

Daniela Ariana Gunsen Faria

Inibidores da 17β - Hidroxiesteróide Desidrogenase e Terapia do Cancro da Mama

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,
orientada pelo Professor Doutor Alcino Jorge Lopes Leitão e apresentada à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

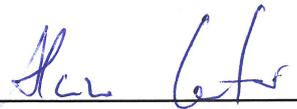
Eu, Daniela Ariana Gunsen Faria, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº2007010115, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 11 de Julho de 2014.

(Daniela Ariana Gunsen Faria)

O Tutor



(Professor Doutor Alcino Jorge Lopes Leitão)

A Aluna



(Daniela Ariana Gunsen Faria)

Agradecimentos

O meu especial agradecimento:

Ao Professor Doutor Alcino Jorge Lopes Leitão, orientador da monografia, pela incansável disponibilidade, assim como pelas correções e sugestões ao longo da realização deste trabalho.

Aos meus pais e a minha irmã pelo apoio ao longo destes cinco anos, pelos valores transmitidos, pelo carinho, pela compreensão e fonte de motivação constante.

Lista de Abreviaturas

- 3 β -HSD - 3 β -Hidroxiesteróide desidrogenase
17 β -HSDI - 17 β -Hidroxiesteróide desidrogenase tipo I
ADP - Adenosina difosfato
AF-1 - Função de ativação I
AF-2 - Função de ativação 2
AKR - Aldo-ceto redutase
DBD - Domínio de ligação de DNA
DHEA - Desidroepiandrosterona
DNA - Ácido desoxirribonucleico
E1 - Estrona
E2 - Estradiol
EGFR - Recetor do fator de crescimento epidérmico
ER - Recetor de estrogénio
ERE - Elementos de resposta ao estrogénio
GFR - Recetor de fator de crescimento
HER2 - Recetor 2 do fator de crescimento da epiderme humana
HSD - Hidroxiesteróide desidrogenase
AI - Inibidor da aromatase
LBD - Domínio de ligação ao ligando
MAPK - Proteína cinase ativada por mitogénio
MISS - Sinalização esteróide iniciada na membrana
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NISS - Sinalização esteróide iniciada no núcleo
PKB - Proteína cinase B
SDR - Desidrogenase redutase de cadeia curta
SERDs - Sub-reguladores seletivos dos recetores de estrogénio
SERMs - Moduladores seletivos dos recetores de estrogénio

Resumo

Os estrogénios são necessários para o normal crescimento e desenvolvimento de vários tecidos, no entanto, são também responsáveis pela promoção de tumores, como o cancro da mama. No corpo humano, o estrogénio mais potente, o estradiol, é originado a partir da estrona, pela ação da enzima 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo I (17 β -HSDI). Como esta enzima se encontra em elevadas quantidades em tecidos cancerígenos dependentes de estrogénios, a descoberta de inibidores da 17 β -HSDI, com o objetivo de reduzir os níveis de estradiol em circulação no tumor, é de extrema importância.

Nas últimas décadas, muitos grupos de investigadores têm-se concentrado na descoberta de inibidores da 17 β -HSDI. Existem dois tipos de compostos que podem agir como possíveis inibidores da 17 β -HSDI, os compostos esteróides e os compostos não esteróides. A maioria dos inibidores da 17 β -HSDI é baseado em estruturas esteróides, sendo utilizado a estrutura da estrona (E1) e do estradiol (E2) para investigar a forma como a substituição em posições diferentes do núcleo esteróide afeta a afinidade de ligação de inibidores.

Palavras-chave: Estrogénios, Cancro da mama, Estradiol, Inibidores da 17 β -HSDI.

Abstract

The estrogens are responsible for the normal growth and development of many tissues. However, they are responsible for promoting breast cancer. In human body, the most potent estrogen is estradiol, which is originated from estrone by 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type I enzyme (17 β -HSDI) action. As this enzyme is found in high concentrations in cancerigenes tissues estrogen dependent, the 17 β -HSDI inhibitors discovery is very important, with the objective to reduce estradiol in circulation in the tumor.

In the last decades, many researcher groups have been focused in the discovery of possible 17 β -HSDI inhibitors. There are two types of compounds as possible 17 β -HSDI inhibitors, the steroidal compounds and the non-steroidal compounds. The majority of 17 β -HSDI inhibitors are based in steroid structure, which is used the estrone (E1) structure and estradiol (E2) structure to investigate the manner of how the substitution in many different positions in the steroid core affects the ligand affinity of inhibitors.

Keywords: Estrogens, Breast cancer, Estradiol, 17 β -HSDI inhibitors.

Índice

Índice de Figuras.....	6
1. Introdução.....	7
2. O cancro da mama estrogénio-dependente.....	8
3. Estrogénios	8
3.1. Síntese de estrogénios.....	9
3.2. Recetores de estrogénios.....	10
3.3. Vias de sinalização	11
4. Cancro da mama e abordagens terapêuticas	12
4.1. Terapêutica hormonal	13
5. 17 β -Hidroxiesteróide desidrogenase (17 β -HSD)	14
5.1. 17 β -Hidroxiesteróide desidrogenase I (17 β -HSDI).....	14
6. Inibidores da 17 β -Hidroxiesteróide desidrogenase I	16
6.1. Inibidores esteróides	16
6.1.1. Progestinas.....	17
6.1.2. Derivados estratrieno com substituintes flúor.....	17
6.1.3. Compostos híbridos E2 adenosina	19
6.1.4. Esteróide modificado com um anel E.....	21
6.1.5. Derivado C16 de estradiol	22
6.2. Inibidores não esteróides	24
6.2.1. Fitoestrogénios e compostos relacionados.....	24
6.2.2 Derivados gossipol.....	25
6.2.3. Bis(hidroxifenil)azoles	27
7. Conclusão	28
8. Referências bibliográficas.....	29

Índice de Figuras

Figura 1: Vias da biossíntese do estradiol	10
Figura 2: Estrutura dos ER α e ER β	11
Figura 3: Sinalização esteróide iniciada no núcleo (NISS) via clássica e não-clássica, e sinalização esteróide iniciada na membrana (MISS).....	12
Figura 4: Enzima 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase I	14
Figura 5: Mecanismo catalítico da 17 β -HSD I com a E1.....	15
Figura 6: Progestinas com atividade inibitória sobre a 17 β -HSD I.	17
Figura 7: Derivados estratrieno com substituintes flúor	18
Figura 8: Representação do complexo 17 β -HSD I, NADP ⁺ e o composto 9	19
Figura 9: EM-1745 com atividade inibitória sobre a 17 β -HSD I	19
Figura 10: Inibidores híbridos de primeira e segunda geração.....	20
Figura 11: Representação do complexo 17 β -HSD I com o composto 16	21
Figura 12: Inibidor esteróide CC-156.....	21
Figura 13: Inibidor esteróide com um anel E.....	22
Figura 14: Derivados C16 de estradiol.....	23
Figura 15: Derivado 3-substituído-16 β -(<i>m</i> -carbamoilbenzil)-estradiol.....	23
Figura 16: Representação do complexo 17 β -HSD I com o composto 22	24
Figura 17: Estrutura dos flavonóides: flavanona, flavona e isoflavona.....	25
Figura 18: Inibidores fitoestrogénicos: apigenina e coumestrol.....	25
Figura 19: Derivados gossipol com atividade inibitória sobre a 17 β -HSD I	26
Figura 20: Representação do composto 17 β -HSD I com o composto 26	26
Figura 21: Inibidor oxazole 2,5-disubstituído.....	27
Figura 22: Representação do complexo 17 β -HSD I com o composto 27	27

I. Introdução

O cancro é uma das doenças mais temidas da atualidade, pois tem uma alta incidência e é uma das principais causas de morte a nível mundial.¹ O cancro da mama, apesar de não ser um dos mais letais, é o cancro mais comumente diagnosticado entre as mulheres, sendo a principal causa de morte relacionada com cancro em mulheres em todo o mundo.¹ Em Portugal, anualmente são detetados cerca de 4500 novos casos de cancro da mama, ou seja, 11 novos casos por dia, morrendo por dia 4 mulheres com esta doença.¹

É uma das doenças com maior impacto na nossa sociedade, que agride um órgão com tanto simbolismo, provocando assim alterações em várias dimensões da vida das pacientes, incluindo a sua autoestima, a sua sexualidade, a maternidade e a sua feminilidade.¹ Assim, é muito importante a descoberta de novas estratégias de tratamento. Nas últimas décadas muitos grupos de investigadores têm-se focalizado nos avanços na compreensão da doença e do desenvolvimento de novas terapêuticas mais eficazes e menos tóxicas.

O cancro da mama pode ser estrogénio-dependente, tendo os estrogénios um papel crucial no seu desenvolvimento e progressão.² Uma abordagem para o tratamento deste tipo de cancro consiste em bloquear a formação do estrogénio, inibindo assim a ação das enzimas responsáveis pela sua formação, como por exemplo, bloquear a atividade da enzima aromatase, estrona-sulfatase e 17β -hidroxiesteróide desidrogenase (17β -HSDI).³

O presente trabalho tem como objetivo principal dar a conhecer possíveis tratamentos futuros no cancro da mama estrogénio-dependente, estando este trabalho dividido em duas partes. A primeira parte é composta por uma introdução acerca do cancro da mama estrogénio-dependente, quanto à sua incidência e ao respetivo tratamento, e na segunda parte é apresentado uma revisão de alguns estudos efetuados sobre possíveis compostos que tenham a capacidade de inibir a enzima responsável pela formação do estradiol (E2) a partir da estrona (E1), a 17β -HSDI.

2. O cancro da mama estrogénio-dependente

O cancro da mama é um grupo de células alteradas (*i.e.* células neoplásicas) no tecido mamário, que pode invadir os tecidos vizinhos e disseminar-se para outros órgãos do corpo.⁴

Os estrogénios necessários para o controlo do ciclo menstrual de uma mulher, essenciais para a reprodução e para o normal crescimento e desenvolvimento de vários tecidos, também são responsáveis pela promoção de certos tumores, sobretudo na mama.⁵ Este tipo de cancro é designado por cancro da mama estrogénio-dependente.² O estrogénio não causa diretamente as mutações no ácido desoxirribonucleico (DNA), mas o estrogénio faz estimular a proliferação celular. Assim, se as células da mama possuírem uma mutação no DNA, essas células irão proliferar de forma descontrolada, conduzindo ao aparecimento de cancro. Mesmo a mulher não tendo células mamárias com mutação, a proliferação induzida pelo estrogénio nas células mamárias normais pode aumentar o risco de desenvolvimento do cancro, uma vez que na divisão celular pode ocorrer erros de replicação do DNA, aumentando assim o número de mutações.⁶ Assim, a exposição de estrogénio aumenta o risco de uma mulher desenvolver cancro da mama.¹ Logo, mulheres que tiveram a primeira menstruação em idade precoce, que tiveram uma menopausa tardia ou que nunca tiveram filhos, apresentam um risco aumentado. A terapêutica hormonal de substituição e a obesidade após a menopausa são também fatores de risco para este tipo de cancro.¹ Tendo em conta que a mulher obesa possui uma elevada proporção de gordura corporal e que o corpo produz alguns estrogénios no tecido gordo, é mais provável que as mulheres obesas na menopausa apresentem níveis elevados de estrogénios e, conseqüentemente, risco aumentado para este tipo de cancro da mama.¹

3. Estrogénios

Os estrogénios são hormonas que influenciam o crescimento, a diferenciação e o funcionamento de muitos tecidos, como por exemplo, a mama, a próstata, o cérebro, o osso e o sistema cardiovascular.⁵ Existem três compostos estrogénicos endógenos principais nos seres humanos: a E1, o E2 e o estriol, sendo o E2 o mais potente.⁷

3.1. Síntese de estrogénios

Os ovários são a principal fonte de estrogénio em mulheres pré-menopáusicas. No entanto, a biossíntese de estrogénios pode ocorrer em outras partes do corpo que se tornam nas principais fontes de estrogénio após a menopausa, uma vez que na menopausa a função dos ovários e o controlo hipofisário já cessaram. Esses locais incluem as células mesenquimais do tecido adiposo e da pele, os osteoblastos no osso, as células endoteliais e as células do músculo liso da aorta, bem como vários locais do cérebro.⁸ Estes locais de produção de estrogénios fora dos ovários são dependentes da disponibilidade de precursores esteróides com 19 carbonos em circulação, pois não possuem a capacidade de os sintetizar, tendo apenas a capacidade de os converter em esteróides com 18 carbonos.⁸ Assim na mulher pós-menopáusicas, em que a principal fonte de estrogénios passa a ser as células mesenquimais do tecido adiposo, o córtex da glândula supra-renal é que passa a ser a principal fonte desses esteróides com 19 carbonos (*v.g.* desidroepiandrosterona (DHEA) e androstenediona).⁸

A síntese de E2 requer a atividade de algumas enzimas, membros da família do citocromo P450 e uma segunda família de enzimas, a hidroxisteróide desidrogenase (HSD) que catalisam reações envolvidas na biossíntese e na inativação de hormonas esteróides (Figura 1).⁹ Todas as hormonas esteróides são sintetizadas a partir de um precursor comum, o colesterol. O colesterol é convertido em pregnenolona na mitocôndria, sofrendo uma sequência de reações químicas: a 20 α -hidroxilação, a 22-hidroxilação e a clivagem da cadeia lateral do colesterol. Depois da pregnenolona ser transferida para o citoplasma, esta é convertida em progesterona, reação catalisada pela 3 β -hidroxisteróide desidrogenase (3 β -HSD) nas glândulas supra-renais e nos ovários. Tanto a pregnenolona como a progesterona sofrem uma hidroxilação no carbono 17, seguidas por uma clivagem da cadeia lateral, obtendo-se assim a DHEA e androstenediona. A DHEA é ainda convertida em androstenediona, e as enzimas aromatase e a 17 β -HSD convertem a androstenediona em E1 e em testosterona, respetivamente. Finalmente a aromatase e a 17 β -HSDI convertem a testosterona e a E1 para o esteróide mais potente, o E2.^{10,11}

Existe ainda outra via, a via das sulfatases, em que, através da ação da enzima sulfatase, ocorre a transformação do sulfato de estrona em E1, e por ação das sulfotransferases, ocorre a conversão da estrona em derivados sulfatados inativos (Figura 1).¹²

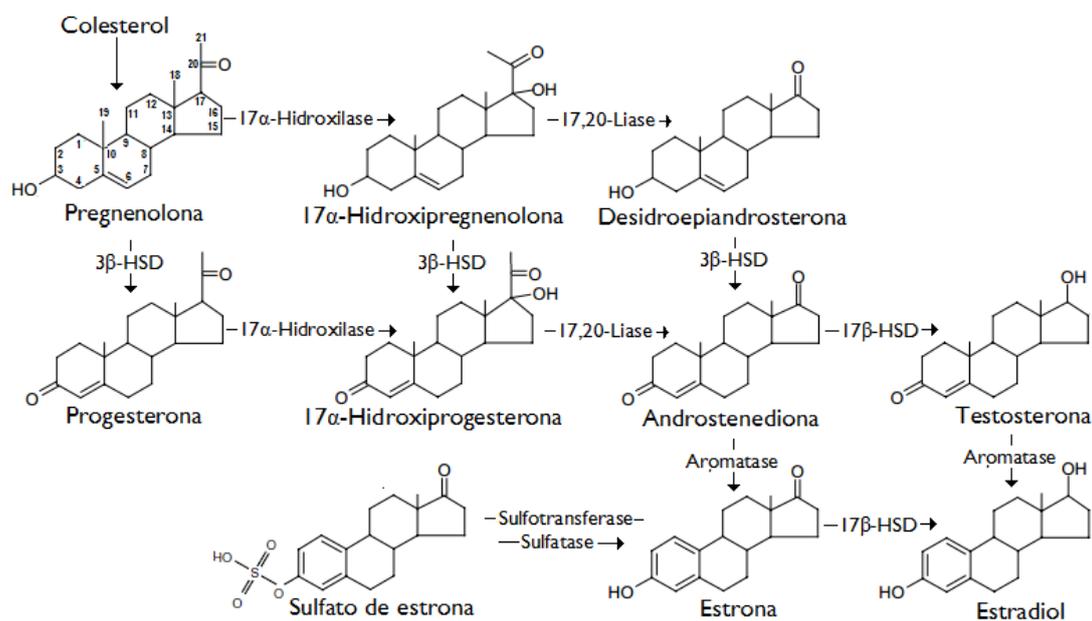


Figura 1: Vias da biossíntese do estradiol. (Adaptado de Mitrunen *et al.*, 2003)¹¹

3.2. Recetores de estrogénios

O estrogénio formado exerce a sua ação através de recetores de estrogénio (ER).⁵ Estes recetores são membros de uma grande família de recetores nucleares, encontrando-se também ao nível da membrana citoplasmática.¹³ Existem dois sub-tipos de recetores de estrogénio, o ER α e ER β , que são codificados por genes diferentes e têm uma estrutura similar.⁵ O ER α tem uma expressão predominante no útero, nas glândulas supra-renais e mamas, já o ER β é expresso principalmente nas células endoteliais vasculares, nos ossos e no tecido prostático.^{14,15} Quanto à estrutura, ambos os recetores de estrogénio possuem domínios estruturais classificados de A a F (Figura 2). O domínio A/B ou domínio N-terminal contém a função de ativação 1 (AF-1), que consiste numa região do recetor que está envolvida em interações com proteínas co-reguladoras e na ativação da transcrição de genes na ausência do ligando. O domínio C ou domínio de ligação ao DNA (DBD) desempenha um papel importante na dimerização dos recetores e na ligação destes a sequências de DNA específicas. O domínio D contém o sinal de localização nuclear. O domínio E ou domínio de ligação ao ligando (LBD) contém a função de ativação 2 (AF-2) cuja ativação depende do ligando e está também envolvido na dimerização do recetor.^{15,16,17} Os ER α e ER β possuem uma maior homologia no DBD (97%) e no LBD (59%). Já os domínios A/B e domínio F são regiões mais variáveis com uma homologia de 18%.¹⁶ Estas diferenças sugerem que os ERs podem ter funções distintas, no que concerne à regulação genética e à resposta biológica, e podem contribuir para a atividade seletiva dos estrogénios em diferentes tecidos alvo.¹⁵

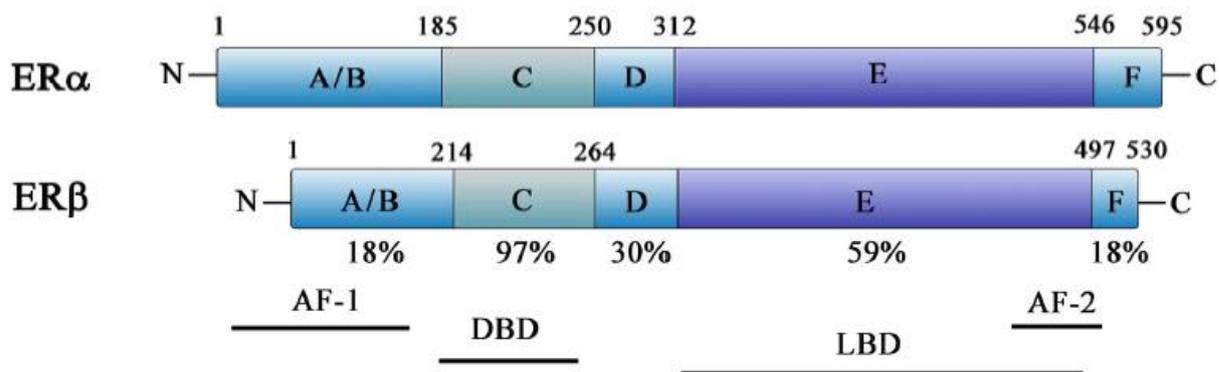


Figura 2: Estrutura dos ER α e ER β . (Adaptado de Becerra *et al.*, 2013)¹⁷

3.3. Vias de sinalização

O ER atua através de dois mecanismos, a via genómica e a via não genómica. A via genómica ou sinalização esteróide iniciada no núcleo (NISS) pode ocorrer segundo duas formas, clássica e não-clássica (Figura 3). Na via clássica, quando o estrogénio liga-se ao LBD do ER, o recetor é fosforilado havendo alteração da sua conformação. O recetor então dimeriza com outro recetor, migrando de seguida do citoplasma para o núcleo, onde se ligam a região de DNA promotora do gene, mais especificamente, aos elementos de resposta ao estrogénio (ERE), ocorrendo a indução do recrutamento de proteínas co-ativadoras. É então ativada a transcrição de genes, envolvidos na proliferação celular.¹³ Na via não-clássica, o ER modula a expressão de genes, não na sequência ERE, mas numa sequência de DNA alternativa. A esta sequência de DNA alternativa liga-se o dímero fos/jun que recruta o dímero ER e co-ativadores. Desta forma, o ER estabiliza a ligação do DNA e assim, promove a transcrição de genes.^{13,15} A via não genómica, também denominada por sinalização esteróide iniciada na membrana (MISS), é um mecanismo muito mais rápido que o genómico (Figura 3). O estrogénio liga-se ao ER que se encontra na face interna da membrana plasmática, que interage como dímero diretamente com proteínas adaptadoras, resultando na ativação de recetores de fatores de crescimento (GFRs) como o recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), recetor 2 do fator de crescimento da epiderme humana (HER2), com subsequente ativação de cinases citoplasmáticas, como a proteína cinase ativada por mitogénio (MAPK) e a proteína cinase B (PKB). Por sua vez, estas cinases fosforilam o ER nuclear e os seus co-reguladores, potenciando assim, a atividade genómica do ER, o que causa o aumento da expressão genética.^{13,15} Estas vias genómicas e não-genómicas parecem ser complementares e até mesmo sinérgicas.¹⁵

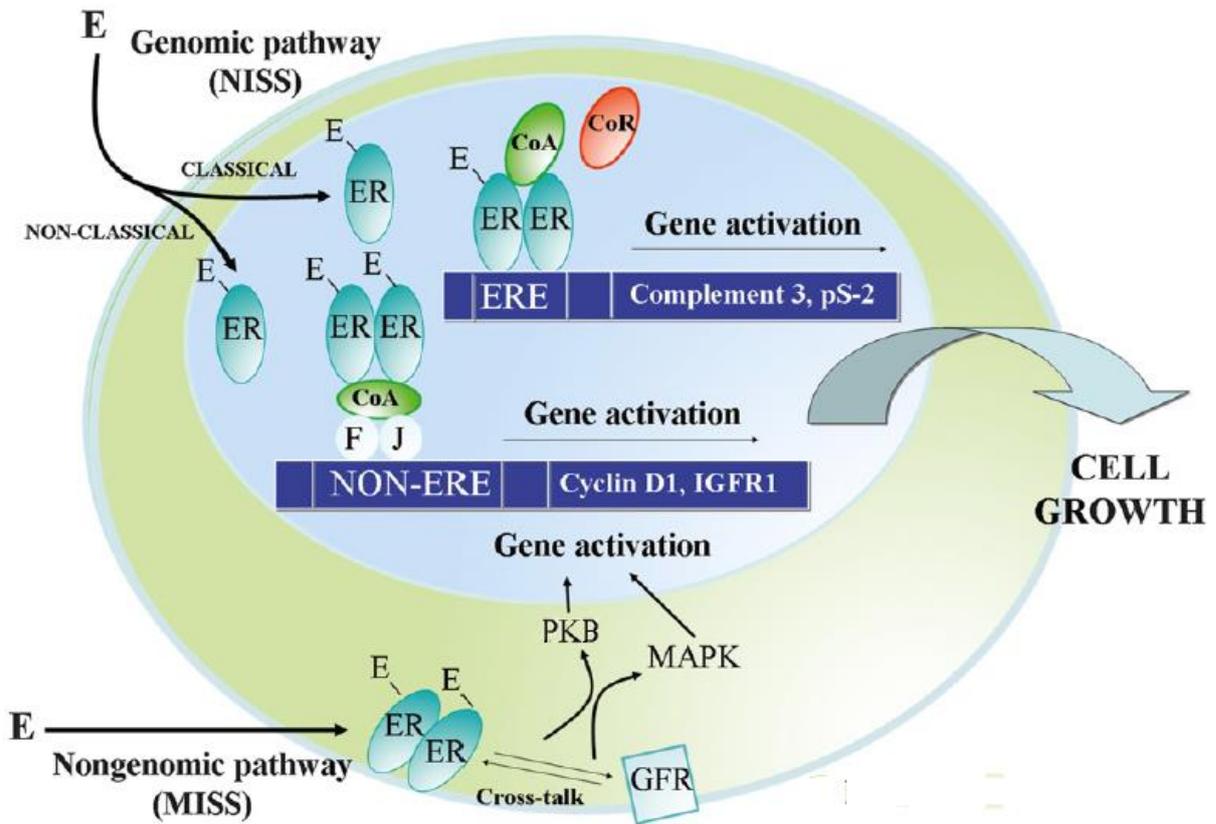


Figura 3: Sinalização esteróide iniciada no núcleo (NISS) via clássica e não-clássica, e sinalização esteróide iniciada na membrana (MISS). (Adaptado de Zilli *et al.*, 2009)¹⁵

4. Cancro da mama e abordagens terapêuticas

Existem várias opções de tratamento para o cancro da mama. A cirurgia (*v.g.* mastectomia parcial ou mastectomia total) e a radioterapia (*i.e.* utilização de raios de alta energia para destruir as células cancerígenas) são tratamentos locais. Os tratamentos sistémicos são a quimioterapia, a terapêutica hormonal e as terapêuticas dirigidas.^{1,4} A quimioterapia consiste na utilização de fármacos para matar as células cancerígenas e a terapêutica hormonal tem como finalidade impedir que as células malignas continuem a receber a hormona que estimula o seu crescimento.^{1,4} As terapêuticas dirigidas incluem anticorpos monoclonais e terapêuticas com pequenas moléculas, que bloqueiam o crescimento e a propagação das células malignas, sem prejudicar as células normais. Dirige-se a processos específicos das células que provocam o crescimento do cancro. Por exemplo, impedem a ligação às células cancerígenas, fatores de crescimento que as ajudariam a crescer mais rapidamente e a prolongar a sua vida.¹

4.1. Terapêutica hormonal

Como muitos dos cancros da mama são estrogénio-dependentes, diminuir os efeitos dos estrogénios por redução dos seus níveis, ou bloquear a sua ação ao nível dos ERs bloqueando assim a expressão genética mediada por estes, são hipóteses de terapia em doentes com este tipo de cancro.¹⁸

Uma das terapias disponíveis para doentes com cancro da mama estrogénio-dependente são os moduladores seletivos dos recetores de estrogénio (SERMs) e os sub-reguladores seletivos dos recetores de estrogénio (SERDs).^{15,18} O tamoxifeno e o raloxifeno são SERMs que possuem atividade agonista ou antagonista nos ERs dependente da seletividade dos tecidos. Estes compostos ligam-se ao ER, impedindo a ação das moléculas esteróides responsáveis pela proliferação das células cancerígenas.^{15,18} O tamoxifeno tem tido utilização clínica há mais de 30 anos, e o seu metabolito ativo, o 4-hidroxitamoxifeno, liga-se ao ER de uma forma similar ao E2, à exceção de que o AF-2 não é ativado permanecendo o AF-1 ativado. Ao não ocorrer a ativação do AF-2, o recetor fica apenas parcialmente ativado havendo diminuição do recrutamento de proteínas co-ativadoras.^{15,18} A sua terapêutica está limitada a 5 anos pelo facto de não haver benefícios em tratamentos mais prolongados. Torna-se ineficaz em alguns doentes, devido em parte, à sua atividade agonista intrínseca no ER.¹⁴ Os SERDs são antagonistas puros, desprovidos de qualquer atividade agonística em qualquer tecido. Fulvestrant é atualmente o único SERD em uso clínico e é empregado em caso de resistência ao tamoxifeno. O fulvestrant exibe um duplo modo de ação. Em primeiro lugar, o fulvestrant liga-se ao ER não havendo ativação nem do AF-1 nem do AF-2, induzindo assim a formação de um complexo inativo, bloqueando a dimerização ER e a localização nuclear. Em segundo lugar, este composto tem como alvo o ER para ubiquitinação antes da sua degradação pelo proteossoma.^{18,19}

A diminuição dos efeitos dos estrogénios por redução dos seus níveis pode ainda ser obtida através da inibição das enzimas essenciais envolvidas na sua biossíntese, como a aromatase, a estrona-sulfatase e a 17β -HSDI.³ A aromatase é uma enzima que converte a androstenediona e a testosterona em E1 e E2, respetivamente.¹⁷ Atualmente duas classes de inibidores da aromatase (AI) encontram-se em uso clínico: os esteróides, como o exemestano que se liga à enzima irreversivelmente, e os não esteróides, como o letrozol e o anastrozol que bloqueiam a enzima reversivelmente.^{15,20} O uso destes inibidores é apenas dirigido a mulheres na menopausa pelo facto de em mulheres pré-menopáusicas estes inibidores terem eficácia limitada por supressão estrogénica inadequada. A inibição da estrona-sulfatase igualmente reduz os níveis dos estrogénios, pois é uma enzima que

hidrolisa o sulfato de estrona a E1.¹² A enzima 17 β -HSDI tem um papel importante na formação do E2, e os seus inibidores serão abordados neste trabalho.

5. 17 β -Hidroxiesteróide desidrogenase (17 β -HSD)

As 17 β -HSDs são enzimas oxirredutoras que têm um papel importante na ativação e na inativação de hormonas esteróides, controlando o passo final da biossíntese de estrogénios e androgénios.²¹ Até à data, quinze tipos de 17 β -HSDs foram identificadas. Estas pertencem à família das desidrogenases de cadeia curta (SDR), à exceção da 17 β -HSD5 que é uma aldoceto redutase (AKR).²² As enzimas diferem na distribuição do tecido, nas preferências catalíticas, na especificidade do substrato, na localização subcelular e nos mecanismos de regulação.²¹ Todas requerem um cofator e os principais substratos para estas enzimas são hormonas.²²

As 17 β -HSDs do tipo 1, 7 e 12 são enzimas estrogénicas redutoras que formam o E2, sendo a enzima tipo 1 a que possui uma maior eficiência catalítica. Já as enzimas 17 β -HSDs do tipo 2, 4, 8, 10 e 14 são enzimas estrogénicas oxidativas que catalisam a inativação de E2, sendo a enzima tipo 2 a mais eficiente.²³

5.1. 17 β -Hidroxiesteróide desidrogenase I (17 β -HSDI)

A 17 β -HSDI é uma enzima citoplasmática redutora, que catalisa a redução do estrogénio inativo E1 para o estrogénio altamente ativo E2, usando nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) como cofator.²⁴ Esta proteína é um homodímero em que cada unidade consiste em 327 aminoácidos, com uma massa molecular de 35KDa por subunidade.²¹

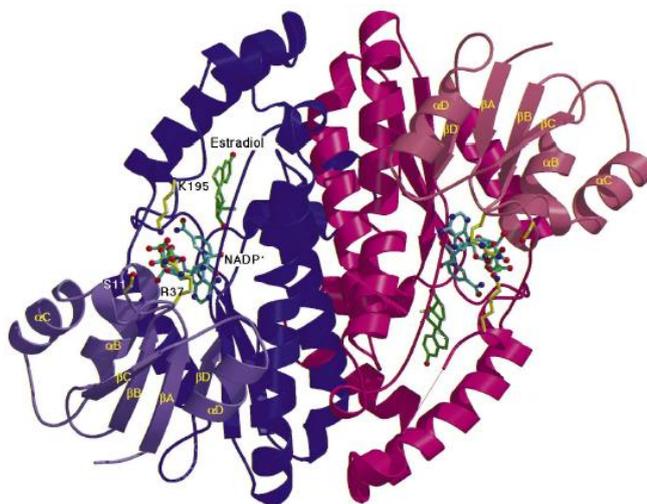


Figura 4: Enzima 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase I. (Adaptado de Mazza *et al.*, 1998)²⁵

A sua estrutura consiste em sete folhas β e 11 hélices α (Figura 4). Como as enzimas SDR, a 17 β -HSDI contém a dobra de Rossmann para a ligação do cofator e a sequência Tyr-X-X-X-Lys na região de ligação do ligando.^{24,26} A bolsa de ligação da 17 β -HSDI, ao qual se liga o substrato, é um túnel hidrofóbico estreito, que mostra um alto grau de complementaridade com substratos que se assemelham a E1 e ao E2, tanto em termos de estrutura como de volume. Duas regiões polares podem ser identificadas em cada extremidade do sítio de ligação do substrato, que correspondem ao grupo hidroxilo em C17 e ao grupo hidroxilo fenólico em C3 do E2. Cada um deles estabelece duas ligações de hidrogénio com Ser142/Tyr155 e His221/Glu282, respetivamente (Figura 5). Também contém uma região essencialmente apolar, correspondente ao núcleo hidrofóbico central (anéis B e C) do esteróide, que é mantido através de várias interações hidrofóbicas envolvendo vários aminoácidos.²⁶

Quanto ao mecanismo catalítico da formação do E2, a reação de redução envolve um próton e um hidreto (Figura 5). Um próton é transferido para a molécula de E1, onde o Tyr155 é o provável candidato a doar um próton para O17. O Ser142 deve ser capaz de compartilhar o seu próton com o Tyr155, estabilizando assim o estado não protonado do resíduo tirosina. Localizado no outro lado do esteróide, a nicotinamida do cofator transfere o hidreto para o C17. O papel principal do Lys159 é a estabilização do dinucleótido NADP⁺ por meio da interação com a nicotinamida ribose.^{24,27}

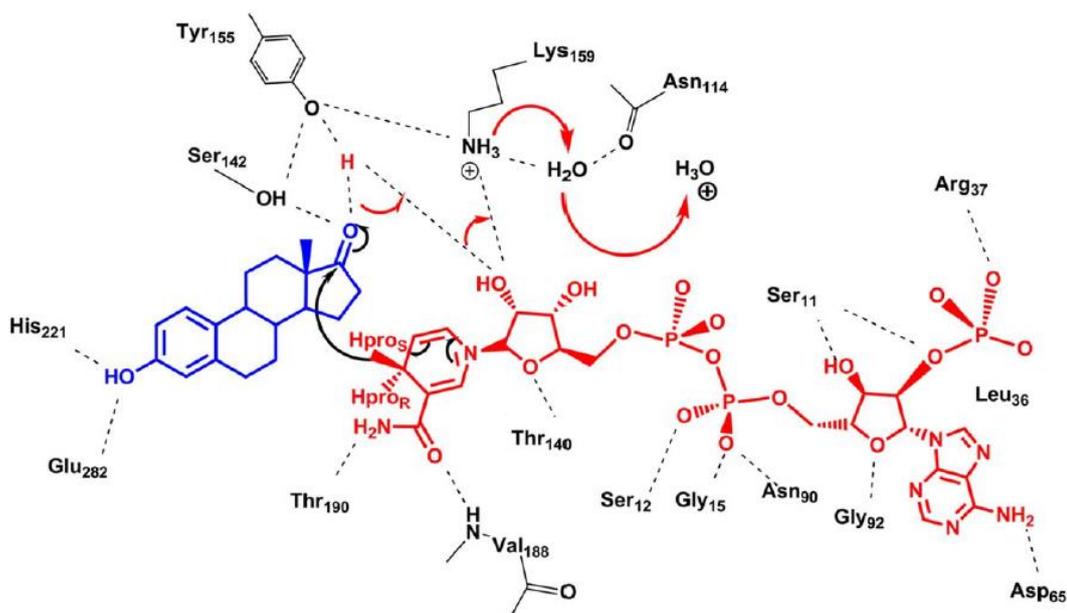


Figura 5: Mecanismo catalítico da 17 β -HSDI com a E1. (Negri *et al.*, 2010)²⁷

O substrato E1 está representado em azul, o cofator NADPH a vermelho e os aminoácidos a preto. As ligações hidrogénio estão em linhas tracejadas, enquanto a transferência de prótons são destacados com setas.

6. Inibidores da 17 β -Hidroxiesteróide desidrogenase I

Muitos grupos de investigadores têm estudado e publicado os seus trabalhos sobre possíveis inibidores da 17 β -HSDI. Estes compostos são uma abordagem terapêutica importante para o tratamento do cancro da mama estrogénio-dependente, já que inibem a formação do E2.

Neste trabalho serão unicamente abordados estudos de determinados compostos como possíveis inibidores da 17 β -HSD do tipo I, pois em células do cancro da mama estrogénio-dependente, esta é a isoforma redutora dominante e que tem maior eficiência catalítica.²³ Serão apenas referidos alguns dos estudos efetuados por investigadores, existindo muitos mais outros tipos de compostos em estudo com esta possível capacidade de inibição.

O composto ideal para ser um inibidor da 17 β -HSDI é aquele que tem a capacidade de inibir a 17 β -HSDI de forma seletiva e que não apresenta efeitos estrogénicos. É importante que esta seja seletiva, senão a sua baixa especificidade pode levar a efeitos inibitórios sobre outras enzimas esteróides, o que poderia levar a distúrbios do metabolismo de hormonas esteróides.²⁸ Se também tiver efeitos inibitórios sobre a aromatase e a estrona-sulfatase, ainda melhor. A enzima 17 β -HSDI como uma enzima citoplasmática, os seus inibidores também devem ter a capacidade de atravessar a membrana celular para que estes possam atuar sobre o seu alvo.²⁹ Os inibidores da 17 β -HSDI podem ser divididos em dois grupos, os inibidores esteróides e os inibidores não esteróides. Atualmente nenhum inibidor da 17 β -HSDI encontra-se no mercado nem em ensaio clínicos.

6.1. Inibidores esteróides

A maioria dos inibidores da 17 β -HSDI é baseada em estruturas de esteróides, especialmente os substratos naturais da 17 β -HSDI, a E1 e o E2. As suas estruturas podem ser convenientemente utilizadas para investigar a forma como substituições em posições diferentes do núcleo esteróide afeta a afinidade de ligação de inibidores e para desenvolver relações estrutura atividade. Embora a grande maioria destes inibidores esteróides sejam baseados no núcleo estra-1,3,5(10)-trien-3-ol, esteróides modificados com um anel E e algumas progestinas, que são esteróides de 21 átomos de carbono baseados no núcleo *pregnano*, também estão incluídos.

6.1.1. Progestinas

Algumas progestinas (Figura 6) mostraram inibir a atividade da 17β -HSDI, bem como a atividade da estrona-sulfatase em ensaios de células.

A medrogestona (composto 1) é uma progestina que tem a mesma atividade fisiológica que a progesterona e pode ser usada em patologias deficientes da hormona natural. Em células do cancro da mama T-47D, este composto inibiu a conversão de E1 em E2, apresentando um IC_{50} de $0,45\mu\text{M}$. Ou seja, a concentração de medrogestona necessária para obter 50% de inibição da atividade da 17β -HSDI em células T-47D foi $0,45\mu\text{M}$.³⁰

O acetato de nomegestrol (composto 2), uma progestina utilizada como agente contraceptivo, e o metabolito de didrogesterona, o 20-dihidro-didrogesterona (composto 4), que é usado em situações em que o organismo não produz progesterona suficiente, em células T-47D, inibiram a 17β -HSDI com um valor IC_{50} de $0,8\mu\text{M}$ e $9\mu\text{M}$, respetivamente. Ambos possuíram também a capacidade de inibir a estrona-sulfatase.^{31,32}

A tibolona (composto 5) é um composto esteróide sintético usado clinicamente na terapia de reposição hormonal na pós-menopausa. A tibolona administrada por via oral é reduzida no fígado e no intestino ou convertida localmente em tecidos alvo a 3α - e 3β -hidroxi-tibolona (composto 6 e 7). Outro metabolito, um isómero da tibolona (composto 8) é também formado. A tibolona inibiu a atividade da 17β -HSDI em células T-47D com um IC_{50} de $2,0\mu\text{M}$. Já o metabolito 3α -OH foi mais fraco, com um IC_{50} de $4,83\mu\text{M}$, enquanto o metabolito 3β -OH foi um melhor inibidor com um valor IC_{50} de $1,4\mu\text{M}$. O isómero da tibolona apresentou um IC_{50} de $35,3\mu\text{M}$. A tibolona e os seus metabolitos também inibiram a estrona-sulfatase.³⁴

Apesar de as progestinas terem capacidade de inibir a 17β -HSDI, bem como a estrona-sulfatase, também existem algumas progestinas que induzem a atividade da 17β -HSDI, o que pode ser uma das razões para que estes esteróides não sejam utilizados para a inibição da 17β -HSDI. Quanto à sua seletividade sobre a 17β -HSD2, nada se conhece.³⁵

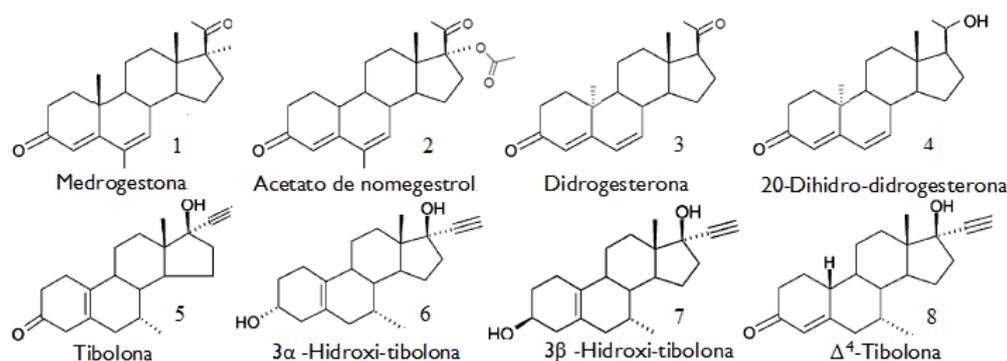


Figura 6: Progestinas com atividade inibitória sobre a 17β -HSDI.
(Adaptado de Gooyer *et al.*, 2003)³³

6.1.2. Derivados estratrieno com substituintes flúor

Uma outra classe de inibidores são os derivados estratrieno com substituintes flúor na posição 17 do esteróide. O flúor no C17 é um aceitador de ligação de hidrogénio por estar ligado a um carbono com hibridização sp^3 . Potencialmente imita o grupo carbonilo ou hidroxilo de E1 ou E2.³⁶ Num estudo realizado, vários compostos foram sintetizados e avaliados quanto às suas atividades inibitórias para vários tipos de 17β -HSDs (Figura 7). Os compostos mostraram inibir várias isoformas da 17β -HSD, em que o inibidor mais potente da 17β -HSDI foi o composto 9, o 7,17,17-trifluoro-(7 α)-estra-1,3,5(10)-trien-3-ol com uma inibição de 74% a uma concentração de $2\mu\text{M}$. Alterações, como a remoção de um grupo 7 α -flúor (composto 10) e a introdução de um grupo metoxi ou etoxi no C2 (composto 11 e 12), diminuíram a inibição da 17β -HSDI, com uma inibição de 61,1%, 46,9% e 45,8% a uma concentração de $2\mu\text{M}$, respetivamente. Dentre os compostos analisados, a maior parte foram inibidores não seletivos, à exceção do composto 13 que foi seletivo para a 17β -HSD5, e do composto 9 que mostrou alguma seletividade para a enzima do tipo I.³⁶

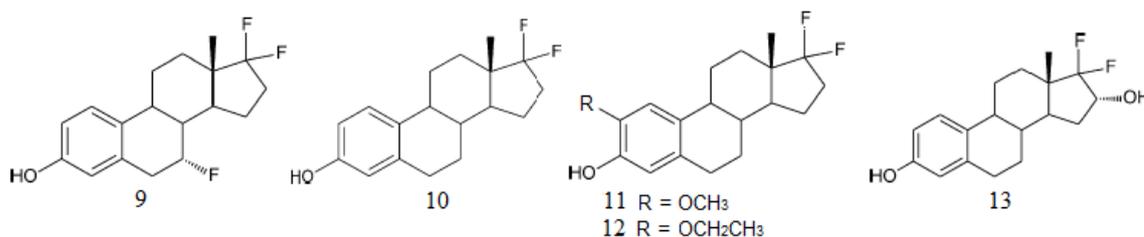


Figura 7: Derivados estratrieno com substituintes flúor. (Adaptado de Deluca *et al.*, 2006)³⁶

O acoplamento do composto 9 com a enzima 17β -HSDI e NADP^+ sugeriu uma ligação de hidrogénio entre o 17 β -flúor e os aminoácidos Ser142 e Tyr155. Também sugeriu que o 7 α -flúor ocupa uma bolsa adicional formada por Pro187, Val225 e Phe226, o que pode explicar a ligeira melhoria da atividade e da seletividade deste composto em comparação com o composto 10 (Figura 8).³⁶

Apesar de a maioria destes derivados fluorados mostrarem atividade inibidora, estes possuem a desvantagem da sua falta de seletividade entre as isoformas. Além disso, os possíveis efeitos estrogénicos dos derivados não são claros. No entanto, uma vez que conduzem a inibidores seletivos de determinadas 17β -HSDs como o composto 13 para a 17β -HSD5, estas estruturas são um ponto interessante de partida para a conceção de inibidores mais potentes e seletivos.³⁶

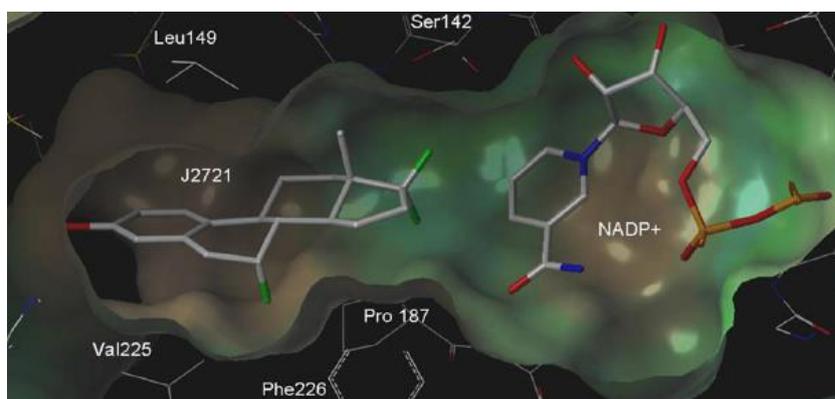


Figura 8: Representação do complexo 17β-HSDI, NADP⁺ e o composto 9. (Deluca *et al.*, 2006)³⁶

6.1.3. Compostos híbridos E2 adenosina

Uma forma de aumentar a potência dos inibidores é gerar compostos que, devido à sua estrutura molecular, não só atacam o local de ligação do substrato, mas também sofrem interações com o local de ligação ao cofator.²⁹ Na sua estrutura possuem uma porção de análogos do cofator NADPH, que pode interagir com o sítio de ligação do cofator, ligada a uma porção de E1 ou E2 que interage com o sítio de ligação do substrato.^{29,37} Tentou-se então descobrir qual a parte do cofator que era essencial na ligação à 17β-HSDI, e foi observado que a adenosina difosfato (ADP) e a NADPH têm afinidades de ligação semelhantes ao 17β-HSDI. Além disso, na estrutura complexa 17β-HSDI/E2/NADP⁺, o anel de nicotinamida tem uma densidade de elétrons mais fraca do que o resto do cofator, que pode ser devido à falta de interações diretas com o local ativo. Concluiu-se então que a porção adenosina era por si só suficiente para imitar o cofator. Sendo assim, a porção de adenosina e o substrato E2 foram ligados com um ligante de carbonilo alquilo, ligado à posição C16β do esteróide para o C5' da ribose da adenosina.²⁹ Um ensaio enzimático em homogeneizados de células mostrou que um ligante de comprimento de cadeia de 8 metilenos apresenta uma forte atividade biológica contra a 17β-HSDI, com um IC₅₀ de 52 nM para a transformação de E1 para E2, sendo o composto EM-1745 (composto 14) um inibidor competitivo reversível (Figura 9).²⁹

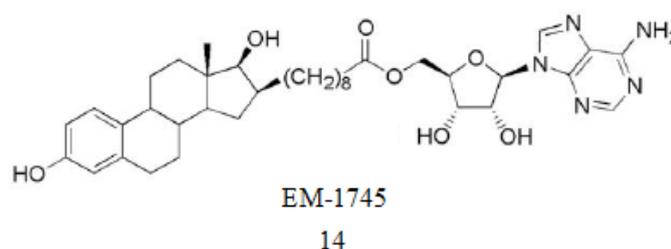


Figura 9: EM-1745 com atividade inibitória sobre a 17β-HSDI. (Adaptado de Fournier *et al.*, 2008)²⁹

Mas algumas desvantagens foram identificadas com o uso deste composto. Em células intactas ou em modelos *in vivo*, o inibidor pode não penetrar na membrana celular e pode ser metabolizado no local da ligação éster. É importante que o inibidor tenha a capacidade de atravessar a membrana celular, pois a 17 β -HSDI é uma enzima citoplasmática.²⁹ Para ultrapassar este problema, um novo inibidor foi então concebido e sintetizado. Esse composto contém um substituto *meta* anilina como imitador da porção de adenosina, com a esperança que interaja com a cadeia lateral do Asp65 ou Ser11, os quais estão presentes no complexo 17 β -HSDI/EM-1745. A ligação éster foi substituída por uma ligação carbono-carbono, que é muito mais resistente ao metabolismo. Foram utilizados espaçadores de 13-15 metilenos para compensar a perda da unidade de ligação éster e ribose, na qual verificou-se que o composto 15, com 13 metilenos foi o melhor, e o grupo de ácido carboxílico o melhor como substituinte na porção do cofator (Figura 10). Este composto numa concentração de 0,1 μ M inibiu apenas 27% da transformação de E1 para E2 pela 17 β -HSDI, uma vez que o cofator proposto não conserva todas as interações da porção de adenosina na enzima.²⁹ O seu grupo carboxilato quando está numa posição adequada para interagir com o resíduo Ser11 ou Arg67, o grupo amino, que está no mesmo anel aromático (no mesmo plano), não tem uma orientação apropriada para formar simultaneamente uma ligação de hidrogénio com o Asp65.

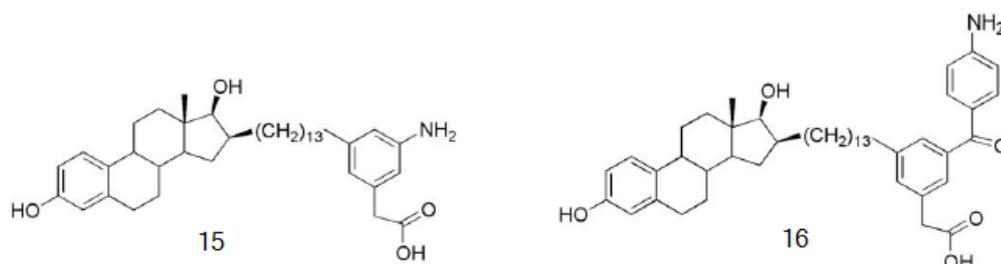


Figura 10: Inibidores híbridos de primeira e segunda geração. (Adaptado de Fournier *et al.*, 2008)²⁹

Para corrigir este problema, foi então gerado um novo composto no qual foi usado dois anéis aromáticos diferentes (composto 16) (Figura 10).²⁹ Assim, este composto, para além de mostrar interações entre o grupo carboxilato e o Arg67, já consegue também mostrar interações entre o grupo amino e o Asp65. O composto também mostra uma interação entre o Ser11 e o grupo ceto que está ligado a dois anéis aromáticos no complexo composto 16/17 β -HSDI (Figura 11).²⁹

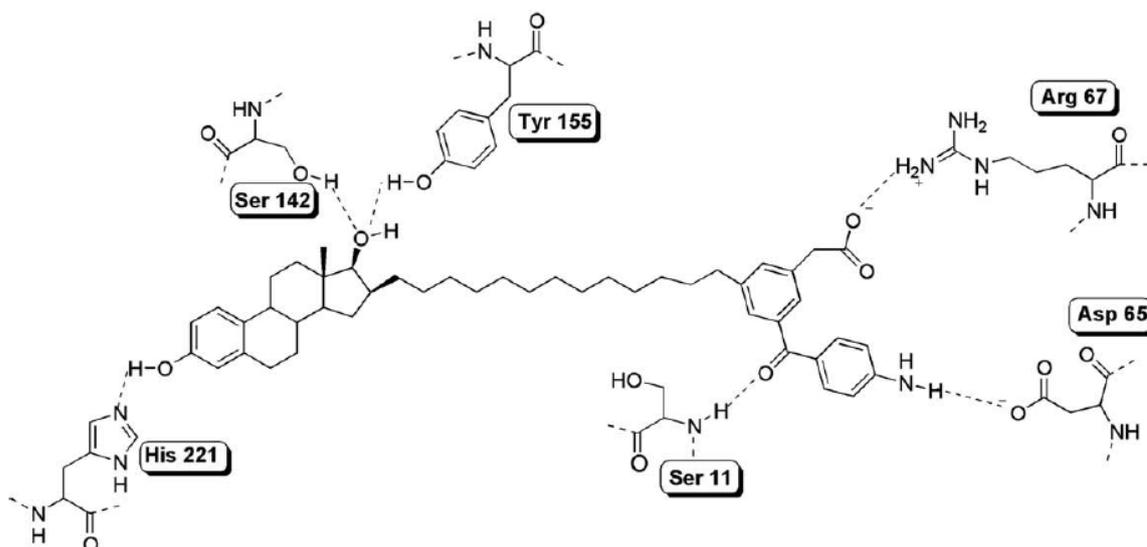


Figura 11: Representação do complexo 17 β -HSDI com o composto 16. (Fournier *et al.*, 2008)²⁹

6.1.4. Esteróide modificado com um anel E

Foi desenvolvido um potente inibidor seletivo da 17 β -HSDI, o chamado CC-156 (Figura 12). Este possui um grupo carbamoilbenzil, que imita a porção nicotinamida do cofator NADPH, que está envolvida em interações importantes com aminoácidos no local catalítico da enzima. Este trata-se de um inibidor reversível e competitivo contra a E1.³⁸

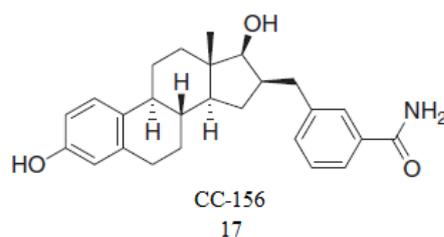


Figura 12: Inibidor esteróide CC-156. (Adaptado de Ouellet *et al.*, 2011)³⁸

Apesar de ter uma potente atividade de inibição da enzima 17 β -HSDI, como muitos dos inibidores esteróides, revelou ser um pouco estrogénico quando testado em linhas celulares estrogénio dependentes. De facto, devido ao seu núcleo E2, ocorre a ativação do recetor estrogénio, provocando assim a proliferação celular.³⁸ A grande potência deste inibidor levou a que se determinasse as interações e as ligações responsáveis pela elevada afinidade entre o inibidor e a enzima, nomeadamente, interações fortes entre o 3-fenol do inibidor e os aminoácidos His221 e Glu282 da enzima, entre o 17-OH e o Ser142 e, mais importante, entre a porção benzamida e o Phe192 e o Asn152. Foi desenvolvido um composto (composto 18) de forma a eliminar esta atividade estrogénica residual (Figura 13). O

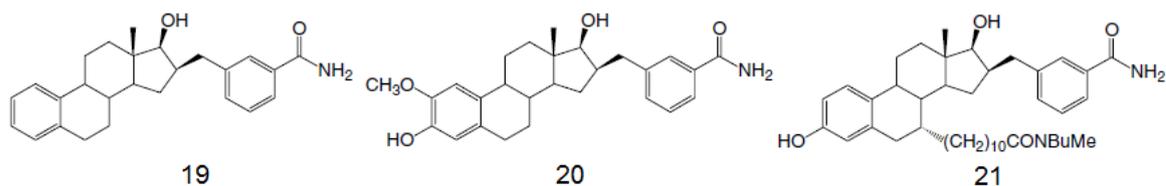


Figura 14: Derivados C16 de estradiol. (Adaptado de Laplante *et al.*, 2008)³⁹

Outras estratégias foram aplicadas na posição 3 do composto CC-156. Assim surgiu o composto 22, um inibidor competitivo e irreversível, que para além do grupo carbamoilbenzil na posição C16, possui um grupo hidrófobo na posição 3 do núcleo esteróide (Figura 15). Assim, não é possível gerar uma ligação de hidrogénio com o ER, removendo a atividade estrogénica residual associado com o seu núcleo de E2.^{40,41}

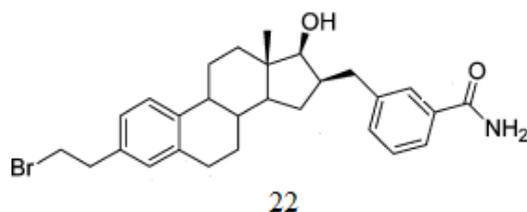


Figura 15: Derivado 3-substituído-16β-(*m*-carbamoilbenzil)-estradiol. (Adaptado de Maltais *et al.*, 2014)⁴⁰

Este, não tendo um grupo doador de H na posição C3, não estabelece também ligações de hidrogénio com as cadeias laterais dos resíduos Glu282 e His221 do centro ativo, sugerindo um modo de ação diferente. O composto estabelece interações com o His221, destacando a possibilidade de um ataque nucleófilo do His221 ao grupo bromoetilo, formando assim uma ligação covalente (Figura 16).⁴⁰ Este é um potente inibidor da 17β-HSDI e sem atividade estrogénica tanto *in vitro* como *in vivo*. Ainda no estudo, em ratos fêmeas sujeitos a ovariectomia, foram inoculadas células cancerígenas da mama humana T-47D, em que após 32 dias de tratamento com o composto 22 e a EI, o tamanho dos tumores destes ratos foram completamente reduzidos ao nível do grupo controle (sem tratamento EI). É a primeira vez que um inibidor da 17β-HSDI é capaz de diminuir o tamanho final do tumor em 100%.⁴¹ Este novo inibidor representa um candidato promissor para estudos clínicos para o tratamento e o diagnóstico de doenças estrogénio dependentes como o cancro da mama.

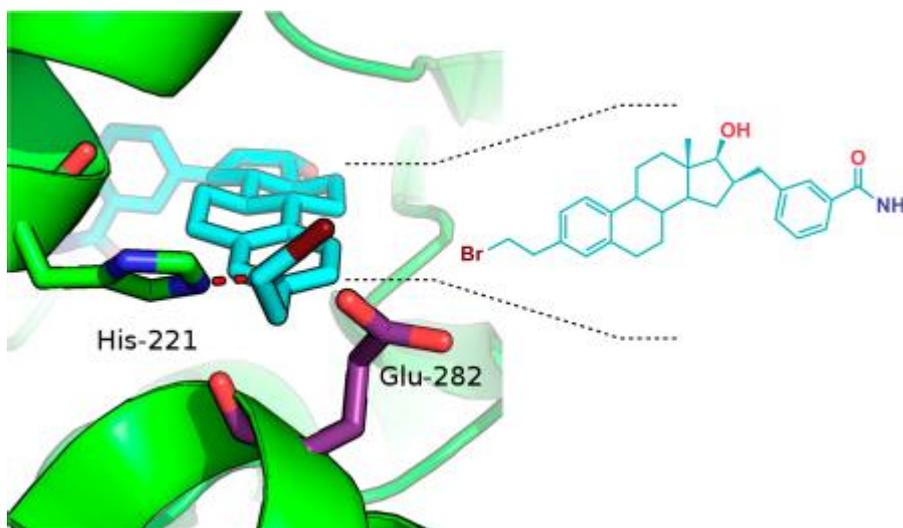


Figura 16: Representação do complexo 17 β -HSDI com o composto 22. (Adaptado Maltais *et al.*, 2014)⁴⁰

6.2. Inibidores não esteróides

A maioria dos estudos de inibidores da 17 β -HSDI tem-se concentrado nas modificações das estruturas de esteróides. Recentemente tem havido um esforço de vários grupos de investigadores para pesquisar potenciais inibidores não esteróides da 17 β -HSDI. Os inibidores não esteróides têm vantagens sobre os inibidores esteróides, que incluem facilidade de síntese e seletividade.

6.2.1. Fitoestrogénios e compostos relacionados

Os fitoestrogénios são compostos naturais encontrados em plantas e que podem ser obtidos através da dieta a partir de vegetais e frutas.⁴² Podem dividir-se em 3 classes: flavonóides, coumestanos e lignanos. O grupo dos flavonóides inclui flavanonas, flavonas e isoflavonas (Figura 17).⁴³ Estes compostos ligam-se aos recetores de estrogénio, pois possuem na sua estrutura química um anel fenólico aromatizado, com um grupo hidroxilo. Em vários estudos, vários fitoestrogénios foram avaliados quanto à sua capacidade de inibir a 17 β -HSDI, nomeadamente flavanonas, flavonas e isoflavonas. Nas flavonas e isoflavonas, os grupos hidroxilo fenólicos nas posições 4' e 7 podem ser considerados para imitar o grupo hidroxilo na posição 3 do estrogénio, respetivamente. Os anéis A e C das flavonas e isoflavonas foram pensados para imitar anéis C e D e os anéis A e B do E2, respetivamente.⁴²

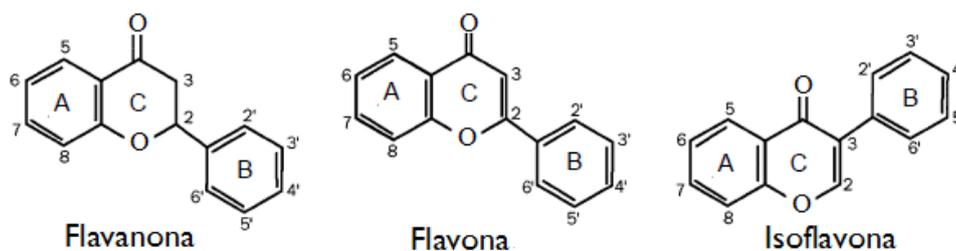


Figura 17: Estrutura dos flavonóides: flavanona, flavona e isoflavona. (Adaptado de Rice *et al.*, 2008)⁴⁴

Através de estudos de relação estrutura-atividade, concluiu-se que os flavonóides hidroxilados na posição 5 e 7 no anel A e na posição 4' no anel B são os inibidores mais potentes da 17 β -HSDI, como por exemplo a apigenina que possui um IC₅₀ de 0,2 μ M (Figura 18). O coumestrol, um coumestano, também é um dos fitoestrogénios com maior inibição da 17 β -HSDI, com um IC₅₀ de 0,3 μ M (Figura 18).⁴²

Apesar de alguns compostos fitoestrogénicos serem potentes inibidores da 17 β -HSDI, estes compostos não são úteis como inibidores terapêuticos pois são muitas vezes estrogénicos ou não são específicos para a inibição da 17 β -HSDI. Estes compostos também têm características desfavoráveis de farmacocinética.

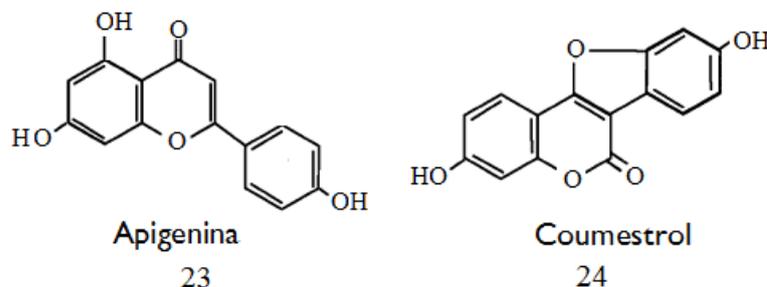


Figura 18: Inibidores fitoestrogénicos: apigenina e coumestrol. (Adaptado de Rice *et al.*, 2008)⁴⁴

6.2.2 Derivados gossipol

Gossipol é um composto polifenólico que é encontrado nas sementes de algodão (Figura 19). A sua função é proteger os algodoeiros de ataques de insetos. ⁴⁵ Derivados gossipol foram estudados, verificando-se que os compostos 25 e 26 apresentam a capacidade de inibir a 17 β -HSDI (80-90% de redução na atividade enzimática), tratando-se de inibidores competitivos que competem com NADPH para o seu local de ligação, a dobra de Rossman (Figura 19).⁴⁵

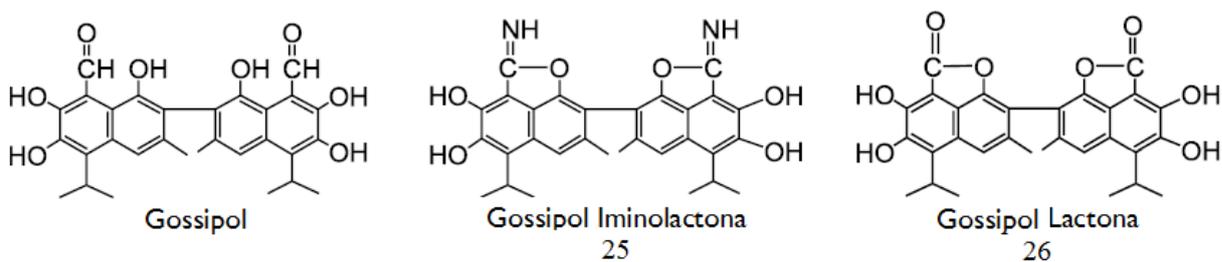


Figura 19: Derivados gossipol com atividade inibitória sobre a 17β -HSDI. (Adaptado de Brown *et al.*, 2003)⁴⁵

Estudos *docking* indicaram que o composto 26 ocupa a região de ligação do cofator, estabelecendo 8 ligações de hidrogênio importantes com Tyr155, Ser142, Gly141, Lys159, Leu93, Gly92, Lys195, e Arg37 (Figura 20). O composto 25 também apresenta orientações semelhantes ao composto 26.⁴⁵ Estudos *docking* são métodos computacionais para a identificação do modo de ligação de duas ou mais estruturas moleculares, como por exemplo uma molécula candidata a fármaco e uma enzima.

Os derivados gossipol, apesar de inibirem a 17β -HSDI, possuem a desvantagem de falta de seletividade, uma vez que o cofator não é específico para a 17β -HSDI. Sendo assim, a sua potência e sua especificidade podem ser otimizadas através de um desenho racional de compostos que interagem com ambas as regiões, a região de ligação do cofator e a região de ligação do substrato da enzima. Isso pode ser obtido ao incorporar uma substituição na posição 5 do isopropilo com um butileno ligado ao substrato mimético.⁴⁵

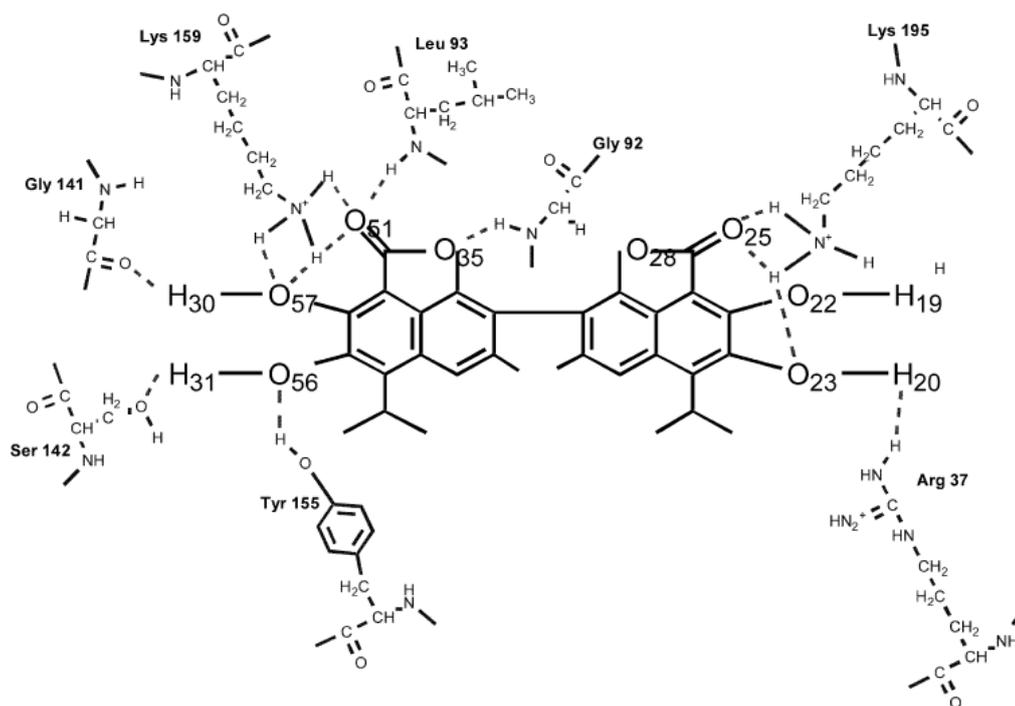


Figura 20: Representação do composto 17β -HSDI com o composto 26. (Brown *et al.*, 2003)⁴⁵

6.2.3. Bis(hidroxifenil)azoles

Como os inibidores têm de imitar o substrato esteróide, estes compostos devem conter dois grupos hidroxifenil para imitar o anel A (interação com His221/Glu282) e o anel D (interação com Ser142/Tyr155) do esteróide, devendo estes grupos estarem ligados por um anel aromático para imitar a forma do plano do substrato. Substituições diferentes na posição do grupo OH fenólico foram portanto investigadas, para descobrir qual o melhor que se adapta ao sítio ativo.⁴⁶ O composto mais interessante foi o oxazole 2,5-disubstituído (composto 27), que mostrou uma alta inibição seletiva da 17 β -HSDI com um IC₅₀ de 0,31 μ M e apresentou muito baixa afinidade para o ER (Figura 21). O facto de este composto inibir a formação de E2 com um valor de IC₅₀ na gama nanomolar, mostra que este composto é capaz de entrar na célula para ser ativo na enzima alvo. A sua boa permeabilidade é apoiada pelos dados de células Caco-2, em que estas apresentam propriedades morfológicas e fisiológicas do intestino humano delgado, sendo um modelo adequado para a predição de absorção por via oral.⁴⁶

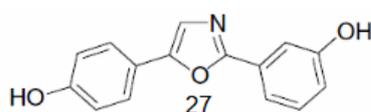


Figura 21: Inibidor oxazole 2,5-disubstituído. (Adaptado de Bey *et al.*, 2008)⁴⁶

Quanto ao modo de ligação do composto 27 na enzima, dois modos podem ser esperados devido à sua pseudo-simetria, uma vez que cada grupo hidroxifenil poderia imitar o anel A do esteróide. O modo mais energeticamente favorável é ilustrado na figura 22. O substituinte *para*-hidroxifenilo e o heterociclo estão no mesmo plano, enquanto a porção de *meta*-hidroxifenilo é rodado 32° fora deste plano. Esta conformação permite o inibidor estabelecer interações de ligações de hidrogénio com His221/Glu282 (porção *para*-hidroxifenil) e Ser142/Tyr155 (porção *meta*-hidroxifenil). O composto 27 pode, portanto, ser um bom composto para o desenvolvimento de um agente terapêutico clinicamente aplicável para o tratamento de doenças dependentes de estrogénio.⁴⁶

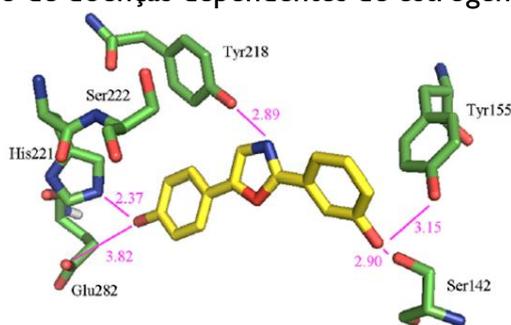


Figura 22: Representação do complexo 17 β -HSDI com o composto 27. (Adaptado de Bey *et al.*, 2008)⁴⁶

7. Conclusão

O cancro da mama estrogénio-dependente é uma forma de cancro muito comum na mulher, tendo o E2 um papel importante no seu crescimento e desenvolvimento. Assim, estratégias que inibam os seus efeitos são uma boa opção terapêutica para este tipo de cancro. São propostas várias hipóteses de tratamento, tais como o uso de SERMs, SERDs e Als. A enzima 17β -HSDI, ao ser uma das enzimas responsáveis pela formação do E2, efetivamente é um alvo biológico atraente para o desenvolvimento de inibidores úteis para o tratamento e a prevenção do cancro da mama estrogénio-dependente. A maioria dos inibidores esteróides da 17β -HSDI tem uma elevada capacidade de inibição da enzima, mas possui muitas vezes a desvantagem de possuir efeitos estrogénicos. Já a maioria dos inibidores não esteróides da 17β -HSDI não apresenta essa desvantagem, acabando também por possuir outras desvantagens.

Apesar de alguns compostos já apresentarem evidências de serem potenciais inibidores desta enzima, será ainda necessário um estudo mais aprofundado para obter resultados mais conclusivos e exatos. Deste modo, poder-se-á assim avançar para ensaios clínicos caso estes sejam realmente determinados como compostos inibidores da 17β -HSD, seletivos, sem atividade estrogénica e com potencial no tratamento do cancro da mama.

Quanto ao papel do farmacêutico no doente oncológico com cancro da mama, este é fundamental no tratamento farmacológico do doente, tanto na preparação de medicamentos, bem como para melhorar a segurança e resultados terapêuticos e, conseqüentemente, a qualidade de vida do doente. Este, como profissional de saúde, tem também o dever de incentivar as mulheres no seu rastreio.

8. Referências bibliográficas

1. Liga Portuguesa contra o Cancro. [Acedido a 20 de Março de 2014]. Disponível na Internet: www.ligacontracancro.pt
2. Allan, G. M., Bubert, C., Vicker, N., Smith, A., Tutill, H. J., Purohit, A., Reed, M. J., & Potter, B.V.L. (2006). Novel, potent inhibitors of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type I. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *248*, 204-207.
3. Gupta, A., Kumar, B. S., & Negi, A. S. (2013). Current status on development of steroids as anticancer agents. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, *137*, 242-270.
4. Administração Regional do Algarve, I.P. Ministério da saúde. [Acedido 20 de Março de 2014]. Disponível na Internet: http://www.arsalgarve.min-saude.pt/docs/cancro_da_mama.pdf
5. Pearce, S. T., & Jordan, V. C. (2004). The biological role of estrogen receptors α and β in cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *50*, 3-22.
6. National Cancer Institute. [Acedido 22 de Março de 2014]. Disponível na Internet: <http://www.cancer.gov/cancertopics/understandingcancer/estrogenreceptors/AllPages>
7. Thomas, M. P., & Potter, B. V. L. (2013). The structural biology of estrogen metabolism. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, *137*, 27– 49.
8. Simpson, E., Rubin, G., Clyne, C., Robertson, K., O'Donnell, L., Davis, S., & Jones, M. (1999). Local estrogen biosynthesis in males and females. *Endocrine-Related Cancer*, *6*, 131-137.
9. Gulliver, L. S. M. (2013). Estradiol Synthesis and Metabolism and Risk of Ovarian Cancer in Older Women Taking Prescribed or Plant-derived Estrogen Supplementation. *Journal Steroids & Hormonal Science* S12:003.
10. Luu-The, V. (2013). Assessment of steroidogenesis and steroidogenic enzyme functions. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, *137*, 176-182.
11. Mitrunen, K., & Hirvonen A. (2003). Molecular epidemiology of sporadic breast cancer: The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. *Mutation Research*, *544*, 9-41.
12. Purohit, A., & Foster, P. A. (2012). Steroid sulfatase inhibitors for estrogen- and androgen-dependent cancers. *Journal of Endocrinology*, *212*, 99-110.
13. Osborne, C. K., & Schiff, R. (2005). Estrogen-Receptor Biology: Continuing Progress and Therapeutic Implications. *Journal of Clinical Oncology*, *23*, 1616-1622.

14. Lemke, T. L., & William, D. A. (2008). Foye's Principles of Medicinal Chemistry (6.^a ed.). Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins.
15. Zilli, M., Grassadonia, A., Tinari, N., Giacobbe, A., Gildetti, S., Giampietro, J., Natoli, C., & Iacobelli, S.(2009) Molecular mechanisms of endocrin Molecular mechanisms of endocrine py of breast cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1795 , 62-81.
16. Ascenzi, P., Bocedi, A., & Marino, M. (2006). Structure-function relationship of estrogen receptor α and β : Impact on human health. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 299-402.
17. Becerra, R. G., Santos, N., Díaz, L., & Camacho, J. (2013) Mechanisms of Resistance to Endocrine Therapy in Breast Cancer: Focus on Signaling Pathways, miRNAs and Genetically Based Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 108-145.
18. Renoir, J. M., Marsaud, V., & Lazennec, G. (2013) Estrogen receptor signaling as a target for novel breast cancer therapeutics. *Biochemical Pharmacology*, 85, 449-465.
19. Carlson, R. W. (2005) The History and Mechanism of Action of Fulvestrant. *Clinical Breast Cancer*, 6, S5-S8.
20. Hong, Y., & Chen, S. (2011) Aromatase, estrone sulfatase, and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase: Structure-function studies and inhibitor development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 340, 120-126.
21. Adamski, J., & Jakob, F. J. (2001) A guide to 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 171, 1-4.
22. Jansson, A. (2009). 17 Beta-hydroxysteroid dehydrogenase enzymes and breast cancer. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 114, 64–67.
23. Smuc, T., & Rizner, T. L. (2009). Expression of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases and other estrogen-metabolizing enzymes in different cancer cell lines. *Chemico-Biological Interactions*, 178, 228-233.
24. Breton, R., Housset, D., Mazza, C., & Fontecilla-Camps, J. C. (1996).The structure of a complex of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase with estradiol and NADP⁺ identifies two principal targets for the design of inhibitors. *Structure*, 4, 905-915.
25. Mazza, C., Breton, R., Housset, D., & Fontecilla-Camps, J. C. (1998). Unusual Charge Stabilization of NADP⁺ in 17b-Hydroxysteroid. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 8145-8152.
26. Schuster, D., Nashev, L. G., Kirchmair, J., Laggner, C., Wolber, G., Langer, T., & Odermatt, A. (2008). Discovery of Nonsteroidal 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase I Inhibitors by Pharmacophore-Based Screening of Virtual Compound Libraries. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51, 4188-4199.

27. Negri, M., Recanatini, M., & Hartmann, R. W. (2010). Insights in 17 β -HSDI Enzyme Kinetics and Ligand Binding by Dynamic Motion Investigation. *PLoS ONE*, 5.
28. Day, J. M., Tutill, H. J., Purohit, A., & Reed, M. J. (2008). Design and validation of specific inhibitors of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases for therapeutic application in breast and prostate cancer, and in endometriosis. *Endocrine-Related Cancer*, 15, 665-692.
29. Fournier, D., Poirier, D., Mazumdar, M., & Lin, S. X. (2008). Design and synthesis of bisubstrate inhibitors of type I 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase: Overview and perspectives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43, 2298-2306.
30. Chetrite, G.S., Ebert, C., Wright, F., Philippe, J. C., & Pasqualini, J. R. (1999). Effect of Medrogestone on 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in the hormone-dependent MCF-7 and T-47D human breast cancer cell lines. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 68, 51-56.
31. Chetrite, G., Paris, J., Botella, J., & Pasqualini, J. R. (1996). Effect of Nomegestrol Acetate on Estrone sulfatase and 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Activities in Human Breast Cancer Cells. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol*, 58, 525-531.
32. Chetrite, G. S., Thole, H. H., Philippe, J. C., & Pasqualini, J. R. (2004). Dydrogesterone (Duphaston[®]) and its 20-Dihydro-derivative as Selective Estrogen Enzyme Modulators in Human Breast Cancer Cell Lines. Effect on Sulfatase and on 17 β -Design and synthesis of bisubstrate inhibitoHydroxysteroid Dehydrogenase (17 β -HSD) Activity. *Anticancer Research*, 24, 1433-1438.
33. Gooyer, M. E., Deckers, G. H., Schoonen, W. G. E. J., Verheul, H. A. M., & Kloosterboer, H. J. (2003). Receptor profiling and endocrine interactions of tibolone. *Steroids*, 68, 21-30.
34. Van de Ven, J., Donker, G. H., Sprong, M., Blankenstein, M. A., & Thijssen, J. H. H. (2002). Effect of tibolone (Org OD14) and its metabolites on aromatase and estrone sulfatase activity in human breast adipose stromal cells and in MCF-7 and T47D breast cancer cells. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 81, 237-247.
35. Poutanen, M., Moncharmont, B., & Vihko, R. (1992). 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Gene Expression in Human Breast Cancer Cells: Regulation of Expression by a Progestin. *Cancer Research*, 52, 290-294.
36. Deluca, D., Moller, G., Rosinus, A., Elger, W., Hillisch, A., & Adamski, J. (2006). Inhibitory effects of fluorine-substituted estrogens on the activity of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 248, 218-224.
37. Qiu, W., Campbell, R. L., Gangloff, A., Dupuis, P., Boivin, R. P., Tremblay, M. R., Poirier, D., & Lin, S. X. (2002). A concerted, rational design of type I 17 β -hydroxysteroid

- dehydrogenase inhibitors: estradiol-adenosine hybrids with high affinity. *The FASEB journal*, *16*, 1829-1831.
38. Ouellet, E., Ayan, D., & Poirier, D. (2011). Synthesis and preliminary evaluation of a modified estradiol-core bearing a fused γ -lactone as non-estrogenic inhibitor of 17β -hydroxysteroid dehydrogenase type I. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *21*, 5510-5513.
 39. Laplante, Y., Cadot, C., Fournier, M. A., & Poirier, D. (2008). Estradiol and estrone C-16 derivatives as inhibitors of type I 17β -hydroxysteroid dehydrogenase: Blocking of ER^+ breast cancer cell proliferation induced by estrone. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *16*, 1849-1860.
 40. Maltais, R., Ayan, D., Trottier, A., Barbeau, X., Lague, P., Bouchard, J. E., & Poirier, D. (2014). Discovery of a Non-Estrogenic Irreversible Inhibitor of 17β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type I from 3-Substituted- 16β -(m-carbamoylbenzyl)-estradiol Derivatives. *Medicinal Chemistry*, *57*, 204-222.
 41. Ayan, D., Maltais, R., Roy, J., & Poirier, D. (2012). A New Nonestrogenic Steroidal Inhibitor of 17β - Hydroxysteroid Dehydrogenase Type I Blocks the Estrogen-Dependent Breast Cancer Tumor Growth Induced by Estrone. *Molecular Cancer Therapeutics*, *11*, 2096-2104.
 42. Le Bail, J. C., Champavier, Y., Chuliaa, A. J., & Habriouxl, G. (2000). Effects of Phytoestrogens on Aromatase, 3β and 17β -hydroxysteroid dehydrogenase activities and human breast cancer cells. *Life Sciences*, *66*, 1281-1291.
 43. Le Bail, J.C., Laroche, T., Marre-Fournier, F., & Habrioux, G. (1998). Aromatase and 17β -hydroxysteroid dehydrogenase inhibition by Flavonoids. *Cancer Letters*, *133*, 101-106.
 44. Rice, S., & Whitehead S. A. (2008). Phytoestrogens oestrogen synthesis and the breast cancer. *Journal of Steroids Biochemistry & Molecular Biology*, *108*, 186-195.
 45. Brown, W. M., Metzger, L. E., Barlow, J. P., Hunsaker, L. A., Lorraine M. Deck, L. M., Royer, R. E., & Vander Jagt, D. L. (2003). 17β -Hydroxysteroid dehydrogenase type I: computational design of active site inhibitors targeted to the Rossmann fold. *Chem. Biol. Interac.*, *143-144*, 481-491.
 46. Bey, E., Oberwinkler, S. M., Kruchten, P., Frotscher, M., Werth, R., Oster, A., Algül, O., Neugebauer, A., & Hartmann, R. W. (2008). Design, synthesis and biological evaluation of bis(hydroxyphenyl) azoles as potent and selective non-steroidal inhibitors of 17β -hydroxysteroid dehydrogenase type I (17β -HSDI) for the treatment of estrogen-dependent diseases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *16*, 6423-6435.