyclic compounds.

The nomenclature of the synthesized compounds was given based on the Chem program Draw Professional 17.1 (ChemOffice 2018). Melting points were determined on a MAXIM-LAB microscopic melting point apparatus and were uncorrected. Thin-layer chromatography (TLC) was carried using on pre-coated silica gel Macherey-Nagel Xtra SIL G / UV254. The TLC plates were developed in the chamber with ultraviolet (UV) light and iodine vapor. Proton nuclear magnetic resonance ¹H NMR and carbon nuclear magnetic resonance ¹³C NMR spectra were obtained using Varian VNMRS-300 (75) MHz and Varian 400 (100) MHz spectrometers. Chemical shifts were reported in parts per million (ppm) and are calibrated to residual solvent peaks: proton (DMSO-d₆ 2.50 ppm) for ¹H NMR and carbon (DMSO-d₆ 39.52 ppm) for ¹³C NMR. For ¹H NMR, coupling constants (*J*) were reported in Hertz (Hz). Multiplicities were reported using the following abbreviations: s singlet, d doublet, dd doublet of doublet, t triplet, q quartet, m multiplet.

2.7. Cell culture

The human lung fibroblast cell line (MRC-5) and the Human glioblastoma cells (T98-G) and (U87-MG) were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Both cells were cultivated in DMEM (Gibco) low glucose supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 0.2 mg/ml L-glutamine, 100 IU/ml penicillin and 100 g/ml streptomycin. Cells were maintained in tissue culture flasks at 37°C, in a humidified atmosphere containing 5% CO₂, and were harvested by treatment with 0.15% trypsin–0.08% EDTA in phosphate-buffered saline (PBS) solution. For the treatments, stock solutions of DHPMs were prepared immediately prior to use using 5% DMSO and water. The DHPMs, dissolved in DMSO, were added to FBS-free media to achieve the different designed concentrations (1 to 1000 μM) and the cells were treated

for 24 h or 72 h under standard conditions. The final concentration of DMSO in the incubation mixture never exceeds 0.5%.

2.8. Neutral red uptake assay

To the neutral red uptake (NRU) assay, T98, U87 and MRC5 cells were seeded in a 96-well tissue culture microtiter plate (1.3×10^5 cells/mL) in complete media and grown for 24 h prior to treatment with DHPMs before evaluation, according (NTP & NICEATM, 2003), with some modifications. Briefly, after treatment, cells were washed with 250 μ l of PBS before the addition of 250 μ l of neutral red dye (25 μ g/ml) dissolved in serum-free media and incubated for 3 h at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator. Cells were washed with PBS, and 125 μ l of a desorb solution (ethanol: acetic acid: water, 50:1:49) was added followed by gentle shaking for 30 min for complete dissolution. Absorbance was recorded at 540 nm using a microtiter plate reader. Cell viability was expressed as a percentage of the control of DMSO.

2.9. Selective-Index

To determine the cytotoxic selectivity of the substances tested, the selectivity index (SI) was calculated according to the following equation:

$$SI = IC_{50}^{\text{no cancer cells}} / IC_{50}^{\text{cancer cells}}$$

SI ratios between 3 and 6 refer to moderate selectivity, and ratios higher than six indicate high selectivity, whereas compounds that do not fulfill either of these criteria are rated as non-selective, according to Ibanez and collaborators [32].

2.10. Annexin V assay of apoptosis

For Annexin V analysis of cell apoptosis, U87-MG cells were dissociated with trypsin after treatment, washed and stained with FITC-Annexin V (Biosource, Suzhou, China) for 15 min according to manufactures' recommendations. The fluorescence was measured using a FACSCalibur flow cytometer (BD, Shanghai, China) with CellQuest software. A total of 10,000 events were measured per sample and the percentage of viable, apoptotic and death cells was determined.

2.11. Statistics

All experiments were independently repeated at least three times. Results are expressed as mean \pm standard error mean (SEM). Data were analyzed. The statistics performed were analysis of variance followed by One-way Dunnett's Multiple Comparison Test using Prism Statistical Software from GraphPad (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). *P* value < 0.05 was assumed as statistically significant.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. 3D structure of the Nek1 protein

Although Nek1 has two structures deposited in the Protein Data Bank (PDB ID 4APC and PDB ID 4B9D), it was necessary to carry out the construction of a model by comparative modeling. The Nek1 structures available in the database presented problems, probably due to the resolution of the crystal, where parts of the sequence were not elucidated. These gaps in the structure were solved with the construction of a new model. The protein was modeled using the structure found under the PDB ID 4B9D. The MODELLER9v17 software was used, using as input an alignment of the two amino acid sequences carried out by the Clustal Omega [33] software. The sequences were: Complete Nek1 to be modeled, the crystal sequence of PDB ID 4B9D. The routine used in the production of the models was model and 1000 models were built. Thus, among these structures built, the selected model was the one that had the best score in the evaluation of stereochemistry (analyzed with the PDBsum server and the PROCHECK [24] program).

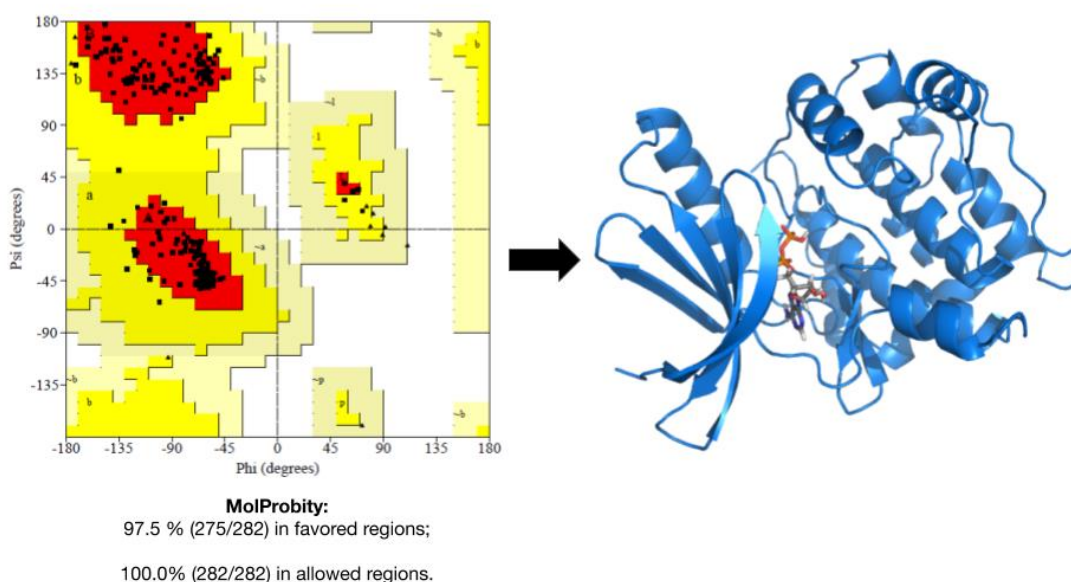


Fig. 3. Ramachandran plot for the new Nek1 model. In blue, the complete structure of Nek1 built in the present study.

The quality of the NEK1 model was checked with Procheck, Verify 3D and MolProbity. MolProbity revealed through Ramachandran plot that 97.5% (275/282) of all residues were in favored (98%) regions and 100.0 % (282/282) of all residues were in allowed (> 99.8%) regions. The results of the Ramachandran plot (Fig. 3), and analysis of the dihedral angles φ and ψ for the protein amino acids, showed that the model presents acceptable results. There is a high number of residues in favorable regions in the model. Waste in unfavorable regions also has an extremely low value in the model obtained, confirming a robust model. With these results

it is possible to infer that the model obtained has a good resolution compared to the Nek1 crystal. Allowing us to obtain the complete three-dimensional structure of Nek1, which was used in the following steps of the work, for molecular docking calculations.

3.2. Molecular Docking of New Pyrimidine Inhibitors

With the complete structure of Nek1, it was possible to carry out molecular docking studies of new pyrimidine inhibitors. First, virtual screening was performed to filter the molecules with possible therapeutic potential. The study of molecular docking involving these compounds, together with the evaluation of the ADME-Tox properties (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity), select the 8 compounds that were used in the following steps of the work, as they showed interaction with the protein Nek1.

By structurally analyzing these potential compounds, complexed with Nek1, it is possible to infer that when compared to the ADP co-crystallized ligand (Fig. 4A), all compounds interact in the same protein scaffold (Fig. 4B-I). Like ADP, the selected molecules interact directly with the Mg^{+2} co-factor, essential for the activity of the enzyme. The interaction energy of the selected compounds also showed values close to those of ADP (-8 kcal/mol). This structural analysis of the complexes reinforces the possible therapeutic potential of these molecules in the inhibition of Nek1 and thus its importance in studies in vitro, presented in the next steps of the study.

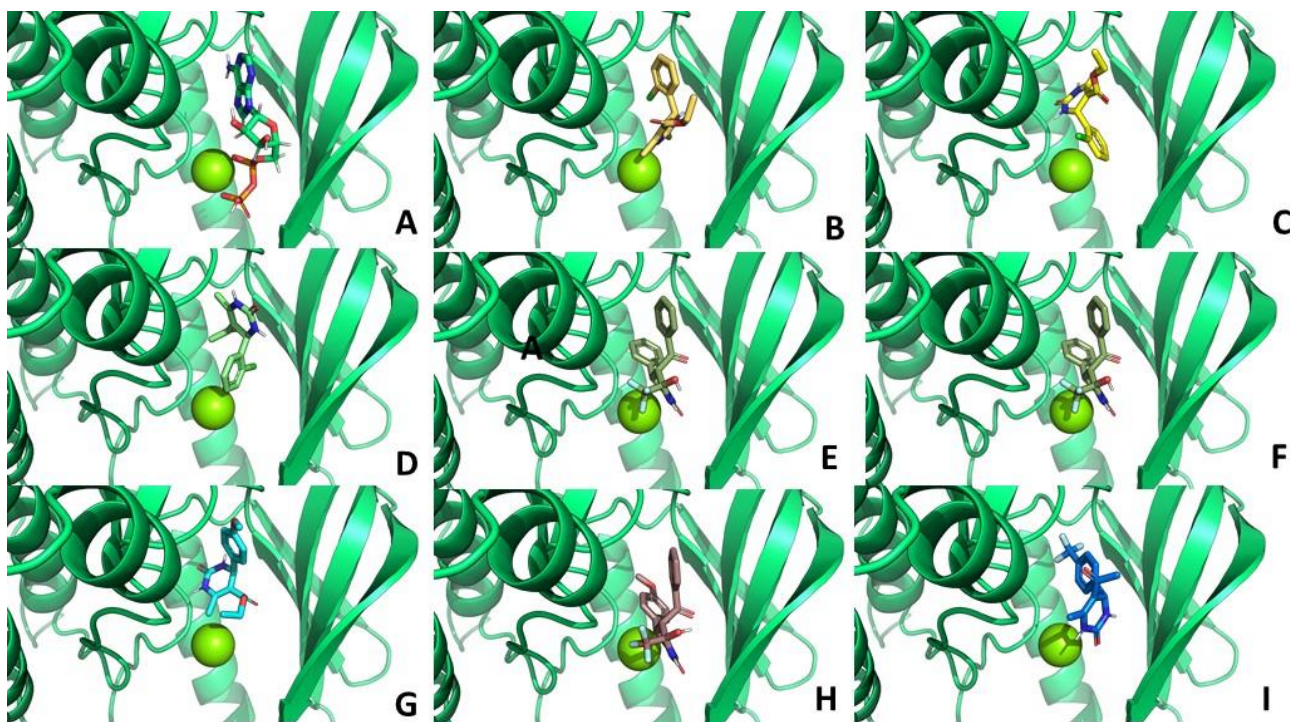


Fig. 4. Three-dimensional representation of the Nek1 protein complexed to ADP (A), compound 1a (B), compound 1b (C), compound 1c (D), compound 1d (E), compound 1e (F), compound 1f (G), compound 1g (H) and compound 1h (I). The ADP molecule is co-crystallized with the protein. In the cartoon representation (green) we have the protein and in yellow the Mg^{+2} co-factor.

Analyzes of the ADME-Tox properties of crossing the blood-brain barrier, LogPLipophilicity, solubility, metabolism by P-glycoprotein concomitantly with the analysis of the interaction energy of the calculations of the molecular docking calculations allowed the discovery of potential molecules with inhibitory activity in the Nek1 protein. The profile of each molecule is shown in Table 1. From all these parameters, it was observed that the 8 compounds source similar binding energy. Compounds 1, 6 and 7 do not have the ability to cross the blood brain barrier. Compounds 4 and 7 have moderate solubility, the others were all soluble. All compounds show LogP <5, that is directly related to the absorption of the compound in the body. Compounds 4 and 7 show themselves able to metabolize PgP. These physico-chemical parameters are essential, as they present the bioavailability that the drug has.

<i>Compounds</i>	Dock energy (Kcal/mol)	Log P	BB	ESOL (S= Soluble; MS= Moderately soluble)	PgP
<i>1a</i>	-7.9	<3,0	No	S	No
<i>1b</i>	-7.5	<2,5	Yes	S	No
<i>1c</i>	-7.2	<2,0	Yes	S	No
<i>1d</i>	-9.4	<2,5	Yes	MS	Yes
<i>1e</i>	-7.3	<2,5	Yes	S	No
<i>1f</i>	-8.0	<2,0	No	S	No
<i>1g</i>	-8.4	<2,5	No	MS	Yes
<i>1h</i>	-8.4	<2,5	Yes	S	No

Table 1. ADME-Tox properties from ligands.

3.3. Characteristics of synthesized molecules

The synthesized DHPMs are shown in Fig. 1. It is important to note that after recrystallization the products were obtained in yields of up to 65%. The aromatic aldehyde-carrying substituents electron donors or electron receptors reacted expected compounds in satisfactory purity and yields. Reactions containing a fluorinated dicarbonyl compound form precursors to DHPMs, called intermediates (tetrahydropyrimidinones), which make the dehydration stage impossible in situ. Moreover, the presence of an additional OH in the structure had a different polarity in relation to the other compounds and we found it interesting to explore this property. DHPMs are stable at room temperature, light and air.

Their spectroscopic analyzes were in accordance with the structures already found in the literature and are described below.

Ethyl 4-(2-chlorophenyl)-6-methyl-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (1a). mp 167-168°C (An et al., 2014). ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d₆) δ 1.00 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 2.32 (s, 3H, CH₃), 3.92 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 5.64 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H, CH), 7.43 – 7.28 (m, 4H, arom.), 9.60 (s, 1H, NH), 10.36 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 13.95, 17.10, 51.68, 59.58, 99.80, 127.91, 129.44, 129.60, 131.87, 140.67, 145.71, 164.86, 169.47, 173.90.

Ethyl 4-(2-chlorophenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (1b). mp 214-215°C (Kumarasamy et al., 2017). ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d₆) δ 0.96 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 2.27 (s, 3H, CH₃), 3.86 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 5.61 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, CH), 7.22 - 7.39 (m, 3H, arom.), 7.38 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.68 (s, 1H), NH), 9.24 (s, 1H), NH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 13.98, 17.73, 51.56, 59.18, 97.98, 127.82, 128.85, 129.17, 129.44, 131.76, 141.76, 149.37, 151.44, 165.05.

5-acetyl-4-(2-chlorophenyl)-6-methyl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (1c). mp 240-244°C (Shamim et al., 2018). ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d₆) δ 2.03 (s, 3H, CH₃), 2.31 (s, 3H, CH₃), 5.64 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H, CH), 7.22 – 7.30 (m, 3H, arom.), 7.41 (dd, *J* = 6.9, 2.1 Hz, 1H, CH), 7.71 (s, 1H, NH), 9.25 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 18.96, 30.21, 51.57, 108.52, 127.95, 128.55, 129.40, 129.70, 131.88, 140.85, 148.92, 151.62, 194.07.

5-benzoyl-4-hydroxy-6-phenyl-4-(trifluoromethyl) tetrahydropyrimidin-2(1H)-one (1d). mp 165- 170°C (Saloutin et al., 2000). ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d₆) δ 4.40 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H, CH), 4.98 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, CH), 7.07 – 7.48 (m, 10H, arom.), 7.66 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H), 7.75 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 48.10, 54.70, 81.32, 127.74, 128.10, 128.16, 128.29, 128.49, 129.08, 133.25, 137.30, 138.37, 153.88, 195.79.

Ethyl 4-(4-chlorophenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (1e). mp 206-210°C (Kumarasamy et al., 2017). ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d₆) δ 1.07 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 2.23 (s, 3H, CH₃), 3.96 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 5.13 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H, CH), 5.73 (s, 1H), 7.23 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, arom.), 7.37 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, arom.), 7.74 (s, 1H), NH), 9.22 (s, 1H), NH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 14.09, 17.83, 53.46, 59.29, 98.87, 128.21, 128.41, 131.82, 143.81, 148.74, 151.97, 165.23.

Ethyl 4-(4-methoxyphenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (1f). mp 199-200°C (Kumarasamy et al., 2017). ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d₆) δ 1.07 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 2.21 (s, 3H, CH₃), 3.95 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 5.06 (s, 1H, CH), 6.85 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, arom.), 7.12 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, arom.), 7.64 (s, 1H, NH), 9.13 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 14.51, 18.02, 53.73, 55.45, 59.61, 99.95, 114.12, 127.84, 137.46, 148.42, 152.63, 158.87, 165.82.

5-benzoyl-4-hydroxy-6-(4-methoxyphenyl)-4-(trifluoromethyl) tetrahydropyrimidin-2(1H)-one (1g). mp 180-185°C (Adigun et al., 2020). ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d₆) δ 3.60 (s, 3H, OCH₃), 4.39 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H, CH), 4.93 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, CH), 6.72 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.17 (d, *J* = 9.9 Hz, 2H), 7.40 – 7.28 (m, 4H), 7.50 (t, *J* = 4.6 Hz, 2H), 7.69 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H, NH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 48.08, 54.00, 54.94, 81.28, 113.47, 27.70, 127.78, 128.50, 129.06, 129.48, 130.22, 133.22, 137.34, 153.84, 158.83, 195.88.

Ethyl 6-methyl-2-oxo-4-(4-(trifluoromethyl) phenyl)-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (1h). mp 174- 175°C (Ma et al., 2000). ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d₆) δ 1.07 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 2.25 (s, 3H, CH₃), 3.99 – 3.94 (m, 2H, OCH₂CH₃), 5.22 (s, 1H, CH), 7.44 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, arom.), 7.69 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, arom.), 7.83 (s, 1H, NH), 9.29 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 14.50, 18.32, 54.34, 60.20, 99.43, 125.98, 126.01, 126.05, 126.09, 149.54, 152.73, 165.95.

3.4. Biological evaluation

To evaluate the cytotoxic, normal fibroblasts and tumor cell lines were analyzed by NRU assay. The cells were exposed to treatments with 8 molecules with concentrations ranging from 1 to 1000 μM at 24 and 72 hours of exposure. In order to comparatively assess the cytotoxic effect of these molecules two tumoral cell lines were used, T98 and U87. These two cell lines have different sensibility profiles in response to temozolomide: T98 is resistant to the standard chemotherapy and U87 is more sensitive to this drug. To investigate selectivity MRC5 non-tumor cells were also evaluated.

In the 24 h treatment, compound 1a showed a well-marked cytotoxicity for the tumor cell line U87 from the concentration of 1 μM (Fig. 6C). Cytotoxicity in the T98 cell line occurs from the concentration of 50 μM, whereas in the MRC5 cell line it is only possible to observe a cytotoxicity in the highest concentrations tested (250 and 500 μM) (Fig. 6A and B). The IC₅₀s of molecule 1a were 43.47 μM, 214.99 μM and 276.60 μM for the U87, T98 and MRC5 cell lines, respectively. After 72 h treatment, it is possible to observe a significant cytotoxicity from the concentration of 50 μM in the three-cell line tested (Fig. 6D-F), although for the tumor cell line this cytotoxicity seems to be higher, which is reflected by the IC₅₀ values of 160.92 μM, 174.19 μM and 379.74 μM for U87, T98 and MRC5 cell lines, respectively. Molecule 1b showed significant cytotoxicity only at the concentration of 500 μM (Fig. 7), except for the U87 cell line after 72 h of treatment, which the cytotoxicity is significant from the concentration of 100 μM (Fig. 7F). The IC₅₀ values (calculated or extrapolated) after 72 h treatment were 237.53 μM, 432.37 μM and 828.11 μM for U87, T98 and MRC5 cell lines, respectively. The same profile was observed for molecule 1c, although no test concentration has significantly induced cytotoxicity (Fig. 8). Molecules 1a and b have a very similar structure, differing in the S and O substituents in the X position (between 1a and 1b molecules). There is a difference in ester and ketone functional groups (between molecules 1b and 1c). The results indicate that the presence of sulfur atom in the X position probably makes the 1a molecule more cytotoxic, because the sulfur atom increases the nucleophilicity of the molecule and this compound is an analogue of monastrol, sulfur thus establishes a fundamental role for biological activity. Among the compounds tested, it was observed that they contained sulfur or greater reduction in cell viability than those that contained oxygen, while a difference between the functional groups showed that the ester group is more cytotoxic than the ketone groups.

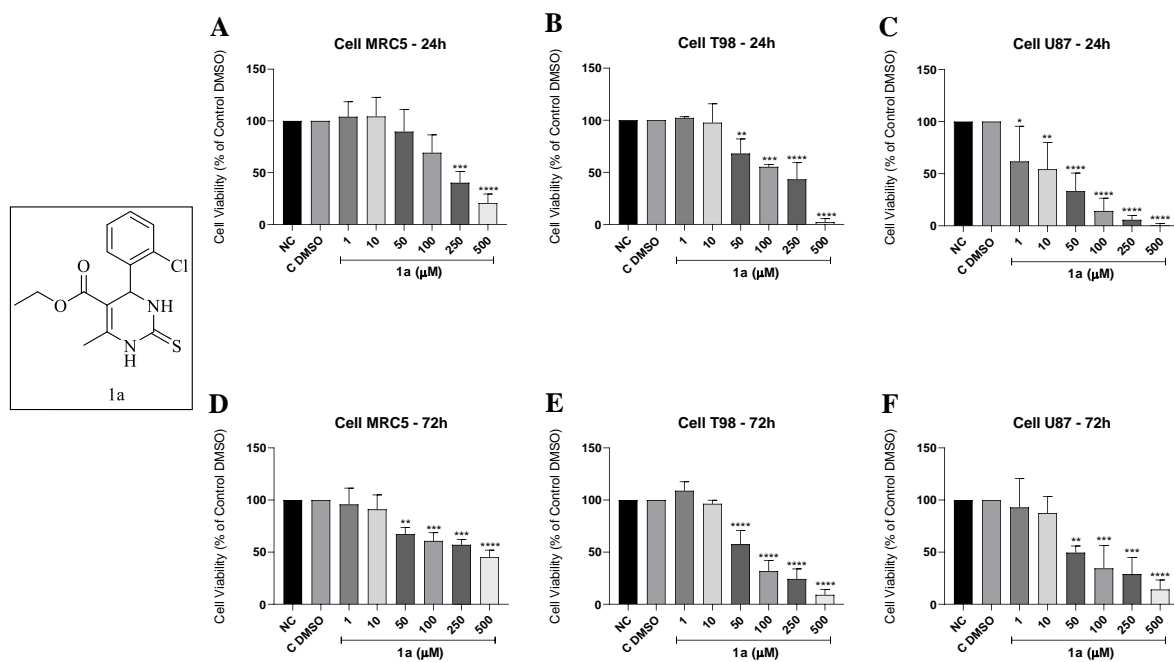


Fig. 6. Cytotoxic effects of pyrimidine **1a** on MRC5, T98 and U87 cells after 24 h (A, B and C) and 72 h (D, E and F), respectively, by the Neutral Red Uptake assay. The results are represented as average percentage in cells treated with the **1a** molecule compared to cells treated with DMSO (C DMSO). The experiments were made in triplicate. Data were expressed in mean \pm SEM (one-way ANOVA, followed by Dunnett's multiple comparisons test). * Significant difference comparing each concentration to the control treatment with DMSO at $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

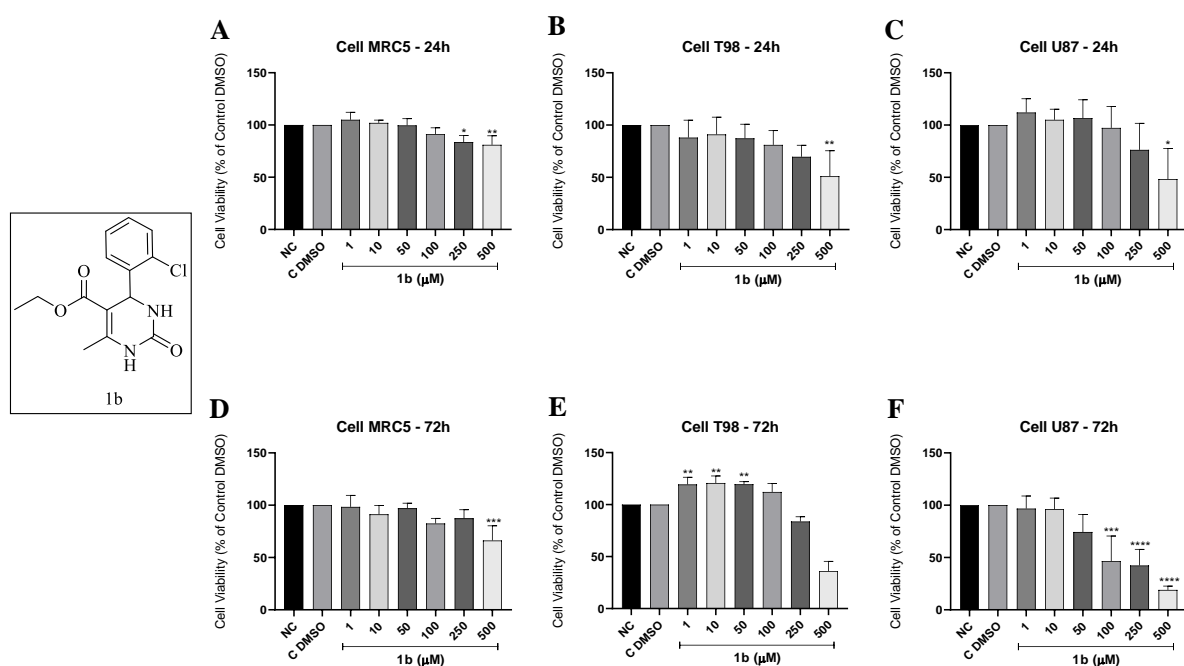


Fig. 7. Cytotoxic effects of pyrimidine **1b** on MRC5, T98 and U87 cells after 24 h (A, B and C) and 72 h (D,

E and F), respectively, by the Neutral Red Uptake assay. The results are represented as average percentage in cells treated with the 1b molecule compared to cells treated with DMSO (C DMSO). The experiments were made in triplicate. Data were expressed in mean \pm SEM (one-way ANOVA, followed by Dunnett's multiple comparisons test). * Significant difference comparing each concentration to the control treatment with DMSO at $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

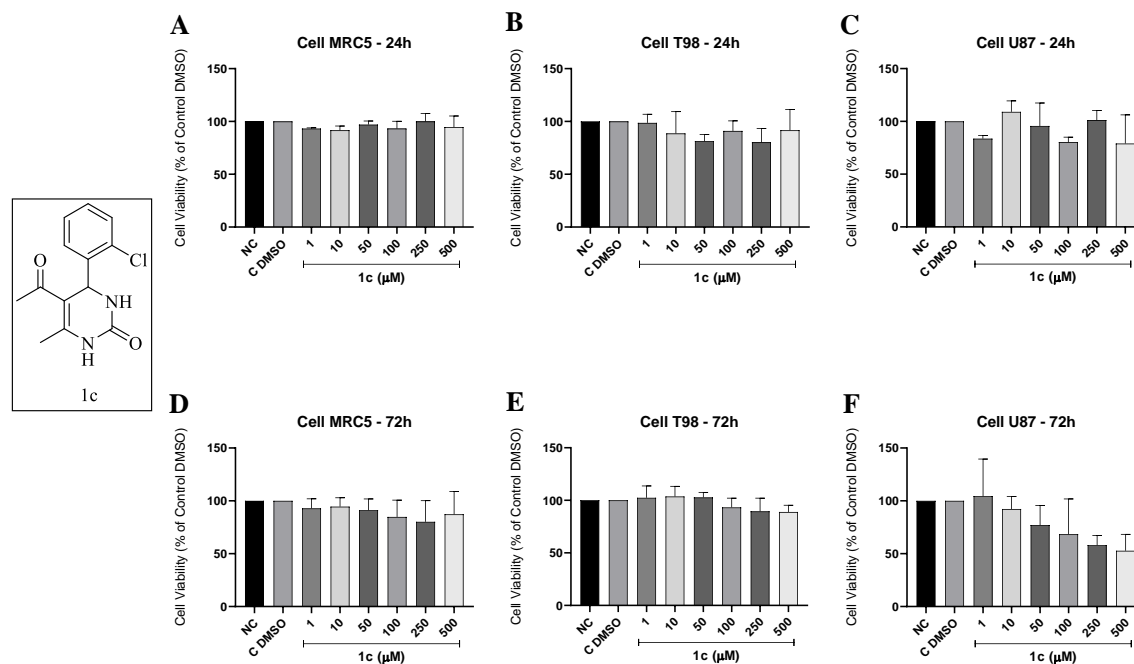


Fig. 8. Cytotoxic effects of pyrimidine **1c** on MRC5, T98 and U87 cells after 24 h (A, B and C) and 72 h (D, E and F), respectively, by the Neutral Red Uptake assay. The results are represented as average percentage in cells treated with e 1c molecule compared to cells treated with DMSO (C DMSO). The experiments were made in triplicate. Data were expressed in mean \pm SEM (one-way ANOVA, followed by Dunnett's multiple comparisons test). * Significant difference comparing each concentration to the control treatment with DMSO at $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

The cytotoxicity of the 1d molecule, which has an aromatic trifluoromethyl group, after 24h exposure of treatment showed a well-marked cytotoxicity for the U87 tumor cell line from the concentration of 250 μM (Fig. 9C). The cytotoxicity in the T98 cell line occurs from a concentration of 500 μM (Fig. 9B), while in the cell line MRC5 it is possible to observe a cytotoxicity in concentrations from 250 μM (Fig. 9A). The IC_{50} s of molecule 1d were 448.59 μM , 361.20 μM and 996.48 μM for the U87, T98 and MRC5 cell lines, respectively. After 72 h of treatment, significant cytotoxicity was observed from the concentration of 50 μM in the U87 cell line (Fig. 9F), and a cytotoxicity from the concentration of 100 μM was observed for the tumor cell line T98 and the non-tumor cell line MRC5 (Fig. 9D-E). Compound 1g also has the trifluoromethyl aromatic group but differs from the previous compound by the presence of the methoxyl group in the position of its aldehyde. As

a result, in the 24h of treatment, this compound is cytotoxic only for the T98 cell line at the highest concentration (500 μM) (Fig. 12B). In the 72h treatment, it showed cytotoxicity from a concentration of 100 μM for U87 and MRC5 cell lines (Fig. 12D and F). The IC_{50} values (calculated or extrapolated) after 72 h treatment were 629.97 μM , 2623.77 μM and 835.20 μM for U87, T98 and MRC5 cell lines, respectively. Comparing the revealed results of cytotoxicity between compounds 1d and 1g, it was observed that the presence of the methoxyl group made the molecule less cytotoxic.

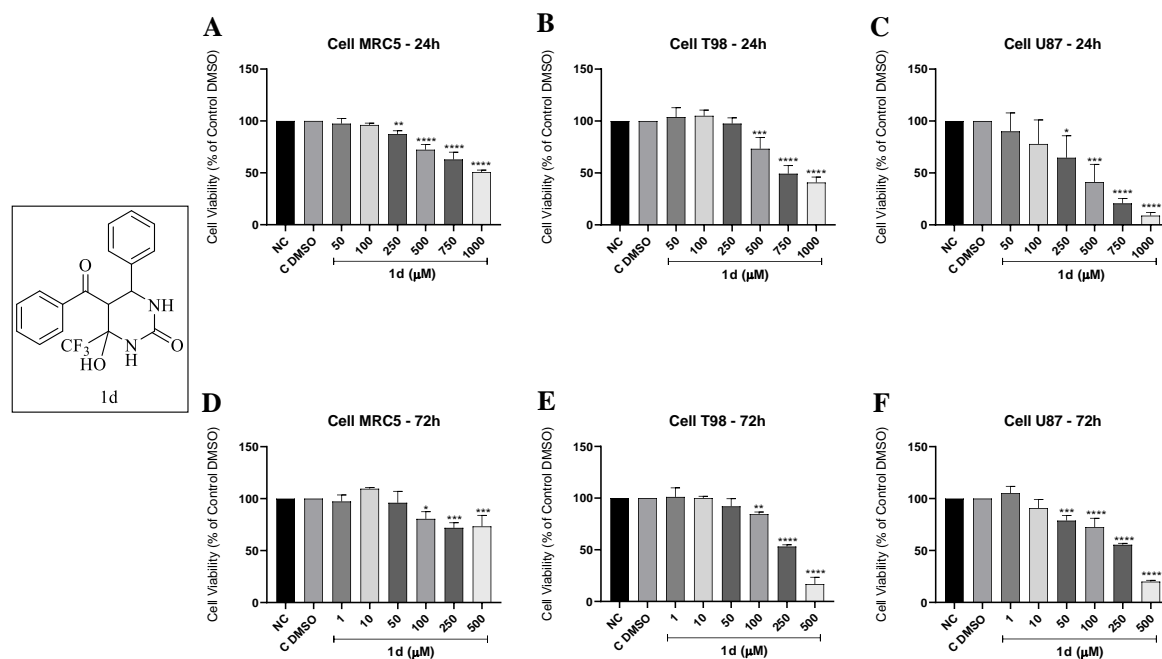


Fig. 9. Cytotoxic effects of pyrimidine **1d** on MRC5, T98 and U87 cells after 24 h (A, B and C) and 72 h (D, E and F), respectively, by the Neutral Red Uptake assay. The results are represented as average percentage in cells treated with the 1d molecule compared to cells treated with DMSO (C DMSO). The experiments were made in triplicate. Data were expressed in mean \pm SEM (one-way ANOVA, followed by Dunnett's multiple comparisons test). * Significant difference comparing each concentration to the control treatment with DMSO at $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

Compound 1e after 24h of treatment showed cytotoxicity for the MRC5 cell line only at the highest concentration of 500 μM (Fig. 10A), however for the tumor cell lines T98 and U87 from the concentration of 250 μM (Fig. 10B-C). The IC_{50} s of molecule 1e were 326.30 μM , 484.66 μM and 466.19 μM for the U87, T98 and MRC5 cell lines, respectively. After 72 h of treatment, the same cytotoxicity behavior was observed for the T98 line (Fig. 10E). Differently for the U87 line, which showed cytotoxicity from the first tested concentration of 1 μM (Fig. 10F). The IC_{50} values (calculated or extrapolated) of 184.27 μM , 311.42 μM and 2311.31 μM for cell lines U87, T98 and MRC5, respectively. Compound 1f showed significant cytotoxicity only at the 500 μM concentration (Fig. 11C and F) for the U87 cell line at both treatment times. The difference between the substituents of the aromatic aldehyde groups significantly changes the cytotoxicity of the compounds against the cell lines tested. It was observed that the *para*-Cl substituent (between molecules 1e

and 1f) was more cytotoxic than the methoxyl substituent at the same position. The *orto* (1b) and *para* (1e) positions of chlorine do not significantly contribute to tumor cell lines U87 and T98 after 24h of exposure. However, after 72h of exposure there was an increase in cytotoxicity against the same cell lines. The compound 1e (p-Cl position) had a lower IC₅₀ when compared to 1b. This difference may be associated with the difference in polarity that these positions cause in the molecules.

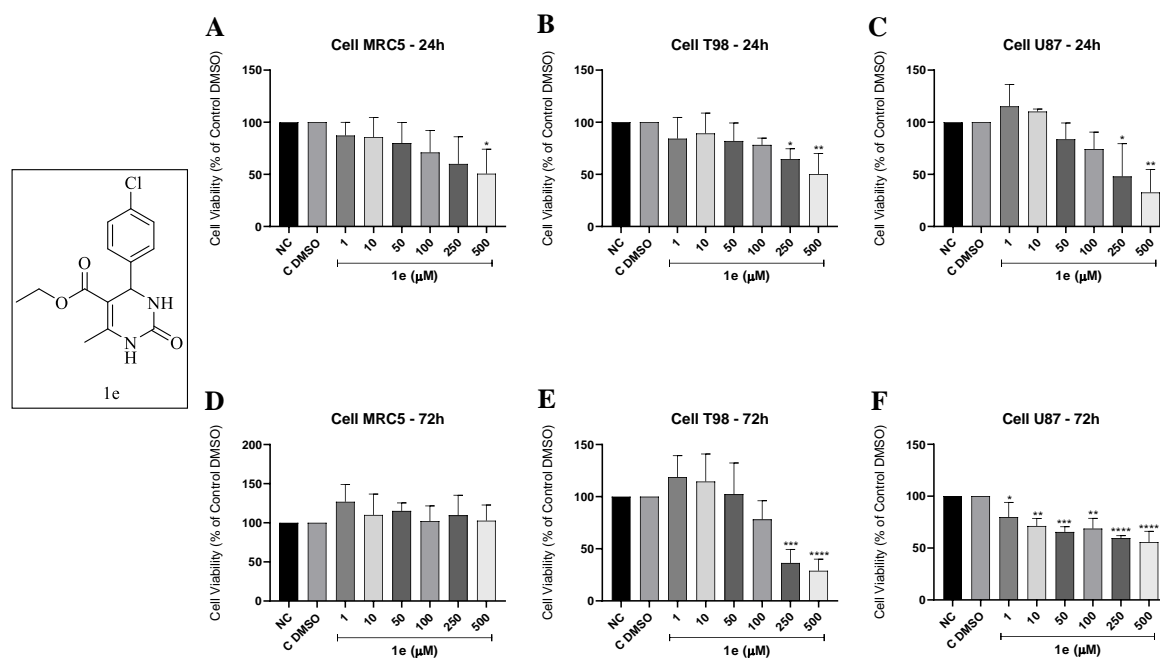


Fig. 10. Cytotoxic effects of pyrimidine **1e** on MRC5, T98 and U87 cells after 24 h (A, B and C) and 72 h (D, E and F), respectively, by the Neutral Red Uptake assay. The results are represented as average percentage in cells treated with the 1e molecule compared to cells treated with DMSO (C DMSO). The experiments were made in triplicate. Data were expressed in mean \pm SEM (one-way ANOVA, followed by Dunnett's multiple comparisons test). * Significant difference comparing each concentration to the control treatment with DMSO at $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

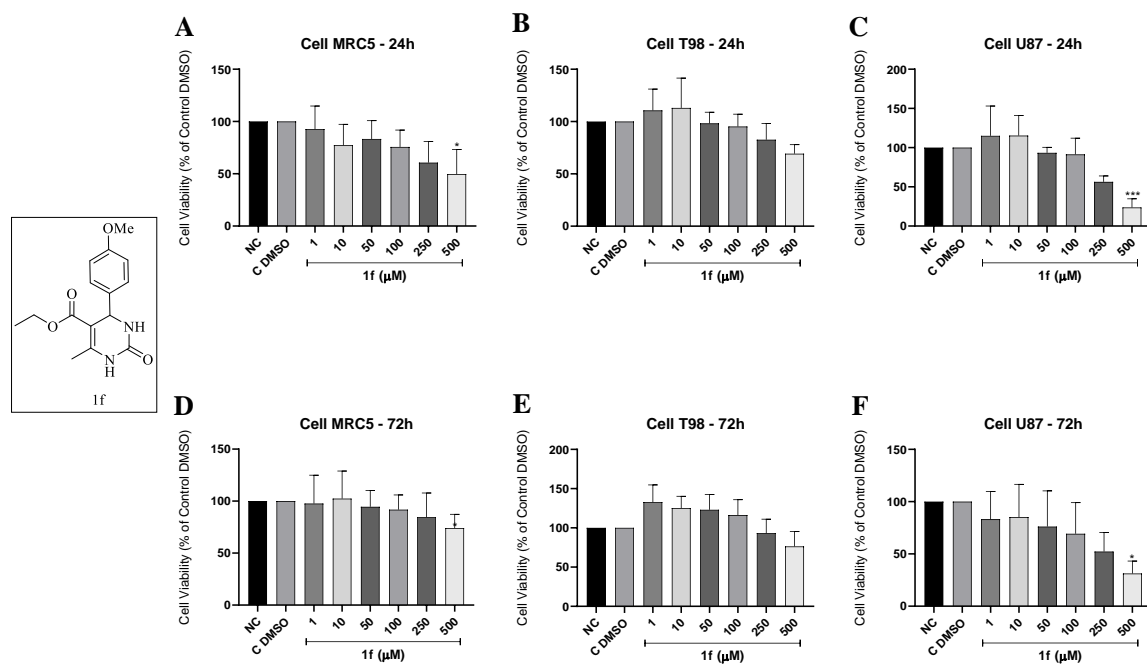


Fig. 11. Cytotoxic effects of pyrimidine **1f** on MRC5, T98 and U87 cells after 24 h (A, B and C) and 72 h (D, E and F), respectively, by the Neutral Red Uptake assay. The results are represented as average percentage in cells treated with the 1f molecule compared to cells treated with DMSO (C DMSO). The experiments were made in triplicate. Data were expressed in mean \pm SEM (one-way ANOVA, followed by Dunnett's multiple comparisons test). * Significant difference comparing each concentration to the control treatment with DMSO at $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

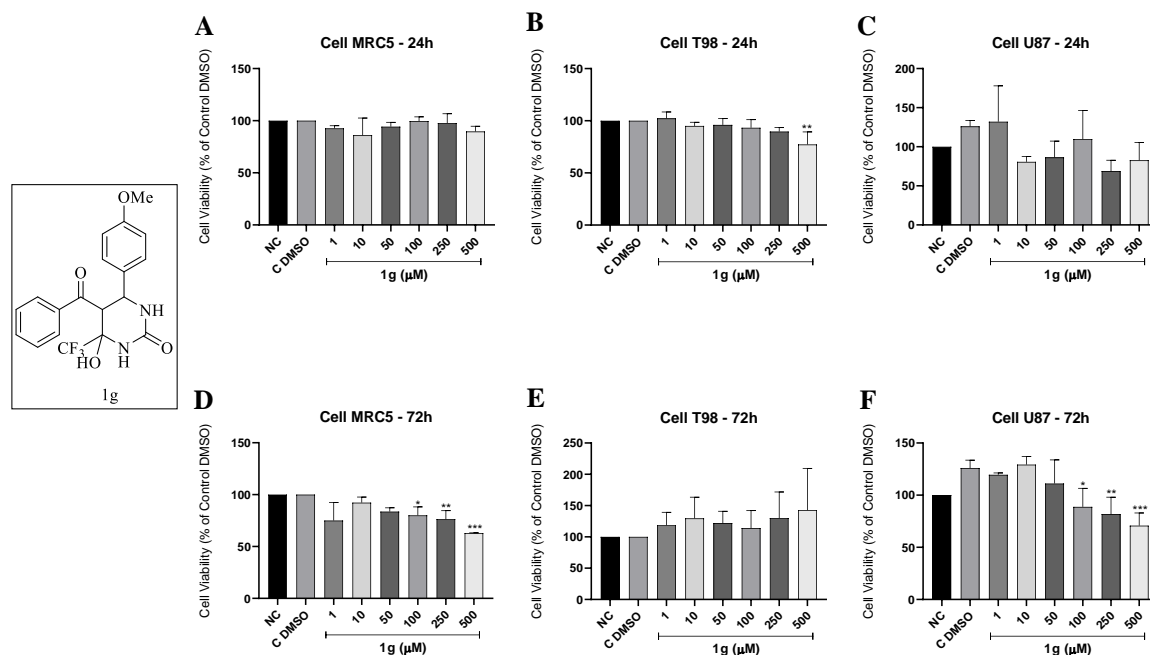


Fig. 12. Cytotoxic effects of pyrimidine **1g** on MRC5, T98 and U87 cells after 24 h (A, B and C) and 72 h (D, E and F), respectively, by the Neutral Red Uptake assay. The results are represented as average percentage in cells treated with the 1g molecule compared to cells treated with DMSO (C DMSO). The experiments were made in triplicate. Data were expressed in mean \pm SEM (one-way ANOVA, followed by Dunnett's multiple comparisons test). * Significant difference comparing each concentration to the control treatment with DMSO at $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

In the 24h treatment, compound **1h** showed a well-marked cytotoxicity for the cell line MRC5 from the concentration of 10 μM (Fig. 13A). The cell line U87 the cytotoxicity was only at the highest concentrations tested (250 and 500 μM) (Fig. 13C). The IC₅₀s of molecule **1h** were 489.65 μM , 1051.11 μM and 249.24 μM for the U87, T98 and MRC5 cell lines, respectively. After 72h of treatment all cell lines tested had cytotoxicity at the highest concentrations. For MRC5 at the highest concentration (500 μM) (Fig. 13D) and for U87 at concentrations of 250 and 500 μM (Fig. 13F), is more significant for the T98 cell line, which was from the concentration of 50 μM (Fig. 13E). The IC₅₀s of molecule **1h** at this exposure time were 635.84 μM , 401.67 μM and 507.40 μM for the U87, T98 and MRC5 cell lines, respectively. The presence of the trifluoromethyl group at the appropriate R3 position significantly increased the cytotoxicity of the compound against the cell line MRC5. Comparing the similarity between compounds **1c** and **1h**, it was observed that the presence of the fluorine atoms made the molecule more cytotoxic than the chlorine atom.

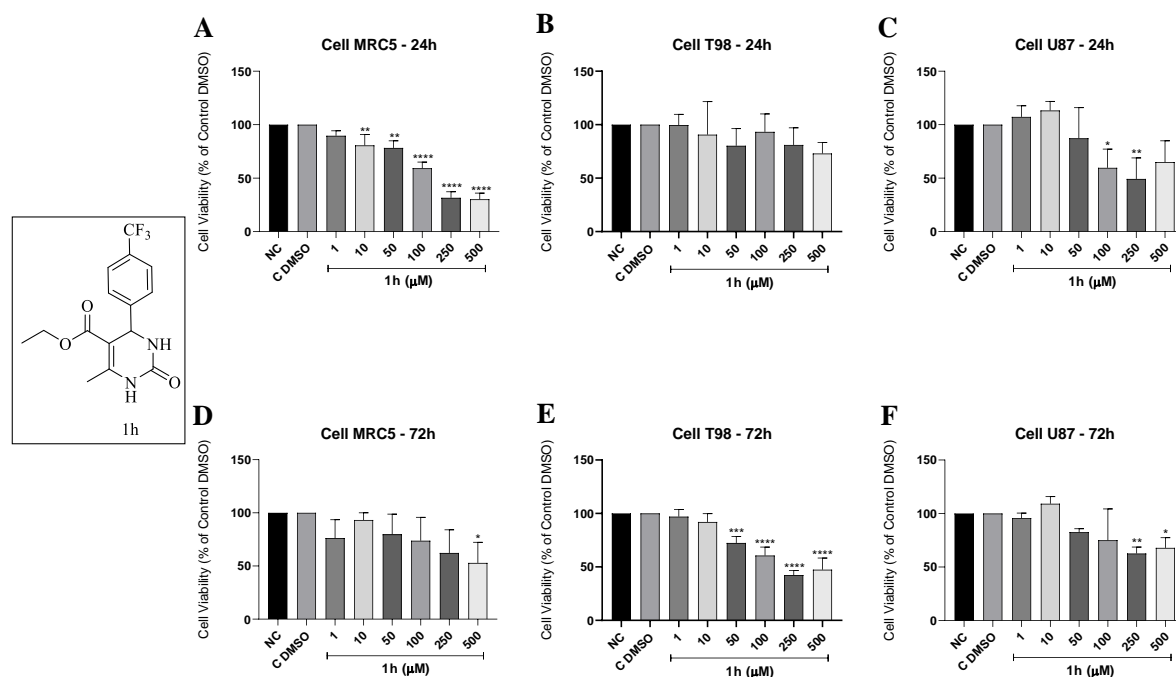


Fig. 13. Cytotoxic effects of pyrimidine **1h** on MRC5, T98 and U87 cells after 24 h (A, B and C) and 72 h (D, E and F), respectively, by the Neutral Red Uptake assay. The results are represented as average percentage in cells treated with the **1h** molecule compared to cells treated with DMSO (C DMSO). The experiments were made in triplicate. Data were expressed in mean \pm SEM (one-way ANOVA, followed by Dunnett's multiple comparisons test). * Significant difference comparing each concentration to the control treatment with DMSO at $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

In general, the cytotoxicity profile of the compounds showed different results for the three cell lines tested, which can be confirmed through the IC_{50} calculated at the 24h and 72nd exposure times. In order to assess the selectivity index (SI) of compounds for tumor cell lines U87 and T98, evaluated for cytotoxicity in non-tumor cell line MRC5, where the results were calculated based on the IC_{50} between cells. SI proportions between 3 and 6 refer to moderate selectivity, and proportions greater than six indicate high selectivity and compounds smaller than 3 do not show selectivity (table 2).

Compound 1a showed high selectivity for the cell line U87 (ratio of 6.37) in the treatment of 24h. Compound 1b moderate selectivity only at U87 in 24h (ratio of 3.49). Compound 1c moderate selectivity for U87 at both the treatment times 24h and 72h, respectively (ratio of 4.48 and 5.97). Compounds 1d, 1g and 1h did not show selectivity. Compound 1e showed high selectivity for cell lines U87 and T98 (ratio of 12.54 and 7.42, respectively), in 72h. Compound 1f showed moderate selectivity (ratio of 3.11) to U87 after 72h. If we consider the results as a whole, the most promising candidates are 1a and 1e.

	<i>1a</i>	<i>1b</i>	<i>1c</i>	<i>1d</i>	<i>1e</i>	<i>1f</i>	<i>1g</i>	<i>1h</i>
<i>MRC5 24 h</i>	276,60	1083,19	8340,0	996,48	466,19	464,09	1086,35	249,24
<i>MRC5 72 h</i>	379,74	828,11	2669,54	767,19	2311,31	947,79	835,20	507,40
<i>T98 24 h</i>	214,99 ^{1,28}	508,02 ^{2,13}	11184,0 ^{0,74}	361,20 ^{2,76}	484,66 ^{0,96}	695,16 ^{0,67}	1165,83 ^{0,93}	1051,11 ^{0,24}
<i>T98 72 h</i>	174,19 ^{2,18}	432,37 ^{1,91}	1681,37 ^{1,59}	295,05 ^{2,60}	311,42 ^{7,42}	707,17 ^{1,34}	2623,77 ^{0,32}	401,67 ^{1,26}
<i>U87 24 h</i>	43,47 ^{6,37}	479,14 ^{2,26}	1859,46 ^{4,48}	448,59 ^{2,22}	326,30 ^{1,43}	329,39 ^{1,41}	936,77 ^{1,16}	489,65 ^{0,51}
<i>U87 72 h</i>	160,92 ^{2,36}	237,53 ^{3,49}	446,89 ^{5,97}	287,88 ^{2,66}	184,27 ^{12,54}	304,32 ^{3,11}	629,97 ^{1,32}	635,84 ^{0,80}

Table 2. Highlighted the values of the selectivity index calculated in relation to the MRC5 cell line.

Although the results presented in this work are in their initial phase, it can be observed that the most active compound *in vitro* assays was the sulfur analogue (1a), presenting significant cytotoxicity in relation to tumor cell lines, especially with U87 after 24h of treatment. Considering this, in order to understand the mechanism of cytotoxicity induced by compound 1a, we evaluated the type of cell death. The cytometry analysis was conducted using annexin V-PE and 7-AAD, which were used to distinguish viable, apoptotic and death. The results showed that after 24 h of treatment remarkable decrease was observed in the viable cells population in the concentration 25 μM compared with the DMSO control cells (Fig. 14), with the conclusion that compound 1a led U87 cells preferentially to death by necrosis.

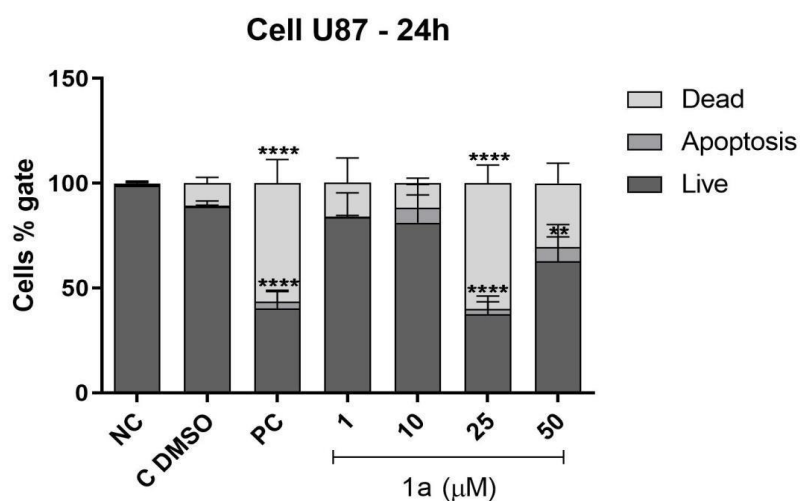


Fig. 14. Compound 1a treatment induces apoptosis in U87 cell after 24h. Results are expressed as mean in treated cells compared to control and DMSO \pm SD groups. Temozolamide was used as positive control (PC) (200 μM). Data were analyzed by one-way analysis of variance ANOVA, and means were compared using Tukey post-test, with $P \leq 0,005$ considered as statistically significant.

4. CONCLUSION

Heterocyclic compounds have been widely studied in the chemical and biological fields. Its wide pharmacological activity has become a significant source of studies. In view of the difficulty in treating gliomas, the search for new inhibitor(s) derived from DHPMs, aiming at the Nek1 protein, using computational tools, brought a new perspective. The use of computational tools to identify new drug candidates provided substantial information on molecular recognition in the formation of the receptor-ligand complex.

Although 8 synthesized molecules showed similar results in silico simulations, the in vitro results showed that the molecules have different cytotoxicity profiles. One of the hypotheses may be associated with different mechanisms other than the inhibition of Nek1 protein, as well as the concentrations and times evaluated. But interestingly, compound 1a showed cytotoxicity and selectivity for tumor line U87 after 24 h of treatment, and this cytotoxicity seems to be associated with the presence of sulfur in its structure. Further studies are needed to understand the cytotoxicity induced by this 1a molecule, including experimental confirmation of inhibition of the Nek1 protein.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Rio Grande do Sul Research Support Foundation (FAPERGS).

REFERENCES

- [1] R. Kaur, S. Chaudhary, K. Kumar, M. K. Gupta, and R. K. Rawal, "Recent synthetic and medicinal perspectives of dihydropyrimidinones: A review," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 132, pp. 108–134, 2017, doi: 10.1016/j.ejmech.2017.03.025.
- [2] C. O. Kappe, "Biologically active dihydropyrimidones of the Biginelli-type - A literature survey," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 35, no. 12, pp. 1043–1052, 2000, doi: 10.1016/S0223-5234(00)01189-2.
- [3] D. Russowsky, F. A. Lopes, V. S. S. Da Silva, K. F. S. Canto, M. G. Montes D'Oca, and M. N. Godoi, "Multicomponent Biginelli's synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones promoted by SnCl₂·2H₂O," *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 15, no. 2, pp. 165–169, 2004, doi: 10.1590/S0103-50532004000200002.
- [4] C. Cimarelli, "Multicomponent reactions," *Molecules*, vol. 24, no. 13, pp. 4–5, 2019, doi: 10.3390/molecules24132372.
- [5] S. Shamim *et al.*, "5-Acetyl-6-methyl-4-aryl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones: As potent urease inhibitors; synthesis, in vitro screening, and molecular modeling study," *Bioorg. Chem.*, vol. 76, pp. 37–52, 2018, doi: 10.1016/j.bioorg.2017.10.021.
- [6] D. Russowsky *et al.*, "Synthesis and differential antiproliferative activity of Biginelli compounds against cancer cell lines: Monastrol, oxo-monastrol and oxygenated analogues," *Bioorg. Chem.*, vol. 34, no. 4, pp. 173–182, 2006, doi: 10.1016/j.bioorg.2006.04.003.
- [7] M. M. Heravi, S. Asadi, and B. M. Lashkariani, "Recent progress in asymmetric Biginelli reaction,"

- Mol. Divers.*, vol. 17, no. 2, pp. 389–407, 2013, doi: 10.1007/s11030-013-9439-9.
- [8] A. M. A. Shumaila and A. A. N. Al-Thulaia, “Mini-review on the synthesis of Biginelli analogs using greener heterogeneous catalysis: Recent strategies with the support or direct catalyzing of inorganic catalysts,” *Synth. Commun.*, vol. 49, no. 13, pp. 1613–1632, 2019, doi: 10.1080/00397911.2018.1536789.
- [9] J. D. Schiffman, P. G. Fisher, and P. Gibbs, “Early Detection of Cancer : Past , Present , and Future INTRODUCTION TO CANCER SCREENING AND,” *ASCO Educ. B.*, 2015.
- [10] L. Guntuku, V. G. M. Naidu, and V. Ganesh Yerra, “Mitochondrial Dysfunction in Gliomas: Pharmacotherapeutic Potential of Natural Compounds,” *Curr. Neuropharmacol.*, vol. 14, no. 6, pp. 567–583, 2016, doi: 10.2174/1570159x14666160121115641.
- [11] S. Aftab *et al.*, “Nanomedicine: An effective tool in cancer therapy,” *Int. J. Pharm.*, vol. 540, no. 1–2, pp. 132–149, 2018, doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.02.007.
- [12] S. Y. Qin, A. Q. Zhang, S. X. Cheng, L. Rong, and X. Z. Zhang, “Drug self-delivery systems for cancer therapy,” *Biomaterials*, vol. 112, pp. 234–247, 2017, doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.10.016.
- [13] J. H. Doroshow, “Overcoming Resistance to Targeted Anticancer Drugs,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 369, no. 19, pp. 1852–1853, 2013, doi: 10.1056/nejme1311325.
- [14] L. E. Donovan and A. B. Lassman, “Chemotherapy Treatment and Trials in Low-Grade Gliomas,” *Neurosurg. Clin. N. Am.*, vol. 30, no. 1, pp. 103–109, 2019, doi: 10.1016/j.nec.2018.08.007.
- [15] N. A. O. Bush, S. M. Chang, and M. S. Berger, “Current and future strategies for treatment of glioma,” *Neurosurg. Rev.*, vol. 40, no. 1, 2017, doi: 10.1007/s10143-016-0709-8.
- [16] D. R. Vianna *et al.*, “Selective cytotoxicity and apoptosis induction in glioma cell lines by 5-oxygenated-6,7-methylenedioxy coumarins from *Pterocaulon* species,” *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 57, pp. 268–274, 2012, doi: 10.1016/j.ejmech.2012.09.007.
- [17] M. J. Ramalho *et al.*, “Receptor-mediated PLGA nanoparticles for glioblastoma multiforme treatment,” *Int. J. Pharm.*, vol. 545, no. 1–2, pp. 84–92, 2018, doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.04.062.
- [18] E. Le Rhun *et al.*, “Molecular targeted therapy of glioblastoma,” *Cancer Treatment Reviews*, vol. 80, 2019, doi: 10.1016/j.ctrv.2019.101896.
- [19] J. Zhu, Y. Cai, P. Liu, and W. Zhao, “Frequent Nek1 overexpression in human gliomas,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 476, no. 4, pp. 522–527, 2016, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.05.156.
- [20] T. D. Melo-Hanchuk *et al.*, “NEK1 kinase domain structure and its dynamic protein interactome after exposure to Cisplatin,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–13, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-05325-w.
- [21] A. P. de Oliveira *et al.*, “Checking neks: Overcoming a bottleneck in human diseases,” *Molecules*, vol. 25, no. 8, pp. 1–32, 2020, doi: 10.3390/molecules25081778.
- [22] G. V. Meirelles *et al.*, “‘Stop Ne(c)king around’: How interactomics contributes to functionally characterize Nek family kinases,” *World J. Biol. Chem.*, vol. 5, no. 2, pp. 141–60, 2014, doi: 10.4331/wjbc.v5.i2.141.
- [23] F. Melo and A. Sali, “Fold assessment for comparative protein structure modeling,” *Protein Sci.*, vol. 16, no. 11, pp. 2412–2426, 2007, doi: 10.1110/ps.072895107.
- [24] R. A. Laskowski, “PDBsum: Summaries and analyses of PDB structures,” *Nucleic Acids Res.*, vol.

- 29, no. 1, pp. 221–222, 2001, doi: 10.1093/nar/29.1.221.
- [25] J. U. Bowie, R. Lüthy, and D. Eisenberg, “A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure,” *Science (80-.)*, vol. 253, no. 5016, pp. 164–170, 1991, doi: 10.1126/science.1853201.
- [26] V. B. Chen *et al.*, “MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography,” *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. 66, no. 1, pp. 12–21, 2010, doi: 10.1107/S0907444909042073.
- [27] W. L. DeLano, “Pymol: An open-source molecular graphics tool,” *CCP4 Newsl. protein Crystallogr.*, vol. 40, pp. 82–92, 2002, [Online]. Available: http://www.ccp4.ac.uk/newsletters/newsletter40/11_pymol.pdf.
- [28] K. B. Koziara, M. Stroet, A. K. Malde, and A. E. Mark, “Testing and validation of the Automated Topology Builder (ATB) version 2.0: Prediction of hydration free enthalpies,” *J. Comput. Aided. Mol. Des.*, vol. 28, no. 3, pp. 221–233, 2014, doi: 10.1007/s10822-014-9713-7.
- [29] T. Sander, J. Freyss, M. Von Korff, and C. Rufener, “DataWarrior: An open-source program for chemistry aware data visualization and analysis,” *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 55, no. 2, pp. 460–473, 2015, doi: 10.1021/ci500588j.
- [30] D. S. Wishart *et al.*, “DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 34, no. Database issue, pp. 668–672, 2006, doi: 10.1093/nar/gkj067.
- [31] O. Trott and A. J. Olson, “AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading,” *J. Comput. Chem.*, vol. 31, no. 2, p. NA-NA, 2009, doi: 10.1002/jcc.21334.
- [32] E. Ibáñez *et al.*, “Synthesis and antiproliferative activity of novel symmetrical alkylthio- and alkylseleno-imidocarbamates,” *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 46, no. 1, pp. 265–274, 2011, doi: 10.1016/j.ejmech.2010.11.013.
- [33] F. Sievers *et al.*, “Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega,” *Mol. Syst. Biol.*, vol. 7, no. 539, 2011, doi: 10.1038/msb.2011.75.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O glioblastoma é uma das doenças mais complexas e seu tratamento muitas vezes não é efetivo. Diante disto, esforços vêm sendo realizados para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos no combate a este tipo de câncer, onde sua incidência vem aumentando consideravelmente a mortalidade. Além da escassez de fármacos, estes apresentam um alto custo, dificultando a disponibilidade deste no tratamento aos pacientes. Por outro lado, deve-se considerar que, muitas vezes os tumores apresentam resistência aos fármacos e efeitos colaterais advindos da administração dessas drogas. Na busca por novos alvos terapêuticos para glioblastoma, a proteína Nek1 parece ser bastante promissora, visto que está super expressa nesses tumores. Pesquisadores já realizaram testes com inibidores comerciais, mas há um caminho longo a percorrer, pois os resultados ainda são preliminares. O presente estudo teve por objetivo a busca por novos inibidores derivados de DHPMs, baseando-se nesses inibidores comerciais que já foram testados, visando a proteína Nek1, por meio de ferramentas computacionais. Fato este, devido à dificuldade no tratamento de glioblastomas e a superexpressão desta proteína neste tipo de câncer, cuja taxa de sobrevida é tão reduzida. Neste estudo, utilizamos de ferramentas computacionais para identificar os possíveis novos candidatos a inibidores de Nek1. Um novo modelo estrutural 3D da proteína Nek1 foi construído, pois as que estavam depositadas nos bancos de dados encontravam-se com problemas em sua resolução. A partir desta estrutura completa realizamos o docking molecular juntamente com as moléculas propostas de dihidropirimidinonas, avaliando assim o possível perfil terapêutico e as propriedades ADME-Tox destes compostos frente a proteína.

Um total de oito DHPMs foram sintetizadas através da metodologia de Biginelli, purificadas e caracterizadas por ponto de fusão e RMN de C e H. Estas moléculas se mantiveram em ambiente estável à temperatura ambiente, luz e ar e com boa pureza. Visando analisar a atividade citotóxica destes compostos foi observado que o composto 1a apresentou uma citotoxicidade maior na linhagem tumoral U87 após 24h de tratamento, confirmando-se com os valores calculados de IC₅₀ e seletividade. Com base neste resultado e por ser um composto análogo

ao monastrol, poderíamos explicar a atividade biológica do composto 1a e por esta diminuição da viabilidade celular avaliamos o tipo de morte que o mesmo causava na linhagem U87. Observou-se que o composto induz morte celular e apresenta potencial como inibidor da proteína Nek1.

Estes resultados ainda precisam ser melhor investigados e confirmados, pois muitos aspectos precisam ser compreendidos como, entender o mecanismo de ação do composto e o microambiente em questão. Desenvolver um novo protocolo para a síntese das DHPMs seria interessante, pois seria possível melhorar rendimento e propriedades físicas destas moléculas, como solubilidade, lipofilicidade. Além disso, a diversidade química permite a funcionalização destas moléculas a fim de melhorar sua atividade biológica. Outro aspecto que pode ser trabalhado é a maneira como esse possível candidato a inibidor realiza sua entrega no tumor, o uso de um drug-delivery poderia otimizar os resultados.

5. PERSPECTIVAS

São perspectivas para a continuidade deste trabalho:

- ✓ Alterações na metodologia a fim de encontrar melhores rendimentos de reação.
- ✓ Modificações na estrutura do composto 1a a fim de melhorar otimizar a atividade biológica.
- ✓ Síntese de novos compostos utilizando tioureia visto que os resultados com a avaliação da inibição molécula que contém enxofre foi satisfatório e avaliação *in vitro*.
- ✓ Avaliação do inibidor em células com a proteína Nek1 superexpressa.
- ✓ Avaliação da contribuição desse inibidor na resposta ao cotratamento de TMZ e radiação.
- ✓ Desenvolvimento de um *drug delivery system* para o inibidor.
- ✓ Investigação do potencial terapêutico dos inibidores *in vivo*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adigun, R. A., Malan, F. P., Balogun, M. O., & October, N. (2020). Tetrahydropyrimidinones/thiones stabilized by trifluoromethyl-containing β -diketones. *Journal of Molecular Structure*, 1202, 127281.
- Aftab, S., Shah, A., Nadhman, A., Kurbanoglu, S., Ozkan, S. A., Dionysiou, D. D., Shukla, S. S., & Aminabhavi, T. M. (2018). Nanomedicine: An effective tool in cancer therapy. *International journal of pharmaceutics*, 540(1-2), 132-149.
- Alifieris, C., & Trafalis, D. T. (2015). Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacology & therapeutics*, 152, 63-82.
- An, D., Fan, Y. S., Gao, Y., Zhu, Z. Q., Zheng, L. Y., & Zhang, S. Q. (2014). Highly enantioselective Biginelli reaction catalyzed by double axially chiral bisphosphorylimides. *European Journal of Organic Chemistry*, 2014(2), 301-306.
- Brandes, A. A. (2005). Adding temozolomide to radiotherapy prolongs survival in people with glioblastoma. *Cancer Treatment Reviews*, 7(31), 577-581.
- Bush, N. A. O., Chang, S. M., & Berger, M. S. (2017). Current and future strategies for treatment of glioma. *Neurosurgical review*, 40(1), 1-14.
- Chen, Y.-J., Xiang, Y., He, Y.-H., & Guan, Z. (2019). Anti-selective direct asymmetric Mannich reaction catalyzed by protease. *Tetrahedron Letters*, 60(15), 1066-1071.
- Cimarelli, C. (2019). Multicomponent Reactions. In: Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- Das, D., Richers, M. T., Ma, L., & Seidel, D. (2011). The decarboxylative strecker reaction. *Organic letters*, 13(24), 6584-6587.
- de Fatima, A. n., Braga, T. C., Neto, L. d. S., Terra, B. S., Oliveira, B. G., da Silva, D. L., & Modolo, L. V. (2015). A mini-review on Biginelli adducts with notable pharmacological properties. *Journal of advanced research*, 6(3), 363-373.
- Donovan, L. E., & Lassman, A. B. (2019). Chemotherapy treatment and trials in low-grade gliomas. *Neurosurgery Clinics*, 30(1), 103-109.
- Doroshov, J. H. (2013). Overcoming resistance to targeted anticancer drugs. *N Engl J Med*, 369(19), 1852-1853.
- Farooq, S., Alharthi, F. A., Alsalmeh, A., Hussain, A., Dar, B. A., Hamid, A., & Koul, S. (2020). Dihydropyrimidinones: efficient one-pot green synthesis using Montmorillonite-KSF and evaluation of their cytotoxic activity. *RSC Advances*, 10(69), 42221-42234.

Freund, I., Hehlhans, S., Martin, D., Ensminger, M., Fokas, E., Rödel, C., Löbrich, M., & Rödel, F. (2020). Fractionation-Dependent Radiosensitization by Molecular Targeting of Nek1. *Cells*, *9*(5), 1235.

Fry, A. M., O'Regan, L., Sabir, S. R., & Bayliss, R. (2012). Cell cycle regulation by the NEK family of protein kinases. *Journal of cell science*, *125*(19), 4423-4433.

Guido, R. V., Andricopulo, A. D., & Oliva, G. (2010). Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. *estudos avançados*, *24*(70), 81-98.

Guntuku, L., Naidu, V., & Yerra, V. G. (2016). Mitochondrial dysfunction in gliomas: pharmacotherapeutic potential of natural compounds. *Current neuropharmacology*, *14*(6), 567-583.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, *144*(5), 646-674.

Heravi, M. M., Asadi, S., & Lashkariani, B. M. (2013). Recent progress in asymmetric Biginelli reaction. *Molecular diversity*, *17*(2), 389-407.

Ibáñez, E., Plano, D., Font, M., Calvo, A., Prior, C., Palop, J. A., & Sanmartín, C. (2011). Synthesis and antiproliferative activity of novel symmetrical alkylthio- and alkylseleno-imidocarbamates. *European journal of medicinal chemistry*, *46*(1), 265-274.

Jhaveri, A., Deshpande, P., Pattni, B., & Torchilin, V. (2018). Transferrin-targeted, resveratrol-loaded liposomes for the treatment of glioblastoma. *Journal of Controlled Release*, *277*, 89-101.

Kappe, C. O. (2000). Biologically active dihydropyrimidones of the Biginelli-type—a literature survey. *European journal of medicinal chemistry*, *35*(12), 1043-1052.

Kaur, R., Chaudhary, S., Kumar, K., Gupta, M. K., & Rawal, R. K. (2017). Recent synthetic and medicinal perspectives of dihydropyrimidinones: A review. *European journal of medicinal chemistry*, *132*, 108-134.

Kumarasamy, D., Roy, B. G., Rocha-Pereira, J., Neyts, J., Nanjappan, S., Maity, S., Mookerjee, M., & Naesens, L. (2017). Synthesis and in vitro antiviral evaluation of 4-substituted 3, 4-dihydropyrimidinones. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, *27*(2), 139-142.

Le Rhun, E., Preusser, M., Roth, P., Reardon, D. A., van den Bent, M., Wen, P., Reifenberger, G., & Weller, M. (2019). Molecular targeted therapy of glioblastoma. *Cancer Treatment Reviews*, 101896.

Liu, S., Ho, C. K., Ouyang, J., & Zou, L. (2013). Nek1 kinase associates with ATR–ATRIP and primes ATR for efficient DNA damage signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(6), 2175-2180.

Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., Von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., & Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta neuropathologica*, 131(6), 803-820.

Ma, Y., Qian, C., Wang, L., & Yang, M. (2000). Lanthanide triflate catalyzed Biginelli reaction. One-pot synthesis of dihydropyrimidinones under solvent-free conditions. *The Journal of organic chemistry*, 65(12), 3864-3868.

Marcaccini, S., & Torroba, T. (2005). of the Passerini and Ugi Reactions. *Multicomponent Reactions*, 33.

Matos, L. H. S., Masson, F. T., Simeoni, L. A., & Homem-de-Mello, M. (2018). Biological activity of dihydropyrimidinone (DHPM) derivatives: A systematic review. *European journal of medicinal chemistry*, 143, 1779-1789.

Meirelles, G. V., Perez, A. M., de Souza, E. E., Basei, F. L., Papa, P. F., Hanchuk, T. D. M., Cardoso, V. B., & Kobarg, J. (2014). "Stop Ne (c) king around": How interactomics contributes to functionally characterize Nek family kinases. *World journal of biological chemistry*, 5(2), 141.

Melo-Hanchuk, T. D., Slepicka, P. F., Meirelles, G. V., Basei, F. L., Lovato, D. V., Granato, D. C., Pauletti, B. A., Domingues, R. R., Leme, A. F. P., & Pelegri, A. L. (2017). NEK1 kinase domain structure and its dynamic protein interactome after exposure to Cisplatin. *Scientific reports*, 7(1), 1-13.

Miller, C. R., & Perry, A. (2007). Glioblastoma: morphologic and molecular genetic diversity. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 131(3), 397-406.

Moraes, E. C., Meirelles, G. V., Honorato, R. V., De Souza, T. D. A. C. B., De Souza, E. E., Murakami, M. T., De Oliveira, P. S. L., & Kobarg, J. (2015). Kinase inhibitor profile for human nek1, nek6, and nek7 and analysis of the structural basis for inhibitor specificity. *Molecules*, 20(1), 1176-1191.

Nagarajaiah, H., Mukhopadhyay, A., & Moorthy, J. N. (2016). Biginelli reaction: an overview. *Tetrahedron Letters*, 57(47), 5135-5149.

Ould M'hamed, M., Alshammari, A. G., & Lemine, O. (2016). Green High-Yielding One-Pot Approach to Biginelli Reaction under Catalyst-Free and Solvent-Free Ball Milling Conditions. *Applied Sciences*, 6(12), 431.

O'connell, M. J., Krien, M. J., & Hunter, T. (2003). Never say never. The NIMA-related protein kinases in mitotic control. *Trends in cell biology*, 13(5), 221-228.

Parsons, D. W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J. C.-H., Leary, R. J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I.-M., & Gallia, G. L. (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *science*, 321(5897), 1807-1812.

Pair, E., Levacher, V., & Brière, J.-F. (2015). Modified multicomponent Biginelli–Atwal reaction towards a straightforward construction of 5, 6-dihydropyrimidin-4-ones. *RSC Advances*, 5(57), 46267-46271.

Patil, R. V., Chavan, J. U., Dalal, D. S., Shinde, V. S., & Beldar, A. G. (2019). Biginelli Reaction: Polymer Supported Catalytic Approaches. *ACS combinatorial science*, 21(3), 105-148.

Pelegri, A. L., Moura, D. J., Brenner, B. L., Ledur, P. F., Maques, G. P., Henriques, J. A. P., Saffi, J., & Lenz, G. (2010). Nek1 silencing slows down DNA repair and blocks DNA damage-induced cell cycle arrest. *Mutagenesis*, 25(5), 447-454.

Peres de Oliveira, A., Kazuo Issayama, L., Betim Pavan, I. C., Riback Silva, F., Diniz Melo-Hanchuk, T., Moreira Simabuco, F., & Kobarg, J. (2020). Checking NEKs: Overcoming a Bottleneck in Human Diseases. *Molecules*, 25(8), 1778.

Perry, A., & Wesseling, P. (2016). Histologic classification of gliomas. In *Handbook of clinical neurology* (Vol. 134, pp. 71-95). Elsevier.

Podlewska, S., & Kafel, R. (2018). MetStabOn—Online Platform for Metabolic Stability Predictions. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 1040.

Qin, S.-Y., Zhang, A.-Q., Cheng, S.-X., Rong, L., & Zhang, X.-Z. (2017). Drug self-delivery systems for cancer therapy. *Biomaterials*, 112, 234-247.

Ramalho, M., Sevin, E., Gosselet, F., Lima, J., Coelho, M., Loureiro, J., & Pereira, M. (2018). Receptor-mediated PLGA nanoparticles for glioblastoma multiforme treatment. *International journal of pharmaceutics*, 545(1-2), 84-92.

Rebucci, M., & Michiels, C. (2013). Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. *Biochemical pharmacology*, 85(9), 1219-1226.

Rocha, R. O., Rodrigues, M. O., & Neto, B. A. (2020). Review on the Ugi Multicomponent Reaction Mechanism and the Use of Fluorescent Derivatives as Functional Chromophores. *ACS Omega*.

Rodrigues, R. P., Mantoani, S. P., de Almeida, J. R., Pinsetta, F. R., Semighini, E. P., da Silva, V. B., & da Silva, C. H. T. (2012). Estratégias de triagem virtual no planejamento de fármacos. *Revista Virtual de Química*, 4(6), 739-776.

Russowsky, D., Lopes, F. A., da Silva, V. S., Canto, K. F., D'Oca, M. G. M., & Godoi, M. N. (2004). Multicomponent Biginelli's synthesis of 3, 4-dihydropyrimidin-2 (1H)-ones promoted by SnCl₂. 2H₂O. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 15(2), 165-169.

Sachdeva, H., & Dwivedi, D. (2012). Lithium-acetate-mediated biginelli one-pot multicomponent synthesis under solvent-free conditions and cytotoxic activity against the human lung cancer cell line A549 and breast cancer cell line MCF7. *The Scientific World Journal*, 2012.

Salehi, B., Zucca, P., Sharifi-Rad, M., Pezzani, R., Rajabi, S., Setzer, W. N., Varoni, E. M., Iriti, M., Kobarfard, F., & Sharifi-Rad, J. (2018). Phytotherapeutics in cancer invasion and metastasis. *Phytother Res.* <https://doi.org/10.1002/ptr.6087>

Saloutin, V., Burgart, Y. V., Kuzueva, O., Kappe, C., & Chupakhin, O. (2000). Biginelli condensations of fluorinated 3-oxo esters and 1, 3-diketones. *Journal of Fluorine Chemistry*, 103(1), 17-23.

Santos, V. G., Godoi, M. N., Regiani, T., Gama, F. H., Coelho, M. B., de Souza, R. O., Eberlin, M. N., & Garden, S. J. (2014). The Multicomponent Hantzsch Reaction: Comprehensive Mass Spectrometry Monitoring Using Charge-Tagged Reagents. *Chemistry—A European Journal*, 20(40), 12808-12816.

Sashidhara, K. V., Singh, L. R., Shameem, M., Shakya, S., Kumar, A., Laxman, T. S., Krishna, S., Siddiqi, M. I., Bhatta, R. S., & Banerjee, D. (2016). Design, synthesis and anticancer activity of dihydropyrimidinone–semicarbazone hybrids as potential human DNA ligase 1 inhibitors. *MedChemComm*, 7(12), 2349-2363.

Schiffman, J. D., Fisher, P. G., & Gibbs, P. (2015). Early detection of cancer: past, present, and future. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, 35(1), 57-65.

Shamim, S., Khan, K. M., Salar, U., Ali, F., Lodhi, M. A., Taha, M., Khan, F. A., Ashraf, S., Ul-Haq, Z., & Ali, M. (2018). 5-Acetyl-6-methyl-4-aryl-3, 4-dihydropyrimidin-2 (1H)-ones: As potent urease inhibitors; synthesis, in vitro screening, and molecular modeling study. *Bioorganic Chemistry*, 76, 37-52.

Shumaila, A. M., & Al-Thulaia, A. A. (2019). Mini-review on the synthesis of Biginelli analogs using greener heterogeneous catalysis: Recent strategies with the support or direct catalyzing of inorganic catalysts. *Synthetic Communications*, 49(13), 1613-1632.

Singh, V., Jaiswal, P. K., Ghosh, I., Koul, H. K., Yu, X., & De Benedetti, A. (2019). The TLK1-Nek1 axis promotes prostate cancer progression. *Cancer letters*, 453, 131-141.

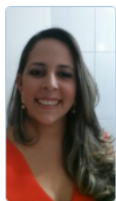
Singh, V., Khalil, M. I., & De Benedetti, A. (2020). The TLK1/Nek1 axis contributes to mitochondrial integrity and apoptosis prevention via phosphorylation of VDAC1. *Cell Cycle*, 1-13.

Vianna, D., Hamerski, L., Figueiró, F., Bernardi, A., Visentin, L., Pires, E., Teixeira, H., Salbego, C., Eifler-Lima, V., & Battastini, A. (2012). Selective cytotoxicity and apoptosis induction in glioma cell lines by 5-oxygenated-6, 7-methylenedioxy coumarins from *Pterocaulon* species. *European journal of medicinal chemistry*, 57, 268-274.

Wan, J.-P., & Liu, Y. (2010). Synthesis of dihydropyrimidinones and thiones by multicomponent reactions: strategies beyond the classical Biginelli reaction. *Synthesis*, 2010(23), 3943-3953.

Yoshimoto, K., Mizoguchi, M., Hata, N., Murata, H., Hatae, R., Amano, T., Nakamizo, A., & Sasaki, T. (2012). Complex DNA repair pathways as possible therapeutic targets to overcome temozolomide resistance in glioblastoma. *Frontiers in oncology*, 2, 186.

7. CURRÍCULO LATTES



Danielle Pereira Batista

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/8392087170865602>

Última atualização do currículo em 17/01/2021

Resumo informado pelo autor

Possui graduação em Química Bacharelado pelo Centro Universitário La Salle - Canoas; Especialização em Toxicologia Clínica e Forense pela Faculdade Unyleya- DF; Possui técnico em análises clínicas e atualmente trabalha no laboratório do Hospital de Aeronáutica de Canoas- Rs. Além disso, participei do Programa de Extensão do Instituto de Toxicologia da PUCRS, desenvolvendo atividades de pesquisa em câncer. Tem experiência nas áreas de química, farmacologia, microbiologia ambiental e análises clínicas.

(Texto informado pelo autor)

Formação acadêmica/titulação

- 2018** Mestrado em Biociências.
 Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil
 Título: Prospecção de inibidores de Nek1 empregando compostos pirimidínicos: Avaliação in silico, síntese e ensaios in vitro
 Orientador: Dinara Jaqueline Moura
 Co-orientador: Marla Narciso Godoi Bijoli
- 2015 - 2017** Especialização em Toxicologia Clínica e Forense.
 Faculdade Unyleya, FU, Brasil
 Título: AÇÚCAR: A DROGA DO SÉCULO
 Orientador: Charles Chenwei Wang
- 2011 - 2015** Graduação em Química.
 Universidade La Salle - Canoas, UNILASALLE, Canoas, Brasil
 Título: CAPACIDADE DE BIOTRANSFORMAÇÃO DO HORMOCONIS RESINAE EM DRENAGEM ÁCIDA DE MINERAÇÃO
 Orientador: Delmar Bizani

Formação complementar

- 2017 - 2017** Curso Modelagem Molecular Aplicada ao Desenvolvimento Racional de Fármacos. . (Carga horária: 20h).
 Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
- 2017 - 2017** Curso de curta duração em Química Orgânica e Sustentável. (Carga horária: 8h).
 Associação Brasileira de Química, ABQ, Brasil
- 2015 - 2016** Curso de curta duração em Curso de Química Farmacêutica. (Carga horária: 60h).
 Portal Educação de Campo Grande, PE, Campo Grande, Brasil
- 2015 - 2015** Curso de curta duração em Curso de Toxicologia Laboratorial. (Carga horária: 80h).
 Portal Educação de Campo Grande, PE, Campo Grande, Brasil
- 2015 - 2015** Curso de curta duração em Curso de Farmacologia do Câncer. (Carga horária: 16h).
 Fundação Irmão José Olão, FIJO, Brasil
- 2015 - 2015** Extensão universitária em Curso de Extensão Liga Farmacologia, Toxicologia e Farmacovigilância. (Carga horária: 320h).
 Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Brasil
- 2012 - 2012** Extensão universitária em Análise de Alimentos- Bromatologia. (Carga horária: 20h).
 Universidade La Salle - Canoas, UNILASALLE, Canoas, Brasil
- 2011 - 2011** Oficina Pedagógica a Química e o Aquecimento Globa. . (Carga horária: 4h).
 Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Canoas, Brasil

Atuação profissional

1. Força Aérea Brasileira - FAB

Vínculo institucional

2005 - Atual Vínculo: Servidor público , Enquadramento funcional: Técnica em Análises Clínicas , Carga horária: 30, Regime: Parcial
Outras informações:
Atuação na área de: Hematologia, bioquímica, parasitologia, microbiologia, uroanálise, imunologia e coleta de sangue.

2. Universidade La Salle - Canoas - UNILA SALLE

Vínculo institucional

2015 - 2015 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Programa de Iniciação Científica , Carga horária: 12, Regime: Parcial
Outras informações:
Projeto de pesquisa intitulado: "Avaliação do uso de bactérias modificadoras em processos de biorremediação de compostos nitrogenados de águas usadas em viveiros artificiais de piscicultura."

2014 - 2014 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Programa de Iniciação Científica , Carga horária: 12, Regime: Parcial
Outras informações:
Projeto de pesquisa intitulado: "Avaliação do uso de bactérias modificadoras em processos de biorremediação de compostos nitrogenados de águas usadas em viveiros artificiais de piscicultura."

2014 - 2014 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Programa de Iniciação Científica , Carga horária: 12, Regime: Parcial
Outras informações:
Projeto de pesquisa intitulado: " Estudo da remoção do cromo em efluentes de indústrias coureiras utilizando uma linhagem de pseudomonas spp, produtora de biossurfactantes em meios alternativos."

2013 - 2013 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Programa de Iniciação Científica , Carga horária: 12, Regime: Parcial

3. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS

Vínculo institucional

2015 - 2015 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Programa de Extensão e Gestão das Atividades , Carga horária: 10, Regime: Parcial
Outras informações:
Instituto de Toxicologia

4. Universidade Castelo Branco - UCB/RJ

Vínculo institucional

2004 - 2005 Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Técnica em Serviços Biomédicos II , Carga horária: 30, Regime: Parcial
Outras informações:
Atuação na área de microbiologia e micologia veterinária.

5. Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre - ISCMPA

Vínculo institucional

2009 - 2010 Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Técnica em Análises Clínicas , Carga horária: 30, Regime: Parcial
Outras informações:
Atuação na área de hematologia e uroanálise.

Áreas de atuação

1. Química
2. Farmacologia Bioquímica e Molecular
3. Microbiologia
4. Ciências Ambientais
5. Imunologia
6. Parasitologia

Idiomas

Inglês Compreende Razoavelmente , Fala Razoavelmente , Escreve Pouco , Lê Razoavelmente
Português Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

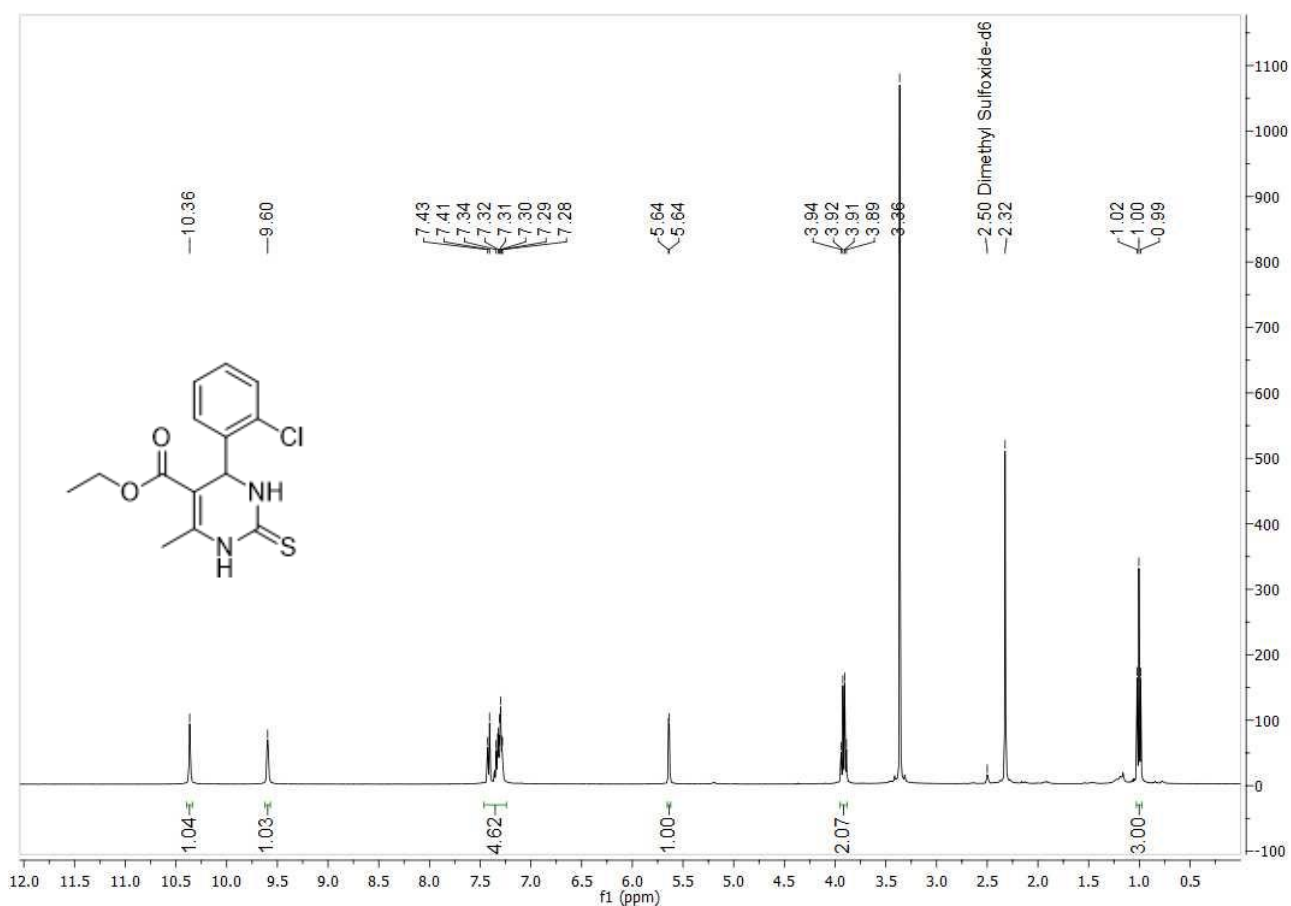
Prêmios e títulos

- 2015** Menção Honrosa e Prêmio Destaque - XI Semana Científica Unilasalle, Centro Universitário La Salle
2013 Menção Honrosa - IX Semana Científica Unilasalle, Centro Universitário La Salle

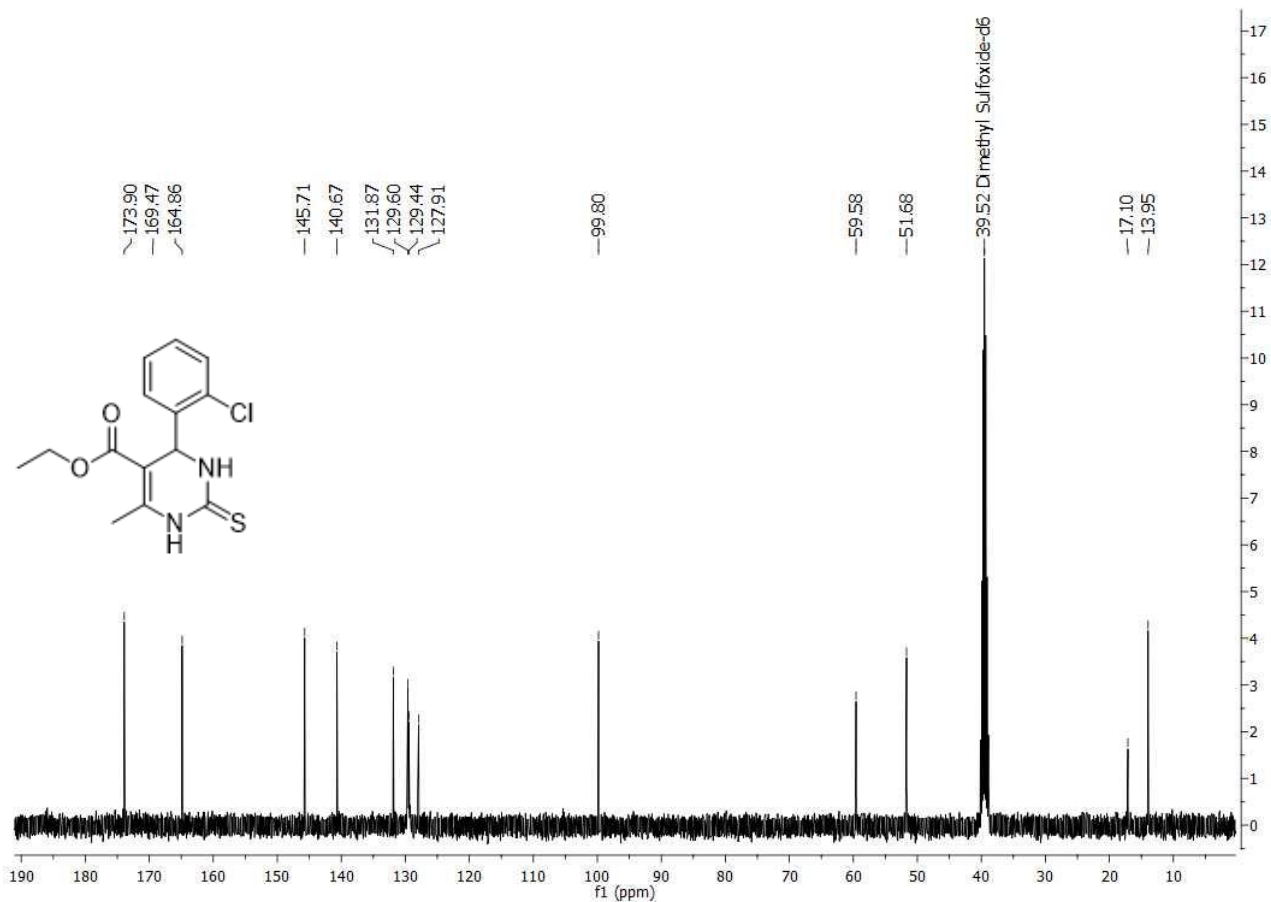
Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 17/01/2021 às 22:33:45.

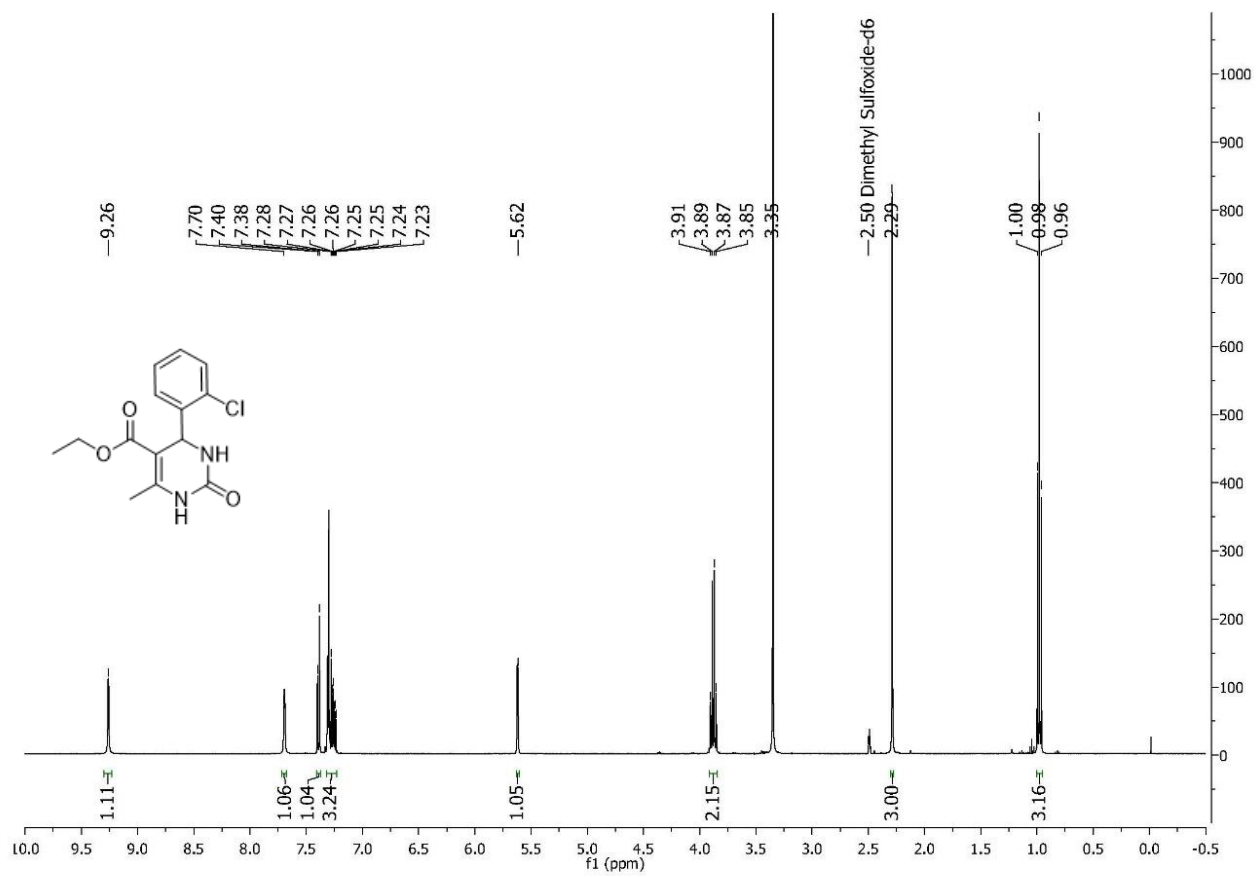
8. Anexo

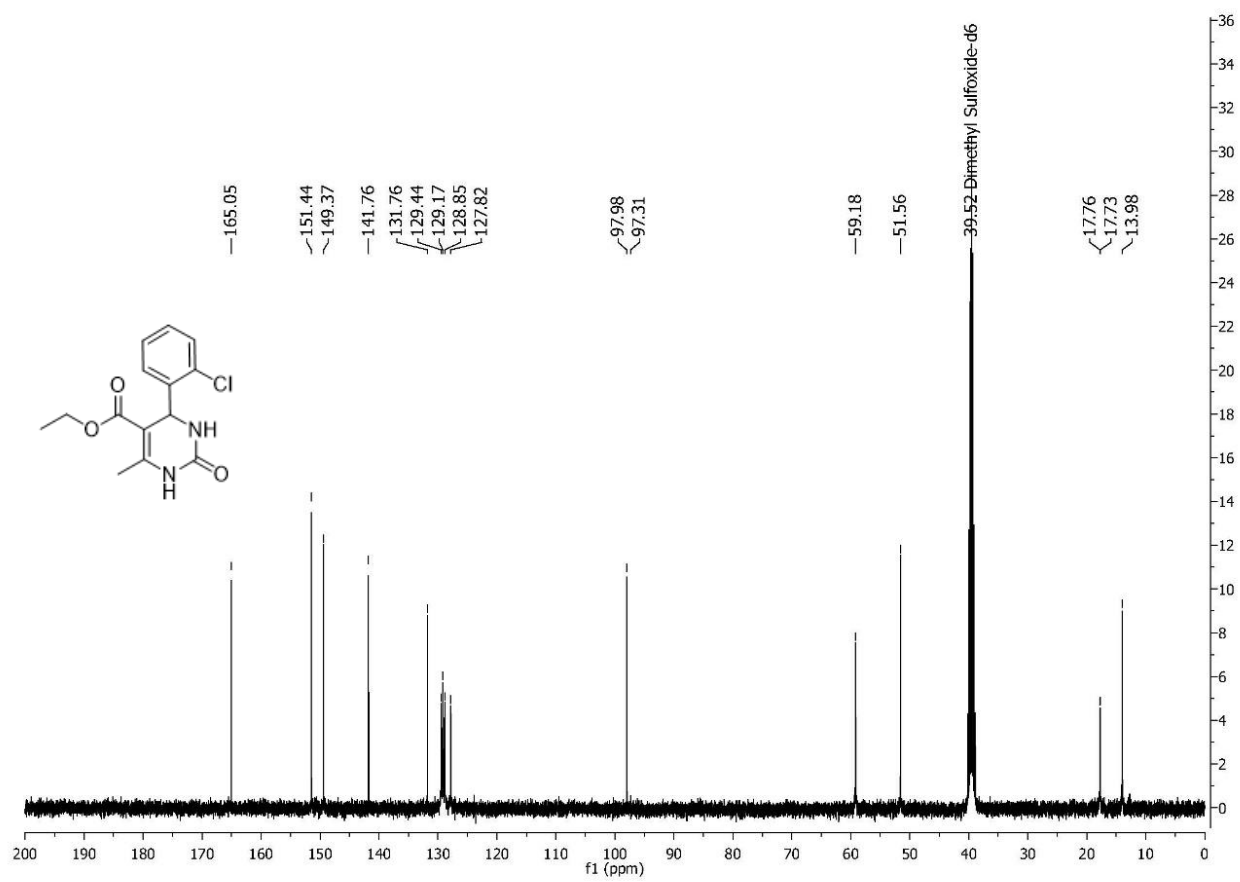
Em anexo são apresentados como informação suplementar os espectros das moléculas sintetizadas utilizadas neste trabalho.

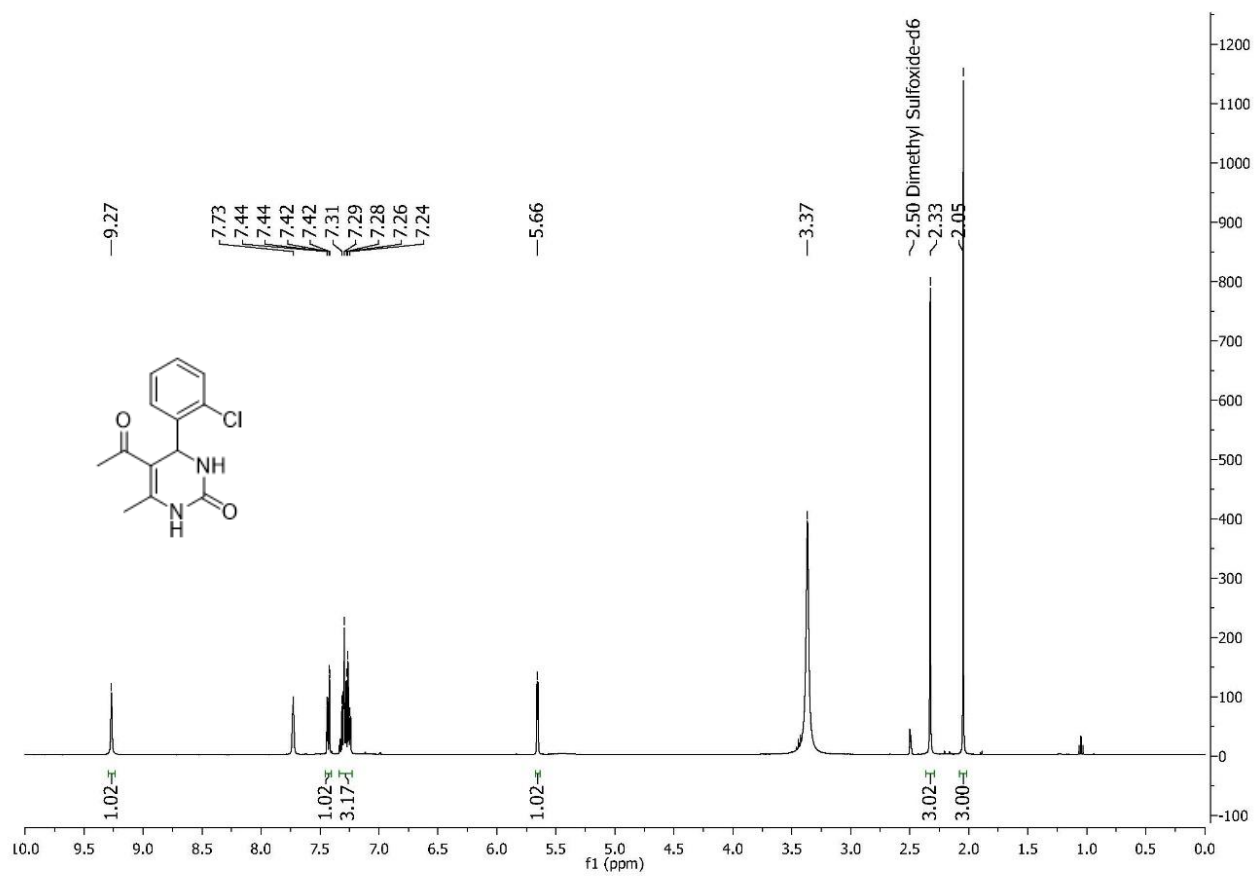


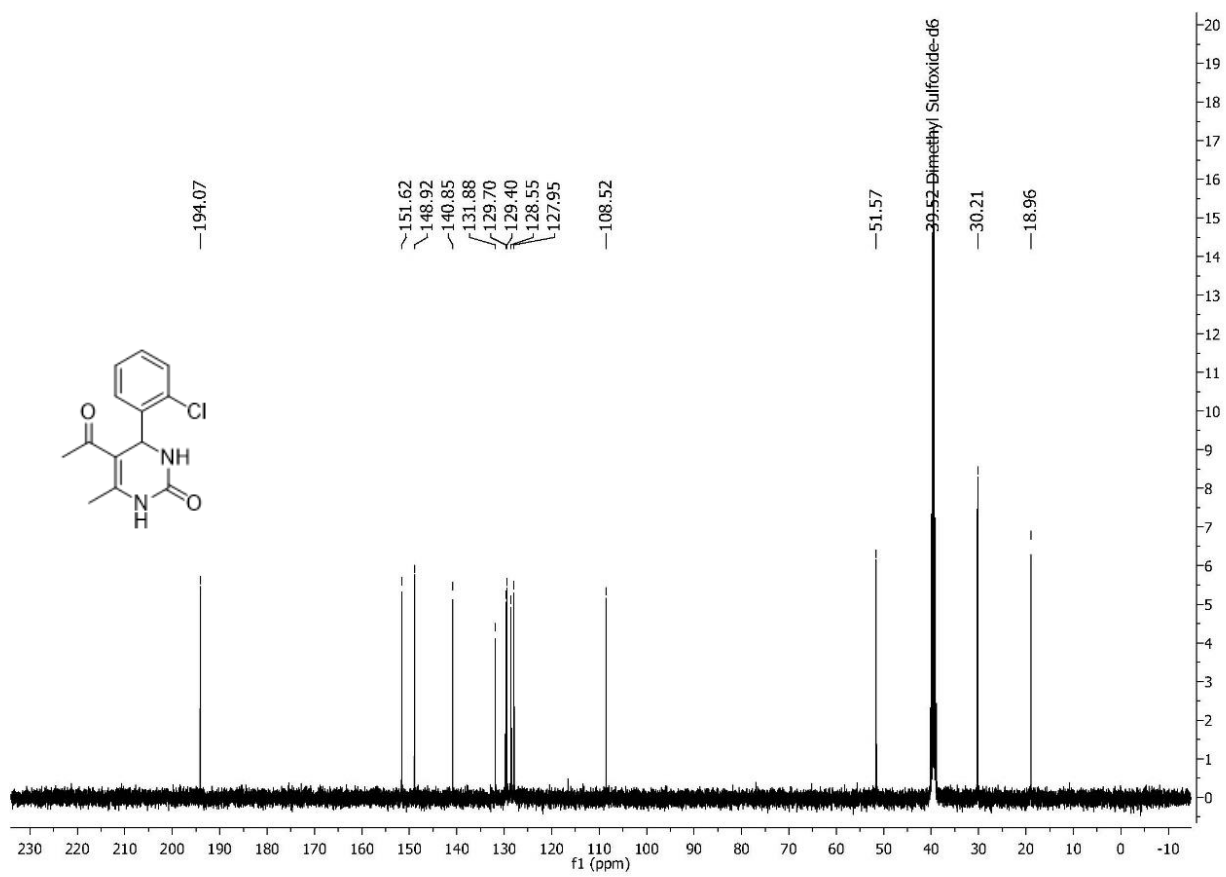
Spectra 1. ¹H NMR (400 MHz) of compound 1a

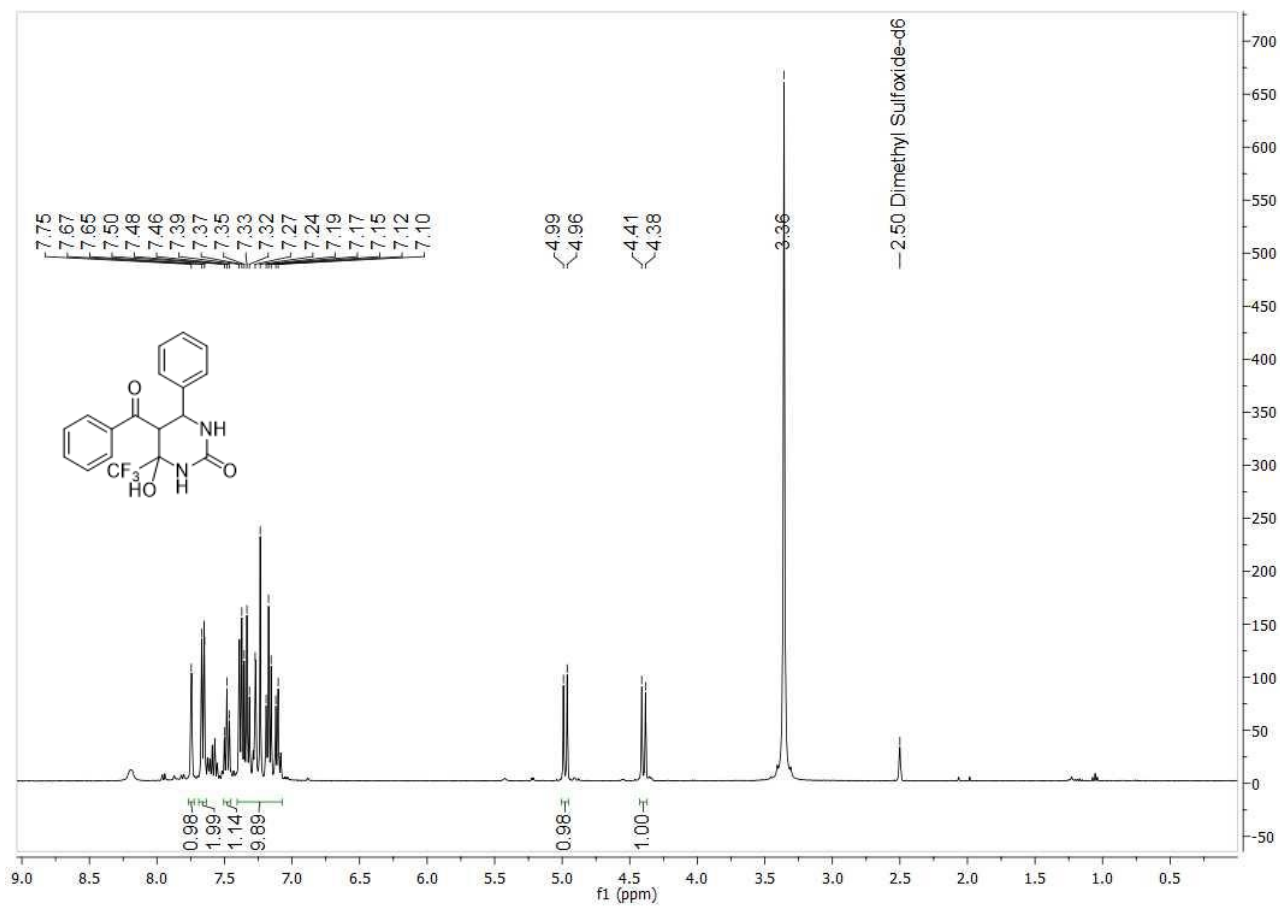
Spectra 2. ^{13}C NMR (100MHz) of compound 1a

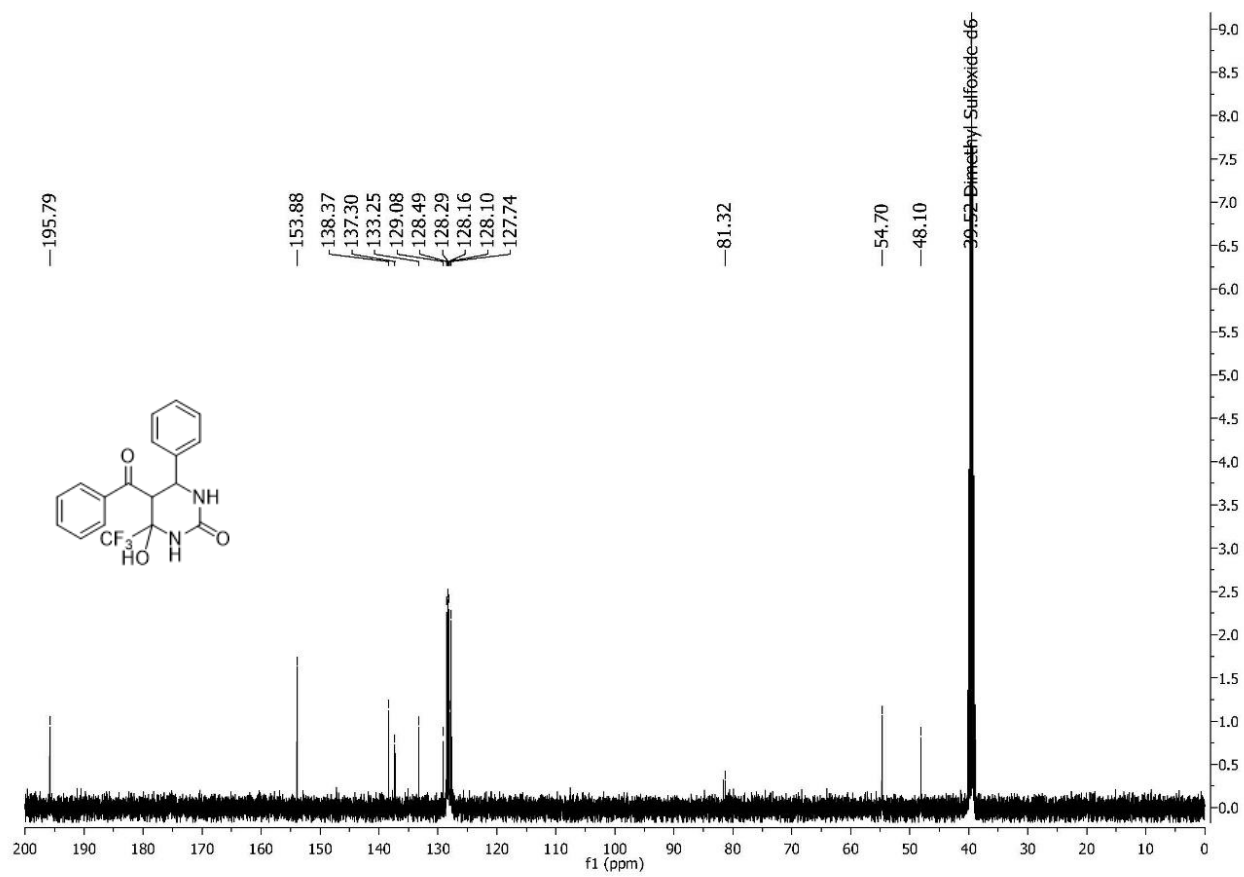
Spectra 3. ¹H NMR (400 MHz) of compound 1b

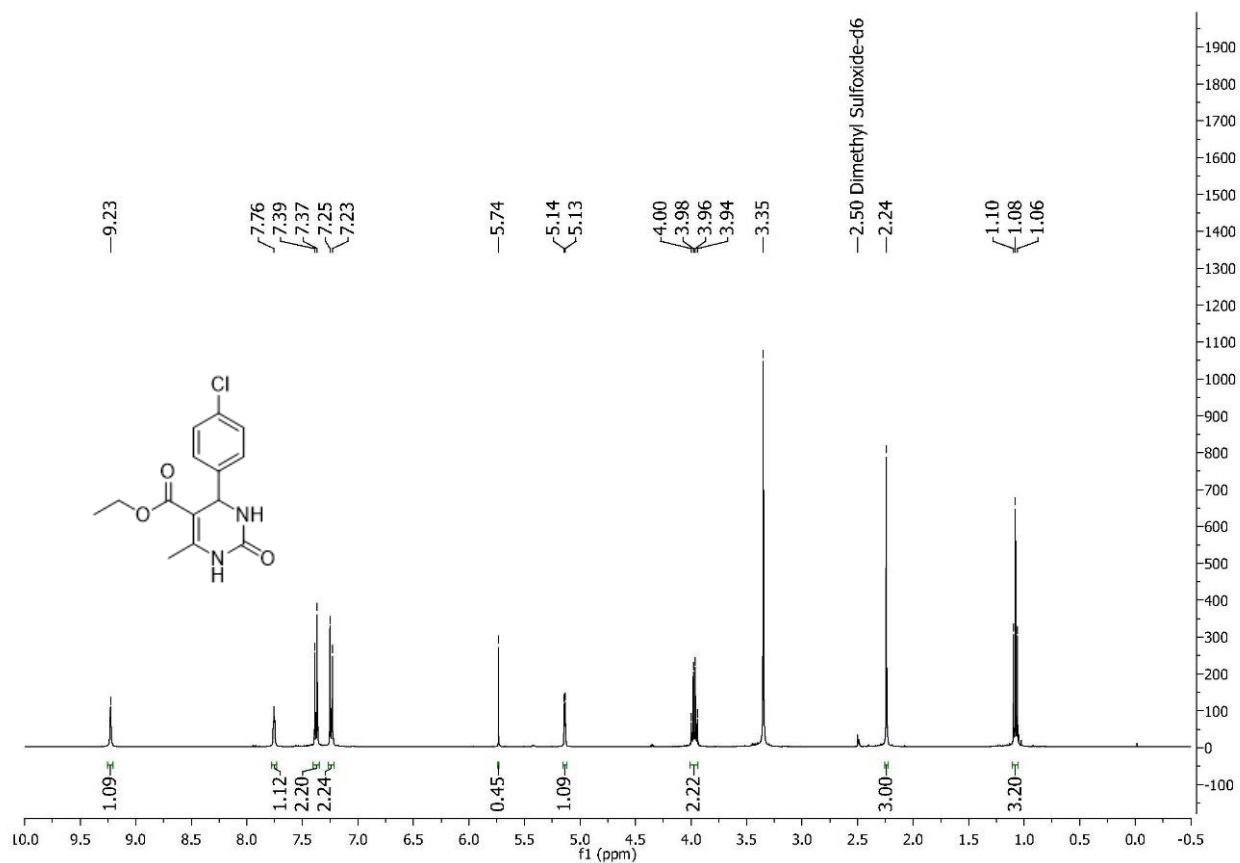
Spectra 4. ^{13}C NMR (100MHz) of compound 1b

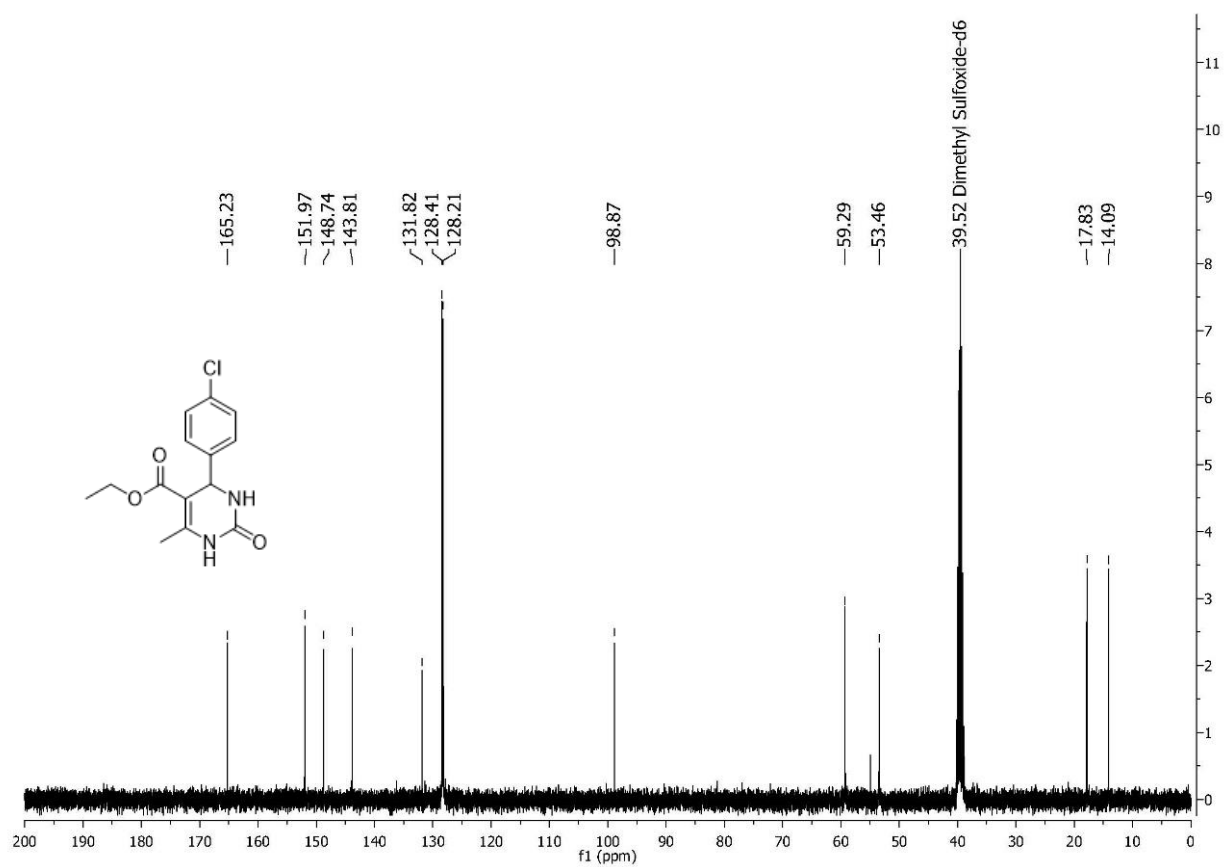
Spectra 5. ¹H NMR (400 MHz) of compound 1c

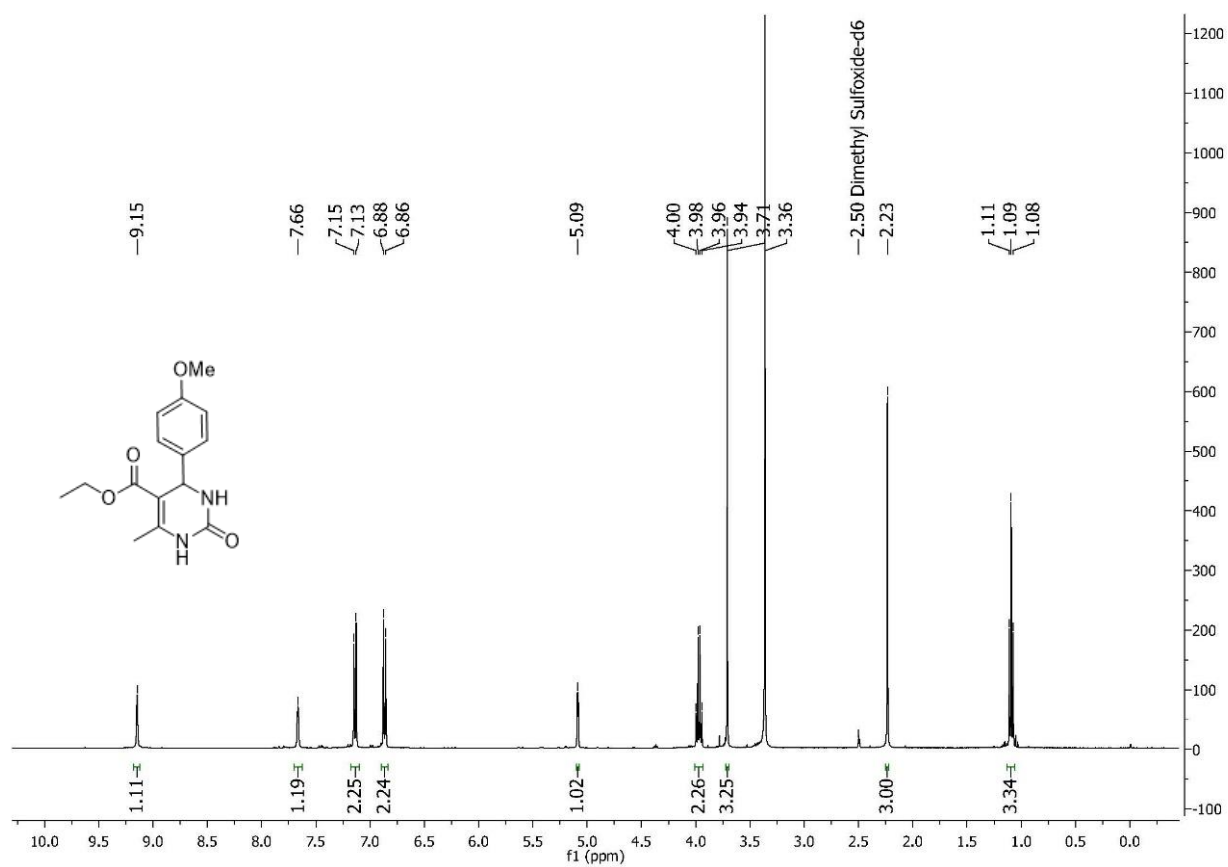
Spectra 6. ^{13}C NMR (100MHz) of compound 1c

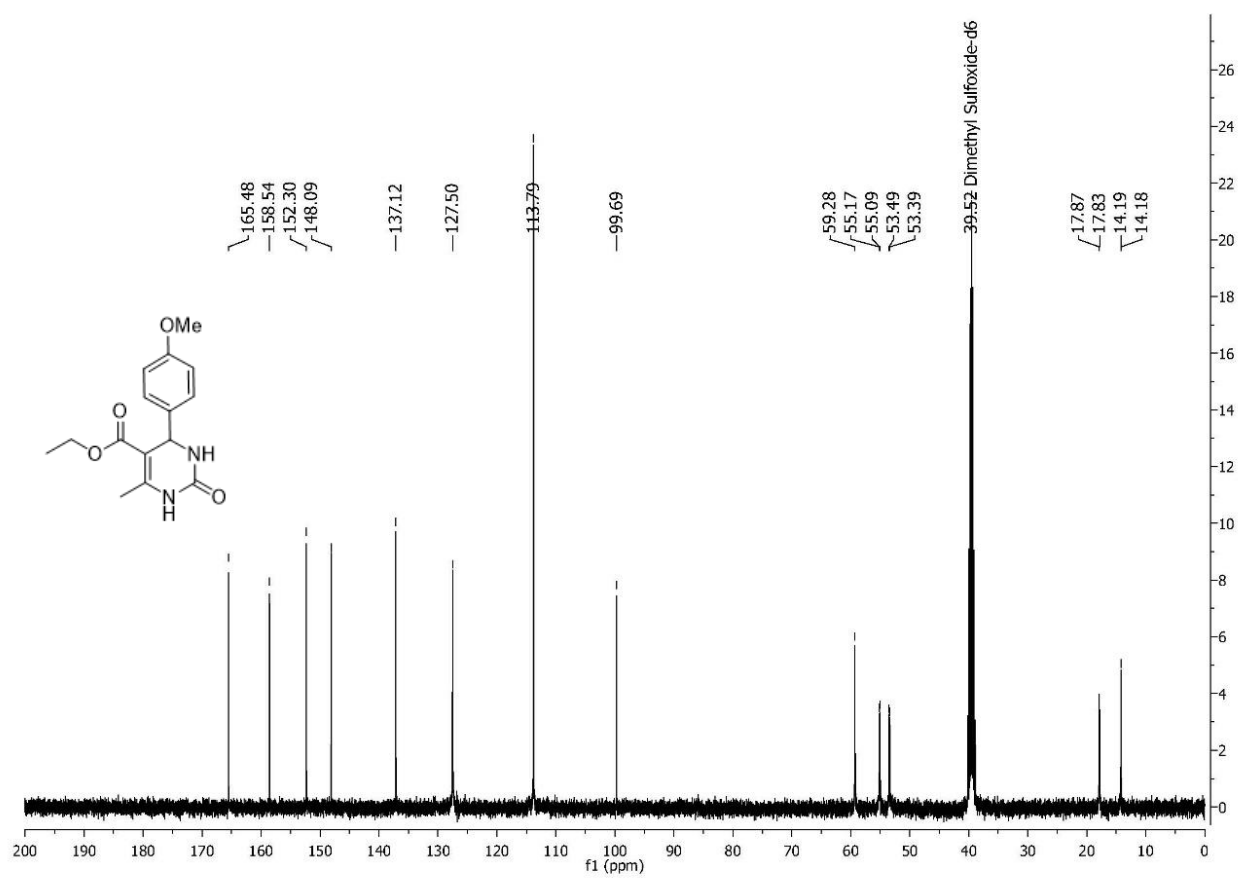
Spectra 7. ^1H NMR (400 MHz) of compound 1d

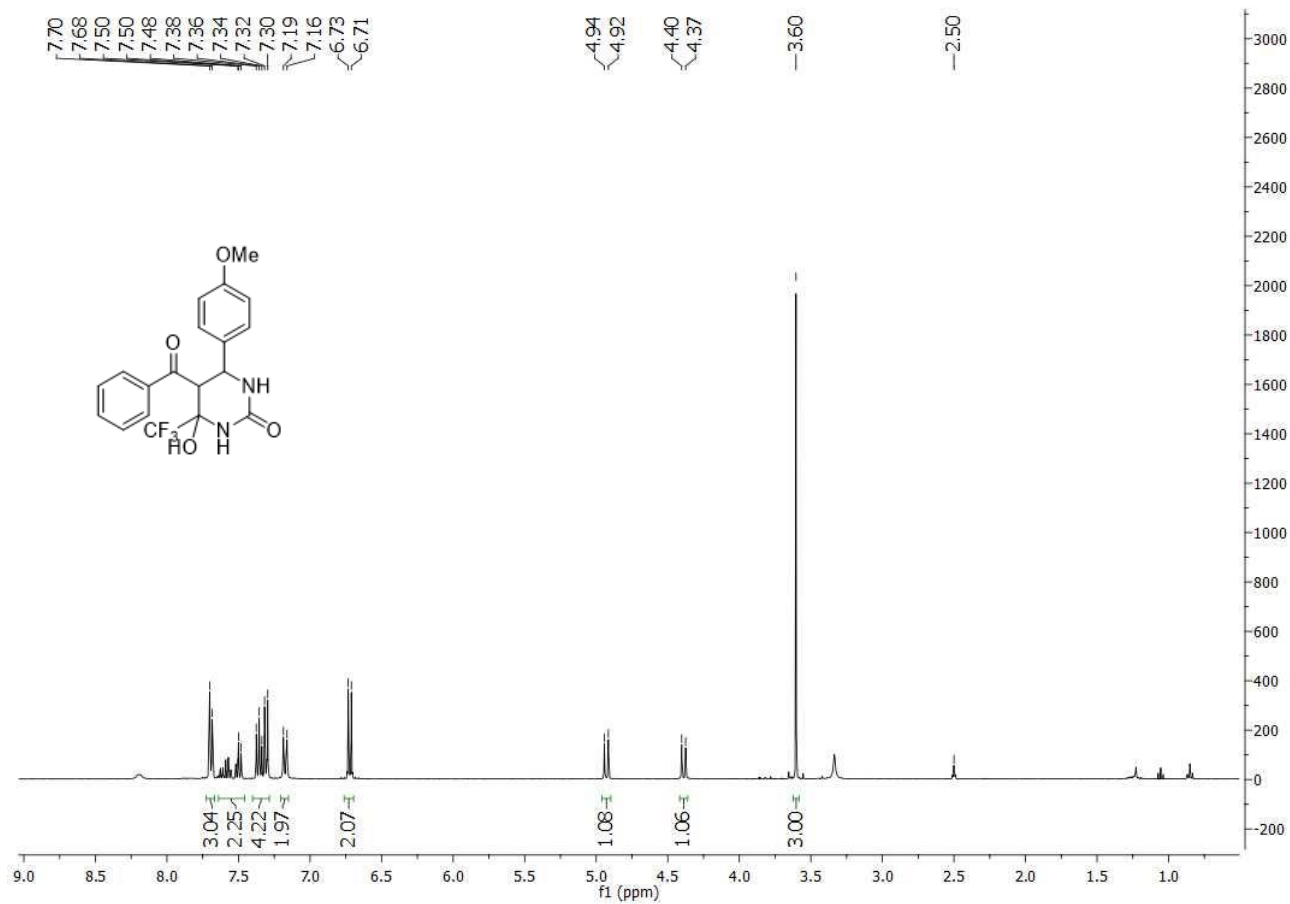
Spectra 8. ^{13}C NMR (100MHz) of compound 1d

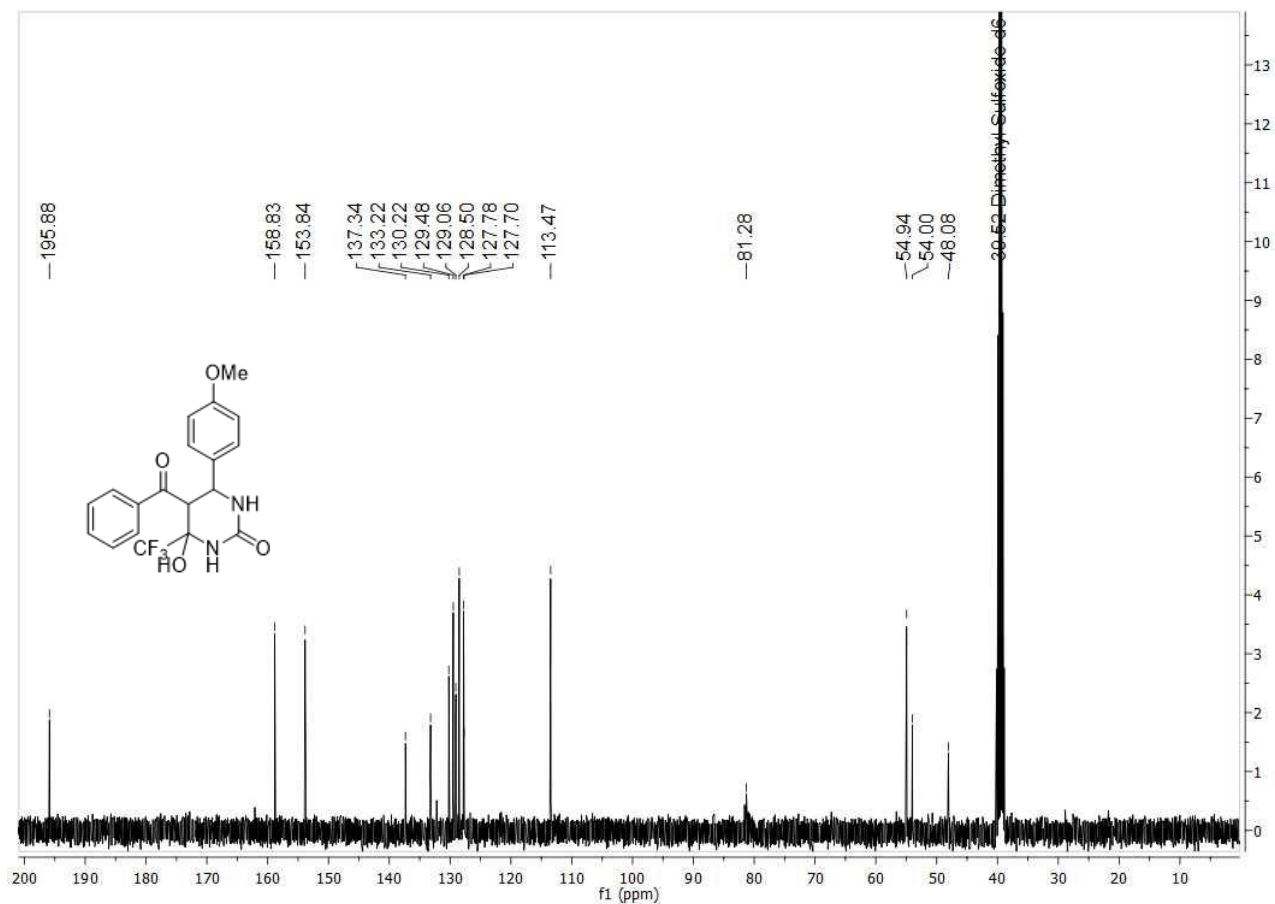
Spectra 9. ^1H NMR (400 MHz) of compound 1e

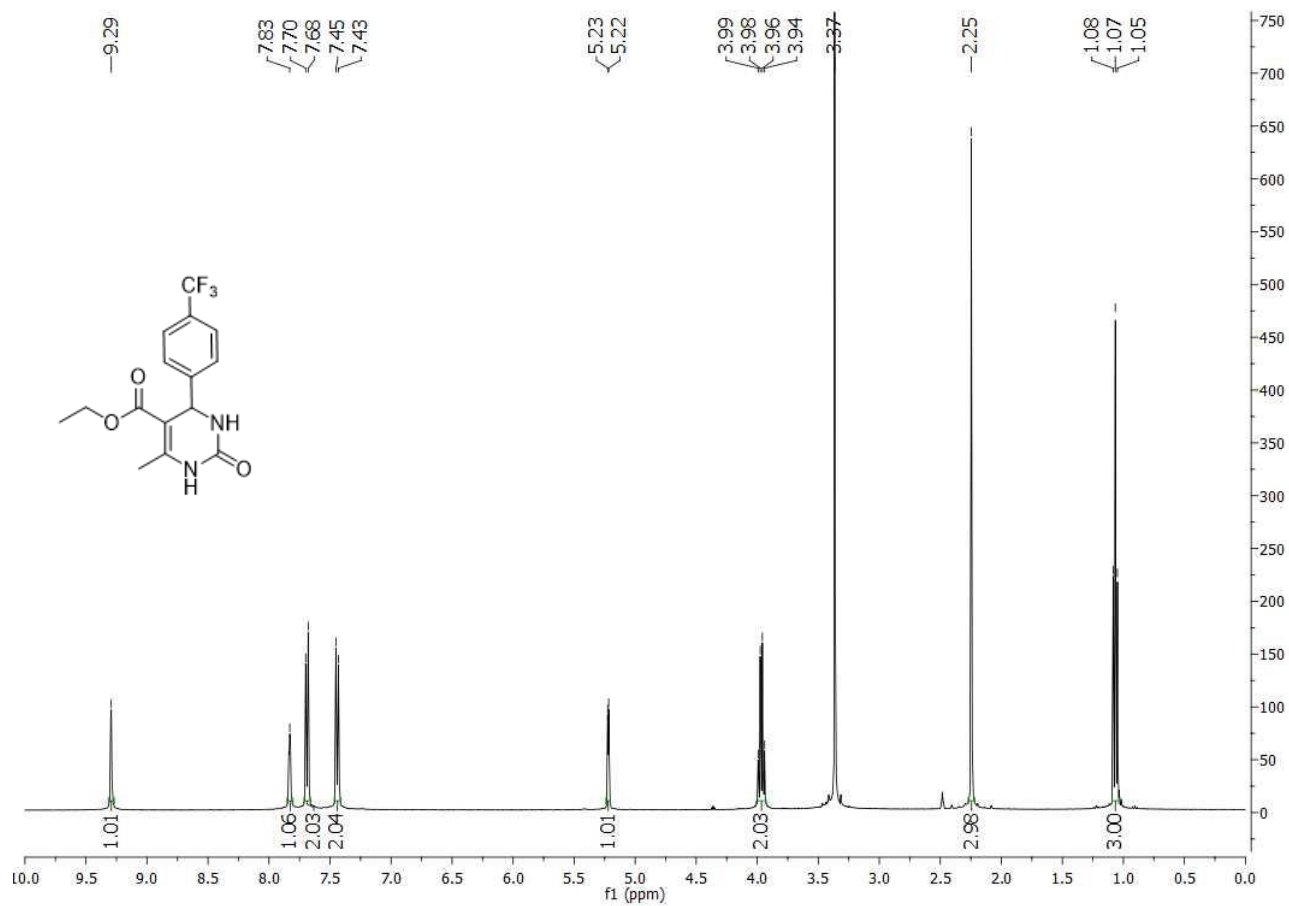
Spectra 10. ^{13}C NMR (100MHz) of compound 1e

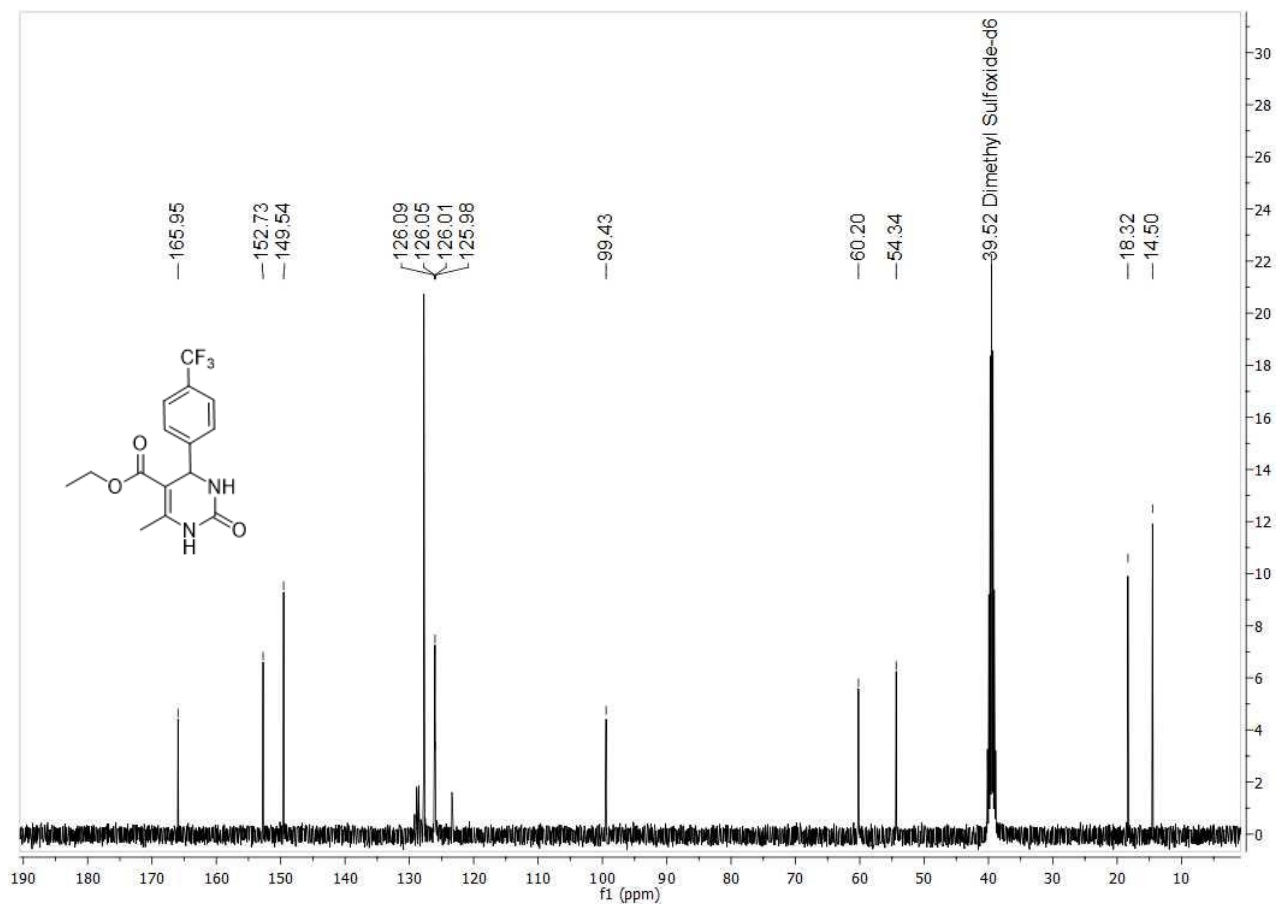
Spectra 11. ¹H NMR (400 MHz) of compound 1f

Spectra 12. ^{13}C NMR (100MHz) of compound 1f

Spectra 13. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz) of compound 1g

Spectra 14. ^{13}C NMR (100MHz) of compound 1g

Spectra 15. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz) of compound 1h

Spectra 16. ^{13}C NMR (100MHz) of compound 1h