

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas

Túlio Resende Freitas

**CARACTERIZAÇÃO DE PROVÁVEIS MECANISMOS DE AÇÃO DE DERIVADOS
SINTÉTICOS HETEROCÍCLICOS E PRECURSORES EM MODELO DE TUMORES
SÓLIDOS E LEUCEMIAS**

BELO HORIZONTE
2023

Túlio Resende Freitas

**CARACTERIZAÇÃO DE PROVÁVEIS MECANISMOS DE AÇÃO DE DERIVADOS
SINTÉTICOS HETEROCÍCLICOS E PRECURSORES EM MODELO DE TUMORES
SÓLIDOS E LEUCEMIAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Prof. Dr. Adriano de Paula Sabino

Coorientador: Prof. Dr. Fernando de Pilla Varotti

BELO HORIZONTE

2023

F866c Freitas, Túlio Resende.
Caracterização de prováveis mecanismos de ação de derivados sintéticos heterocíclicos e precursores em modelo de tumores sólidos e leucemias [recurso eletrônico] / Túlio Resende Freitas. – 2023.
1 recurso eletrônico (125 f.) : il. : pdf.

Orientador: Adriano de Paula Sabino.
Coorientador: Fernando de Pilla Varotti.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Compostos heterocíclicos – Teses. 2. Antineoplásicos – Teses. 3. Apoptose – Teses. 4. Câncer de mama – Teses. 5. Neoplasias ovarianas – Teses. 6. Leucemia – Teses. I. Sabino, Adriano de Paula. II. Varotti, Fernando de Pilla. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 616.994

Elaborado por Luciene Aparecida Costa – CRB-6/2811



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

"Caracterização de prováveis mecanismos de ação de derivados sintéticos heterocíclicos e precursores em modelo de tumores sólidos e leucemias"

TÚLIO RESENDE FREITAS

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia vinte e sete de outubro de dois mil e vinte e três, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores:

Prof. Adriano de Paula Sabino (Orientador)
UFMG

Prof. Fernando de Pilla Varotti
UFSJ

Prof. Ruben Dario Sinisterra Millan
UFMG

Prof. Adolfo Henrique de Moraes Silva
UFMG

Profa. Silmara Nunes Andrade
UFSJ

Prof. Whocely Victor de Castro
UFSJ

Belo Horizonte, 27 de outubro de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Whocely Victor de Castro, Usuário Externo**, em 31/10/2023, às 18:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adriano de Paula Sabino, Professor do Magistério Superior**, em 01/11/2023, às 17:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ruben Dario Sinisterra Millan, Professor do Magistério Superior**, em 07/11/2023, às 11:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Silmara Nunes Andrade, Usuária Externa**, em 07/11/2023, às 12:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adolfo Henrique de Moraes Silva, Professor do Magistério Superior**, em 13/11/2023, às 12:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernando de Pilla Varotti, Usuário Externo**, em 13/11/2023, às 16:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2680159** e o código CRC **4B183ECA**.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, aos meus pais e irmão, que tanto fizeram por mim sem esperar nada em troca.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Rozangela e Antônio por todo apoio e amor incondicional que me proporcionaram. Sem vocês chegar até aqui seria impossível. Serei eternamente grato por tudo.

Ao meu irmão, Gustavo, pelo companheirismo e por sempre me apoiar nas minhas decisões.

À minha família, por estarem sempre ao meu lado.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Adriano de Paula Sabino e Prof. Dr. Fernando de Pilla Varotti, pelos valiosos ensinamentos e pela confiança em mim depositada. A vocês, meu sincero agradecimento, respeito e admiração.

Aos colegas do Laboratório de OncoHematologia, do LINBIO e do Laboratório de Bioquímica Medicinal, pela amizade e por estarem sempre presentes nos momentos cruciais da minha jornada acadêmica.

Aos meus amigos, agradeço por todos os momentos vividos juntos nesses últimos anos, por todo incentivo e pela oportunidade de fazer parte de suas vidas, mesmo quando distâncias geográficas nos separam.

A UFMG, a UFSJ e a UFF, pelo espaço cedido e pela oportunidade de desenvolver este projeto.

Ao corpo docente e aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas, pelo conhecimento e tempo compartilhado.

Ao CNPq, a Capes e a FAPEMIG pelo apoio financeiro.

A todos vocês, o meu muito obrigado!!!

RESUMO

O câncer ocupa atualmente a posição de segunda principal causa de morte em escala global. Em geral, os tratamentos oncológicos existentes acarretam frequentes efeitos colaterais indesejados e demonstram eficácia limitada. Os compostos heterocíclicos, que compõem a estrutura fundamental de muitos medicamentos comercializados, desempenham um papel de destaque e bem estabelecido como agentes antitumorais. Nesse contexto, este estudo objetivou avaliar, por meio de experimentação *in vitro* e abordagens computacionais, a ação citotóxica, a capacidade de indução de apoptose, as alterações no ciclo celular e na expressão gênica, bem como possíveis interações moleculares de vinte e três (23) novos compostos heterocíclicos e precursores contra linhagens celulares associadas ao câncer de mama (MDA-MB-231), câncer de ovário (TOV-21G), leucemia mieloide aguda (THP-1), leucemia promielocítica aguda (HL-60) e leucemia mieloide crônica (K-562). Para alcançar tal objetivo, foram empregados ensaios de citotoxicidade, análises por citometria de fluxo, avaliação da expressão gênica, estudo de biodisponibilidade oral e modelagem molecular. Entre os compostos analisados, **GSCB76**, **GSCB82** e **GSCB85** demonstraram ser os mais potentes e seletivos, exibindo citotoxicidade consideravelmente aumentada [$1,18 \mu\text{M} < \text{IC}_{50} < 7,66 \mu\text{M}$] e seletividade direcionada para as linhagens MDA-MB-231 e THP-1. A investigação sobre a indução de apoptose e alterações no ciclo celular evidenciou que os compostos **GSCB76**, **GSCB82** e **GSCB85** promoveram principalmente um aumento de células THP-1 em apoptose após 48 horas de tratamento, enquanto **GSCB76** e **GSCB82** induziram um acúmulo de células nas fases G0/G1 nesta mesma linhagem. No âmbito da expressão gênica, foi constatada uma modificação no perfil de genes envolvidos em possíveis mecanismos de resistência e apoptose. Ademais, a análise *in silico* revelou que os três compostos mais ativos possuem potencial interação com a proteína Histona Desacetilase 8 (HDAC8), um alvo já associado ao câncer, e também apresentam um alto potencial *drug-like*, sugerindo a perspectiva de desenvolvimento de protótipos que podem ser administrados por via oral. Tais resultados fortalecem o potencial uso desses compostos como parte da busca por novas abordagens terapêuticas no campo da oncologia.

Palavras-chave: Compostos heterocíclicos; apoptose; câncer de mama; câncer de ovário; leucemias.

ABSTRACT

Cancer currently ranks as the second-leading cause of death on a global scale. In general, existing oncological treatments entail frequent undesirable side effects and demonstrate limited efficacy. Heterocyclic compounds, constituting a fundamental structural unit in many marketed drugs, play a well-established and prominent role as antitumoral agents. In this context, this study aimed to assess, through *in vitro* experimentation and computational approaches, the cytotoxic action, apoptosis-inducing capacity, alterations in the cell cycle and gene expression, as well as possible molecular interactions of twenty-three (23) new heterocyclic compounds and precursors against cell lines associated with breast cancer (MDA-MB-231), ovarian cancer (TOV-21G), acute myeloid leukemia (THP-1), acute promyelocytic leukemia (HL-60), and chronic myeloid leukemia (K-562). To achieve this objective, cytotoxicity assays, flow cytometry analyses, gene expression evaluation, oral bioavailability study, and molecular modeling were employed. Among the compounds analyzed, **GSCB76**, **GSCB82**, and **GSCB85** were found to be the most potent and selective, exhibiting considerably increased cytotoxicity [$1,18 \mu\text{M} < \text{IC}_{50} < 7,66 \mu\text{M}$] and targeted selectivity toward the MDA-MB-231 and THP-1 cell lines. Investigation into apoptosis induction and cell cycle alterations revealed that compounds **GSCB76**, **GSCB82**, and **GSCB85** primarily promoted an increase in apoptotic THP-1 cells after 48 hours of treatment, while **GSCB76** and **GSCB82** induced cell cycle arrest in the G₀/G₁ phases in this same cell line. In terms of gene expression, a modification in the profile of genes involved in potential resistance and apoptosis mechanisms was observed. Furthermore, *in silico* analysis revealed that the three most active compounds have the potential to interact with Histone Deacetylase 8 (HDAC8), a target already associated with cancer, and also exhibit a high drug-like potential, suggesting the prospect of developing prototypes that can be administered orally. These results strengthen the potential use of these compounds as part of the search for new therapeutic approaches in the field of oncology.

Keywords: Heterocyclic compounds; apoptosis; breast cancer; ovary cancer; leukemias.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características do processo de metástase. Fonte. Adaptado de (ALIZADEH; SHIRI; FARSINEJAD, 2014).....	19
Figura 2. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por gênero, exceto pele não melanoma. Fonte. (INCA, 2023).	20
Figura 3. Progressão do ciclo celular e principais proteínas reguladoras. Fonte. Adaptado de (OTTO; SICINSKI, 2017).	28
Figura 4. Mecanismos apoptóticos: (A) via intrínseca; (B) via extrínseca. Fonte. Adaptado de (BAIG et al., 2016).	32
Figura 5. O estresse ambiental atribuído a compostos tóxicos pode gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) que causam danos celulares e apoptose. Os radicais livres reagem com o oxigênio para produzir superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que reage com óxido nítrico (NO^{\cdot}) para produzir peroxinitrito ($ONOO^-$) ou sofre dissociação para gerar H_2O_2 , catalisado pela SOD (superóxido dismutase). O H_2O_2 pode ser detoxificado por antioxidantes, como a catalase e a GSH/glutathiona peroxidase, ou pode gerar OH^{\cdot} por meio da reação de Fenton catalisada por metais. Fonte. Adaptado de (REDZADUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016).....	35
Figura 6. Classificação dos quimioterápicos comumente utilizados de acordo com seu mecanismo de ação. Fonte. Adaptado de (BAIG et al., 2016).....	36
Figura 7. Estrutura química Benzoxazol (a) e Oxazol (b). Fonte. Adaptado de (WONG; YEONG, 2021).	57
Figura 8. Indução de apoptose pelos compostos GSCB76 (A), GSCB82 (B) e GSCB85 (C) em células THP-1 após 48 h de exposição. As células apoptóticas foram analisadas por citometria de fluxo e o ponto gráfico exibe a fluorescência Anexina V (eixo x, escala logarítmica) versus fluorescência IP (eixo y, escala logarítmica). (CV) controle de vida; (IC_{50} e $IC_{50}/2$) tratamentos.	59
Figura 9. Porcentagem de células totais em apoptose ($Q_2 + Q_3$ – Figura 8) induzida pelos compostos GSCB76 , GSCB82 e GSCB85 em células THP-1 após 48 h de exposição as respectivas concentrações IC_{50} e $IC_{50}/2$. Os resultados apresentam média e desvio padrão de pelo menos 2 resultados independentes. ** p valor $\leq 0,01$; *** p valor $\leq 0,001$; **** p valor $\leq 0,0001$	60

Figura 10. Padrão de marcação de Indução de apoptose pelos compostos GSCB82 (A) e GSCB85 (B) em células MDA-MDB-231 após 48 h de exposição. As células apoptóticas foram analisadas por citometria de fluxo e o ponto gráfico exhibe a fluorescência Anexina V (eixo x, escala logarítmica) versus fluorescência IP (eixo y, escala logarítmica). (CV) controle de vida; (IC ₅₀ e IC ₅₀ /2) tratamentos.	61
Figura 11. Porcentagem de células totais em apoptose (Q2 + Q3 – Figura 10) induzida pelos compostos GSCB82 e GSCB85 em células MDA-MB-231 após 48 h de exposição as respectivas concentrações IC ₅₀ e IC ₅₀ /2. Os resultados apresentam média e desvio padrão de pelo menos 2 resultados independentes. ** p valor ≤ 0,01; *** p valor ≤ 0,001; **** p valor ≤ 0,0001.	62
Figura 12. Efeito do tratamento com os compostos GSCB82 e GSCB85 no ciclo celular nas células MDA-MB-231 após 48 h de exposição. As fases G0/G1, S e G2/M foram determinadas pela análise do conteúdo de DNA após marcação com IP e analisadas em citometria de fluxo. A porcentagem de células em cada fase foi quantificada pelo <i>software FlowJo x10.0.7</i> . Os resultados apresentam média e desvio padrão de pelo menos 2 resultados independentes. ** p valor ≤ 0,01; *** p valor ≤ 0,001; **** p valor ≤ 0,0001.	64
Figura 13. Efeito do tratamento com os compostos GSCB76 , GSCB82 e GSCB85 no ciclo celular nas células THP-1 após 48 h de exposição. As fases G0/G1, S e G2/M foram determinadas pela análise do conteúdo de DNA após marcação com IP e analisadas em citometria de fluxo. A porcentagem de células em cada fase foi quantificada pelo <i>software FlowJo x10.0.7</i> . Os resultados apresentam média e desvio padrão de pelo menos 2 resultados independentes. ** p valor ≤ 0,01; *** p valor ≤ 0,001; **** p valor ≤ 0,0001.	65
Figura 14. Efeito do tratamento com os compostos GSCB82 (A) e GSCB85 (B) no padrão de expressão gênica de células MDA-MB-231 após 48 h de exposição. * p valor ≤ 0,05; ** p valor ≤ 0,01.	68
Figura 15. Efeito do tratamento com os compostos GSCB76 (A), GSCB82 (B) e GSCB85 (C) no padrão de expressão gênica de células THP-1 após 48 h de exposição. * p valor ≤ 0,05; ** p valor ≤ 0,01; *** p valor ≤ 0,001; **** p valor ≤ 0,0001.	70
Figura 16. Representação bidimensional das interações intermoleculares entre a protease 1W22 e o ligante ou composto: (A) ligante cristalográfico; (B) GSCB76 ; (C) GSCB82 ; (D) GSCB85	75

Figura 17. Representação tridimensional da interação entre a protease 1W22 (cinza) e o ligante ou composto (verde): (A) ligante cristalográfico; (B) **GSCB76**; (C) **GSCB82**; (D) **GSCB85**.76

Figura 18. Potencial mecanismo de ação dos compostos GSCB76, GCSB82 e GSCB85 contra as linhagens tumorais MDA-MB-231 (A) e THP-1 (B), com destaque para a possível indução de senescência celular e apoptose pós-tratamento. **Fonte.** Elaborado pelo autor, 2023.79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfis imunofenotípicos para a classificação molecular por imunohistoquímica dos tumores de mama. Fonte. Adaptado de (CINTRA et al., 2012; CIRQUEIRA et al., 2011; GOLDBIRSCH et al., 2011).	22
Tabela 2. Regras de predição de biodisponibilidade oral propostas por Lipinski, Veber, Egan, Muegge e Ghose. Fonte. Adaptado de (PROTTI et al., 2021).	52
Tabela 3. Valores de IC ₅₀ obtido a partir do ensaio de viabilidade celular (MTT) após 48 h de tratamento contra as linhagens MDA-MB-231, TOV-21g, WI-26 VA4, K-562, THP-1, HL-60 e PBMC.	55
Tabela 4. Índice de Seletividade (IS) dos compostos mais ativos obtidos a partir do ensaio de viabilidade celular (MTT).	56
Tabela 5. Propriedades físico-químicas e moleculares preditas para as moléculas sintetizadas.	73
Tabela 6. Energia de ligação pela ancoragem molecular dos compostos contra o OOMT.	74

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Estrutura química, massa molecular e solubilidade dos compostos cedidos.	42
Quadro 2. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores diretos (F) e reversos (R) utilizados na qPCR.....	51
Quadro 3. Quantificação de RNA total.	109

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AMPK	Proteína Quinase Ativada por 5'-adenosina monofosfato
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BRCA1	Gene de Suscetibilidade ao Câncer de Mama 1
BRCA2	Gene de Suscetibilidade ao Câncer de Mama 2
CDIS	Carcinoma Ductal <i>in situ</i>
CDK	Proteínas Quinases Dependentes de Ciclina
CEO	Câncer Epitelial de Ovário
CMTN	Câncer de Mama Triplo Negativo
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
EROs	Espécie Reativa de Oxigênio
HER2	Receptor 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano
IC ₅₀	Concentração mínima que inibe 50% a viabilidade celular
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IP	Iodeto de Propídio
IS	Índice de Seletividade
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crônica
mRNA	RNA mensageiro
mtDNA	DNA mitocondrial
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazol
NOX	NADPH oxidase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PBS	<i>Phosphate Buffered Solution</i>
Ph	Cromossomo Philadelphia
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
RPMI	Meio de Cultura (desenvolvido no <i>Roswell Park Memorial Institute – RPMI</i>)
SFB	Soro Fetal Bovino
TPM	Transição de Permeabilidade Mitocondrial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Levantamento Teórico	18
1.1.1 Câncer.....	18
1.1.2 Câncer de mama.....	20
1.1.3 Câncer de Ovário	23
1.1.4 Leucemias	24
1.1.4.1 Leucemia Mieloide Aguda (LMA)	25
1.1.4.2 Leucemia Mieloide Crônica (LMC)	27
1.1.5 O ciclo celular e a apoptose no câncer.....	28
1.1.5.1 Ciclo celular.....	28
1.1.5.2 Apoptose e espécies reativas de oxigênio (EROs)	30
1.1.6 Quimioterapia.....	35
1.1.7 Compostos Heterocíclicos.....	38
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	40
2.1 Justificativa	40
2.2 Objetivos	41
2.2.1 Objetivo Geral	41
2.2.2 Objetivos Específicos	41
3 MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1 Obtenção dos Compostos	42
3.2 Ensaios Biológicos	45
3.2.1 Cultivo Celular	45
3.2.2 Ensaio de Viabilidade Celular.....	46
3.2.3 Determinação do IC ₅₀ para as linhagens celulares	47
3.2.4 Determinação do Índice de Seletividade (IS) para as linhagens celulares.....	47
3.2.5 Avaliação de apoptose por marcação com Anexina V/IP analisada por citometria de fluxo.....	48

3.2.6 Análise do ciclo celular.....	48
3.2.7 Análise da Expressão Gênica	49
3.2.7.1 Extração de RNA.....	49
3.2.7.2 Confeção de cDNA	50
3.2.7.3 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)	50
3.3 Estudo <i>In Silico</i>	51
3.3.1 Predição dos perfis <i>drug-like</i> dos compostos mais ativos	51
3.3.2 Modelagem Molecular	52
3.4 Análises estatísticas	54
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1 Ensaio de Viabilidade Celular	55
4.2 Avaliação de apoptose por marcação com Anexina V/IP analisada por citometria de fluxo	57
4.3 Análise do ciclo celular.....	64
4.4 Expressão gênica.....	67
4.5 Perfis <i>drug-like</i> dos compostos mais ativos	72
5 CONCLUSÕES.....	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
ANEXOS	98

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, assim como em outros países do mundo, o perfil de morbimortalidade por câncer tem se elevado cada vez mais nas últimas décadas (INCA, 2019). Dentre os tratamentos existentes, a quimioterapia é um dos métodos mais extensivamente utilizado (POPOLIN et al., 2017; VIDAL et al., 2014).

De forma geral, a maioria dos pacientes responde muito bem inicialmente à quimioterapia. No entanto, a sua eficácia e segurança continuam a ser uma preocupação primordial, assim como a sua toxicidade e outros efeitos secundários (CHEN et al., 2018; POPOLIN et al., 2017). Além disso, um aumento significativo da recorrência da doença devido ao surgimento da resistência aos medicamentos quimioterápicos utilizados já vem sendo relatado, fazendo necessária cada vez mais a busca por tratamentos alternativos aos já disponibilizados hoje (CHEN et al., 2018; VIDAL et al., 2014).

O uso de compostos heterocíclicos no tratamento de diversas doenças já é bem descrito na literatura, incluindo o câncer. Estudos relatam que a introdução de heteroátomos está intimamente relacionada com a melhoria de habilidades como a solubilidade, polaridade e ligação de hidrogênio e consequente otimização de ADMET (Adsorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) em potentes candidatos terapêuticos (AMEWU et al., 2021). Dessa forma, todos esses fatos nos encorajaram a testar neste trabalho, derivados heterocíclicos inéditos e precursores em um painel de linhagens tumorais com o intuito de identificar novas moléculas bioativas contra o câncer bem como descrever os prováveis mecanismos de ação envolvido no processo.

1.1 Levantamento Teórico

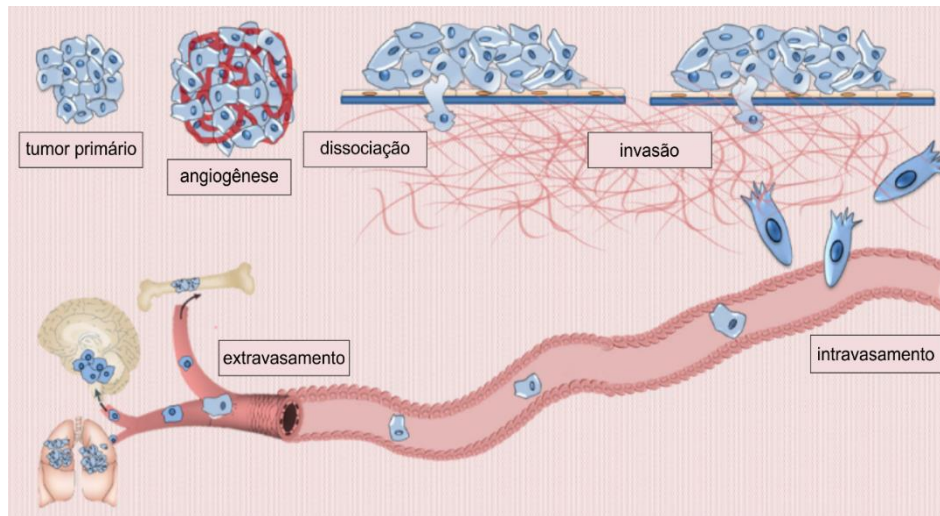
1.1.1 Câncer

Atualmente, o câncer representa o principal desafio de saúde pública mundial e um dos principais obstáculos para o aumento da expectativa de vida da humanidade (SUNG et al., 2021). Segundo o *Global Cancer Observatory* (Globocan), aproximadamente 19,3 milhões de novos casos de câncer foram estimados em 2020 em todo o mundo (FERLAY et al., 2021; INCA, 2023; SUNG et al., 2021). De modo geral, as maiores taxas de incidência de câncer são observadas em países desenvolvidos, enquanto taxas intermediárias são vistas na América do Sul e Central, no Leste Europeu e na maioria do Sudeste Asiático, incluindo a China. Já as menores taxas são encontradas na maioria da África e no Sul e Oeste da Ásia, incluindo a Índia (INCA, 2023). Diante desse cenário, é crucial entender o que define o câncer e suas características.

O câncer é definido como um termo genérico para um grande grupo de doenças, caracterizadas pela rápida proliferação de células anormais, que podem afetar qualquer parte do corpo (INCA, 2023). Dividindo-se rapidamente, essas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores ou neoplasias malignas que crescem além de seus limites habituais, podendo invadir partes adjacentes do corpo e se espalhar para outros órgãos, processo conhecido como metástase (Figura 1) (ALIZADEH; SHIRI; FARSINEJAD, 2014; WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2018). O entendimento dessas características é essencial para direcionar esforços na prevenção, diagnóstico precoce e tratamento adequado, visando melhorar a perspectiva dos pacientes e enfrentar esse grave problema de saúde global.

A mudança do tecido normal para uma lesão primária do câncer pode ser causada por diversos fatores genéticos e também por três diferentes categorias de agentes externos (INCA, 2019). Conhecidos como carcinogênicos, esses agentes externos são comumente classificados em: (1) físico – radiação ultravioleta e ionizante; (2) biológico – infecções de certos vírus, bactérias ou parasitos, ou (3) químico – amianto, aflatoxinas, arsênico, componentes da fumaça do tabaco, álcool, entre outros (INCA, 2019; WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2018).

Figura 1. Características do processo de metástase. **Fonte.** Adaptado de (ALIZADEH; SHIRI; FARSINEJAD, 2014).



Em termos amplos, os processos de oncogênese e carcinogênese, em sua maioria, ocorrem de forma gradual, podendo levar vários anos para que uma célula tumoral dê origem a um tumor maligno visível (INCA, 2019). Esse processo, no entanto, pode envolver uma complexa interação de diversos fatores genéticos, como quebras e perdas cromossômicas, mutações, ampliações, instabilidade gênica e mecanismos epigenéticos. Dentre a ampla variedade de genes envolvidos nesse processo, dois se destacam por seu papel fundamental no desenvolvimento do câncer e são conhecidos como proto-oncogenes e genes supressores de tumor (DANTAS et al., 2009; KONTOMANOLIS et al., 2020).

Os proto-oncogenes são genes normalmente expressos em indivíduos saudáveis e são responsáveis pela codificação de produtos (oncoproteínas) que estimulam a proliferação celular. Atuando como reguladores-chave, esses produtos desempenham diferentes funções essenciais, desde operar como fatores de crescimento até transmitir sinais celulares importantes e agir como fatores de transcrição nuclear (KONTOMANOLIS et al., 2020). Em contrapartida, os genes supressores de tumor ou antioncogenes são os responsáveis por regular negativamente a expressão das oncoproteínas (VIDEIRA et al., 2002). Assim, um desequilíbrio nesse sistema pode alterar a função dos genes envolvidos. Um exemplo disso é a manifestação de oncogenes ativados em células cancerosas, que resulta em um crescimento celular desordenado e um acúmulo de sucessivas anormalidades genéticas (DANTAS et al., 2009).

O termo "oncogene ativado" é usado para se referir a um proto-oncogene alterado que, quando ativado, passa a codificar produtos que estimulam a proliferação celular de forma desregulada. Essa desregulação é um fator-chave no desenvolvimento do câncer e pode ser resultado de modificações genéticas que transformam os proto-oncogenes em oncogenes ativos. Embora diversos proto-oncogenes tenham sido identificados em forma ativada e oncogênica nos genomas de tumores humanos, as modificações genéticas precisas que levam a essas ativações ainda não foram totalmente esclarecidas (DANTAS et al., 2009; KONTOMANOLIS et al., 2020; VIDEIRA et al., 2002).

1.1.2 Câncer de mama

A carcinogênese de células normais das glândulas mamárias ou dos ductos presentes na mama feminina é a principal causa de neoplasia maligna que afeta significativamente mulheres em todo o mundo (CHU et al., 2017). Pesquisas apontam que o câncer de mama ocupa o segundo lugar entre as principais causas de morte por câncer em países desenvolvidos, sendo superado apenas pelo câncer de pulmão, enquanto é a principal causa de mortalidade por câncer em países em desenvolvimento. Estimativas para 2023-2025 esperam no Brasil a ocorrência de aproximadamente 73.610 casos novos de câncer de mama para cada ano do triênio, com um risco presumido de 66,54 casos a cada 100 mil mulheres (Figura 2) (INCA, 2019, 2023; OMS, 2012). Em relação à mortalidade no Brasil, o câncer de mama feminina causou 17.825 óbitos em 2020, correspondendo a um risco de 16,47 mortes por 100 mil mulheres (INCA, 2023).

Figura 2. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por gênero, exceto pele não melanoma. **Fonte.** (INCA, 2023).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	71.730	30,0%	Homens	Mulheres	Mama feminina	73.610	30,1%
Cólon e reto	21.970	9,2%			Cólon e reto	23.660	9,7%
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	7,5%			Colo do útero	17.010	7,0%
Estômago	13.340	5,6%			Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%
Cavidade oral	10.900	4,6%			Glândula tireoide	14.160	5,8%
Esôfago	8.200	3,4%			Estômago	8.140	3,3%
Bexiga	7.870	3,3%			Corpo do útero	7.840	3,2%
Laringe	6.570	2,7%			Ovário	7.310	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7%			Pâncreas	5.690	2,3%
Fígado	6.390	2,7%			Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Em relação às causas do câncer de mama, ainda que permaneçam como objeto de estudos contínuos, diversos fatores como o consumo excessivo de álcool, o sobrepeso, lesões mamárias de alto risco, alterações hormonais e predisposição genética, têm sido identificados como possíveis contribuintes para o desenvolvimento desta neoplasia maligna (DANTAS et al., 2009; MOMENIMOVAHED; SALEHINIYA, 2019). Outro fator que está relacionado a elevação do risco para o surgimento do câncer de mama é a mutação dos genes supressores de tumor BRCA1 (*Breast Cancer Susceptibility Gene 1*) e BRCA2 (*Breast Cancer Susceptibility Gene 2*). Esses genes desempenham um papel importante nos sistemas de reparo do DNA celular, codificando proteínas essenciais para o reparo do material genético das células normais, e sua inativação está diretamente relacionada ao processo de carcinogênese (DANTAS et al., 2009; MOMENIMOVAHED; SALEHINIYA, 2019).

O câncer de mama é subdividido em duas categorias principais: 1) doença na forma de carcinoma ductal *in situ* (CDIS) e 2) câncer invasivo; ambos são processos heterogêneos com aparências muito variáveis e apresentam características e comportamento clínico distintos (CASTANEDA; STRASSER, 2017; NICE, 2017).

O CDIS é predominantemente detectado pela triagem mamária como microcalcificações na mamografia e não é comumente palpável. O CDIS cresce dentro de um único sistema de ductos da mama, mas pode variar de tamanho e extensão. No entanto, o CDIS, por definição, não se espalha para fora dos limites das estruturas normais da mama e, portanto, não pode desenvolver metástase (CASTANEDA; STRASSER, 2017; NICE, 2017). A caracterização do CDIS é baseada nas características cito-nucleares das células, em baixo, intermediário ou alto grau cito-nuclear. CDIS de alto grau é uma doença mais inerentemente de alto risco em termos de progressão para câncer de mama invasivo e consequente desenvolvimento de recorrência local após a excisão cirúrgica (NICE, 2017).

Diferentemente do CDIS, o câncer invasivo de mama infiltra-se no estroma mamário, sendo capaz de se espalhar para os espaços linfáticos e de metastatizar. Nem todos os cânceres de mama invasivos são os mesmos, alguns são mais agressivos e alguns podem se espalhar mais cedo para regiões distantes. Há uma variedade de métodos para classificar o câncer de mama invasivo; a maioria é baseada no padrão microscópico arquitetônico e na natureza das células cancerosas. A mais importante delas é a classificação histológica, que identifica os tumores como

sendo de grau histológico 1 (menos agressivo e bem diferenciado), grau 2 (moderadamente diferenciado) ou grau 3 (mais agressivo e pouco diferenciado) (NICE, 2017).

Além da classificação histológica, o câncer de mama invasivo também é classificado em 5 subtipos diferentes com base em técnicas imuno-histoquímicas: (1) luminal A, (2) luminal B-HER2 negativo, (3) luminal B-HER2 positivo, (4) superexpressão do receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) e (5) câncer de mama triplo-negativo (CMTN) (Tabela 1) (CIRQUEIRA et al., 2011).

Tabela 1. Perfis imunofenotípicos para a classificação molecular por imuno-histoquímica dos tumores de mama. **Fonte.** Adaptado de (CINTRA et al., 2012; CIRQUEIRA et al., 2011; GOLDBIRSCH et al., 2011).

Subtipos	Padrão de imunomarcção
Luminal A	³ RE+, ⁴ RP+, ¹ HER2-
Luminal B-HER2 negativo	RE+ e/ou RP+, HER2-
Luminal B-HER2 positivo	RE+ e/ou RP+, HER2+
Superexpressão HER2	RE-, RP- e HER2+
Câncer de mama triplo-negativo	RE-, RP-, HER2-, CK5- e EGFR-

¹HER2: receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano; ²EGFR: receptor tipo 1 do fator de crescimento epidérmico; ³RE: receptor de estrogênio; ⁴RP: receptor de progesterona; ⁵CK5: citoceratina 5.

Dentre os subtipos citados, os tumores triplo-negativos apresentam maior risco de recorrência no período de três anos e maiores taxas de mortalidade em cinco anos, quando comparados aos outros subtipos (CAREY et al., 2007; CINTRA et al., 2012). As taxas mais altas de recidiva e mortalidade de pacientes com CMTN podem ser explicadas em parte por diferentes rotas de disseminação metastática. A teoria mais aceita é que os CMTNs parecem se disseminar para nódulos e ossos próximos a região da mama com menos frequência do que os não-CMTN, apresentando uma via hematogênica preferencial, favorecendo metástase no cérebro, pulmões e fígado, e consequentemente dificultando o sucesso do tratamento (PAPA et al., 2015).

1.1.3 Câncer de Ovário

Sendo a quarta neoplasia que causa mais morte em mulheres por tumores ginecológicos nos países desenvolvidos, o Câncer Epitelial de Ovário (CEO) representa um desafio à oncologia ginecológica (HOGG et al., 2015).

No Brasil, o CEO é a terceira neoplasia ginecológica mais frequente, representando aproximadamente 30% de todos os cânceres ginecológicos e precedido apenas pelo câncer de colo do útero. As estimativas para o triênio de 2023-2025, no Brasil, revelam que são esperados 7.310 casos novos de câncer de ovário para cada ano, com um risco presumido de 6,62 novos casos a cada 100 mil mulheres (Figura 2) (INCA, 2023).

Em relação à prevalência dos tumores de ovário, aproximadamente 44% dos casos ocorrem em mulheres na faixa etária entre 55 e 64 anos, sendo que a frequência e a letalidade aumentam com a idade. Assim, a porcentagem de mortalidade é maior em mulheres com idade acima de 70 anos (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2021).

Quanto à classificação do câncer de ovário, trata-se de uma patologia heterogênea que apresenta características biológicas e patológicas distintas (SMOLLE et al., 2013). Segundo a OMS os tumores podem ser classificados a partir da diferenciação histológica do tecido neoplásico em seis subtipos distintos, no qual o carcinoma seroso é responsável por 80% dos casos, e em menor frequência identificam-se os endometriais, mucinosos, de células claras, os em transição e os indiferenciados (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2018).

Os tumores de ovário tipo seroso subdividem-se em carcinoma seroso bem diferenciado, de baixo grau histológico; e carcinoma seroso de alto grau, caracterizado pela atipia celular acentuada, áreas de arranjo glandular, comportamento mais agressivo e frequentemente apresenta mutações em *TP53* e *BRCA1* e *2* (CHEN et al., 2014; FERREIRA et al., 2012).

A etiologia do câncer de ovário, como em outras neoplasias, pode estar relacionada com a exposição a fatores ambientais e fatores do próprio indivíduo. Dentre os fatores e condições de risco para o desenvolvimento do câncer de ovário que não estão associados a mutações gênicas, a idade, a menarca precoce, a menopausa tardia, a obesidade e a síndrome dos ovários policísticos merecem destaque. Além disso, o parentesco de primeiro e segundo grau com histórico de câncer de mama e ovário ainda é considerado o principal fator de risco dessa doença (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2021).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, aproximadamente 20% dos casos de câncer de ovário apresentam natureza familiar e estão relacionados com mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Mulheres com mutação em *BRCA1* apresentam entre 40 e 60% de risco em desenvolver essa neoplasia enquanto que, em casos de alteração em *BRCA2*, o risco de desenvolver câncer epitelial de ovário reduz para cerca de 10 a 30%. Contudo, as portadoras de mutações nesses genes apresentam taxas de sobrevida global e livre da doença elevadas e um melhor prognóstico, quando comparadas às mulheres acometidas sem mutações nesses genes (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2021).

O prognóstico do câncer de ovário está diretamente relacionado com o estadiamento da doença no momento da sua detecção. Assim, as taxas de sobrevida em cinco anos para pacientes diagnosticados em estágio I variam de 80 a 90% e esta taxa diminui para aproximadamente 20% nos casos detectados em estágio IV (SHI; ZHANG, 2016). A ausência de métodos de rastreamento e de diagnóstico adequados contribui com a detecção dessa neoplasia em estádios avançados, o que reduz a sobrevida global em cinco anos para cerca de 30% (DOUBENI; DOUBENI; MYERS, 2016; INCA, 2019). Ressalta-se que nas últimas três décadas a melhoria na sobrevivência global relatada foi escassa (DIER et al., 2014).

1.1.4 Leucemias

As leucemias podem ser definidas como doenças malignas que acometem as células do sangue, e são resultantes da substituição dos elementos sanguíneos normais por leucócitos neoplásicos que se acumulam e ocupam todo o ambiente medular inibindo o crescimento e maturação normal dos precursores linfocitários, eritróides, mielóides e megacariocitários, levando ao quadro clínico característico das leucemias como, anemia, trombocitopenia e infecções resultantes pela perda dos leucócitos funcionantes (GILLILAND; JORDAN; FELIX, 2004; INCA, 2019).

O tipo de leucemia vai depender da linhagem celular envolvida e o estado de maturação das células leucêmicas, o que caracteriza a doença em aguda (células imaturas) ou crônica (células parcial ou completamente diferenciadas) (HÖGLUND; SANDIN; SIMONSSON, 2015; RAMACHANDRAN et al., 2017). Ao todo, já são descritas a existência de mais de 12 subtipos de leucemias, sendo que os quatro mais comumente encontrados na atenção primária são leucemia mieloide aguda (LMA),

leucemia mieloide crônica (LMC), leucemia linfoblástica aguda (LLA) e leucemia linfocítica crônica (LLC) (DAVIS; VIERA; MEAD, 2014; INCA, 2019).

De forma geral, embora as leucemias se manifestarem predominantemente em adultos com mais de 55 anos, também são consideradas o tipo de câncer mais comum entre crianças menores de 15 anos (INCA, 2019). A estimativa mundial para o ano de 2020 esperou a ocorrência de 475 mil novos casos de leucemia no mundo (FERLAY et al., 2021). Para o Brasil, em cada ano do triênio 2023-2025, são esperados cerca de 6.250 casos novos de leucemias em homens e 5.290 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,90 casos novos a cada 100 mil homens e 4,78 para cada 100 mil mulheres (INCA, 2023).

Em relação aos motivos do desenvolvimento da doença, os fatores de risco para leucemia ainda não estão bem estabelecidos, mas estudos já relacionam determinados fatores de risco com uma maior chance de desenvolver alguns tipos específicos da doença, como por exemplo, tabagismo (LMA); benzeno – encontrado na gasolina e largamente usado na indústria química (LMA e LMC, LLA); radiação ionizante (raios-X e gama); quimioterapia – algumas classes de medicamentos usados no tratamento do câncer e doenças autoimunes (LMA e LLA); exposição ocupacional ao formaldeído em indústrias (química, têxtil, entre outras); produção de borracha (leucemias); síndrome de Down e outras doenças hereditárias (LMA); síndrome mielodisplásica e outras desordens sanguíneas (LMA); história familiar; e, por fim, exposição a agrotóxicos, solventes e infecção por vírus das hepatites B e C (leucemias) (INCA, 2019, 2023).

1.1.4.1 Leucemia Mieloide Aguda (LMA)

A leucemia Mieloide Aguda (LMA) é uma forma de câncer caracterizada pela infiltração da medula óssea, sangue e outros tecidos por células proliferativas, clonais, anormalmente diferenciadas e ocasionalmente mal diferenciadas do sistema hematopoiético (PELCOVITS; NIROULA, 2020).

A LMA apresenta uma baixa frequência em crianças, correspondendo à cerca de 20% dos casos (INCA, 2019). Em contrapartida, a LMA é o tipo mais comum das leucemias agudas em adultos e, de acordo com a *SEER Cancer Statistics Review*, a idade média ao diagnóstico é de 67 anos e sendo a responsável pelo maior número de mortes anuais por leucemias nos Estados Unidos (NATIONAL CANCER

INSTITUTE (NIH), 2021; SIEGEL et al., 2021; TALLMAN et al., 2019). O Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos estima uma incidência anual de aproximadamente 3,6 casos de LMA para cada 100.000 habitantes no país, o que torna essa uma doença relativamente rara. Contudo, apresenta representatividade para a pesquisa por ser uma doença de curso rápido e de alta mortalidade (NATIONAL CANCER INSTITUTE (NIH), 2021). No Brasil, a incidência de LMA é desconhecida, uma vez que o Instituto Nacional do Câncer (INCA) relata apenas dados referentes às leucemias de forma geral (INCA, 2019).

Em relação ao diagnóstico de LMA, esse é feito com base na presença de 20% ou mais de blastos na medula ou no sangue periférico do paciente; ou pela presença de anormalidades genéticas únicas encontradas na medula óssea, independentemente da contagem de blastos [t(8;21), inv(16), ou t(15;17)] (PELCOVITS; NIROULA, 2020).

Quanto a classificação, a LMA compreende um grupo heterogêneo de patologias que diferem quanto à sua biologia, manifestação clínica e prognóstico (ARBER et al., 2016). Dessa forma, a LMA é classificada de acordo com a Classificação de Tumores de Tecidos Hematopoiéticos e Linfóides da Organização Mundial da Saúde (OMS), que foi atualizada pela última vez em 2016 (ARBER et al., 2016; JAFFE; BARR; SMITH, 2017; QUINTANILLA-MARTINEZ, 2017). As principais categorias da classificação atual incluem (1) LMA com anormalidades genéticas recorrentes; (2) LMA com alterações relacionadas à mielodisplasia; (3) Neoplasias mieloides relacionadas à terapia; (4) LMA sem outra especificação; (5) Sarcoma mielóide e (6) Proliferações mieloides relacionadas a Síndrome de Down (ARBER et al., 2016; PELCOVITS; NIROULA, 2020).

Entretanto, a classificação precisa da LMA requer estudos diagnósticos multidisciplinares incluindo a aplicação de técnicas de imuno-histoquímica, citoquímica ou ambas, além da análise imuno-fenotípica, em busca de atividade da mieloperoxidase e/ou moléculas de superfície como CD13, CD33, CD123, CD45, CD34, CD38, entre outras (TALLMAN et al., 2019).

1.1.4.2 Leucemia Mieloide Crônica (LMC)

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) pode ser descrita como um distúrbio maligno de células-tronco hematopoiéticas que resulta na expansão clonal não apenas de células mieloides, mas também de células eritroides e plaquetas no sangue periférico e hiperplasia mieloide acentuada na medula óssea. Apresenta incidência de 1-2 casos a cada 100 mil habitantes por ano e é responsável por cerca de 15% das leucemias em adultos, com a idade média de início da doença de 67 anos, mas podendo ocorrer em todas as faixas etárias, inclusive em crianças (NATIONAL CANCER INSTITUTE (NIH), 2021).

A LMC ocorre em 3 fases distintas (fases crônica, acelerada e blástica) e geralmente é diagnosticada na fase crônica. A fase crônica é caracterizada por apresentar menos de 10% de blastos nas amostras de sangue periférico ou medula óssea e quando não tratada, eventualmente, progredirá para a fase acelerada na qual ocorre acentuação da leucocitose, elevação do número de basófilos e eosinófilos, além de trombocitopenia no sangue periférico dificultando a terapia levando a evolução da doença para a fase blástica. Essa fase, caracteriza-se por um bloqueio da diferenciação celular que culmina na presença de 20% ou mais de células blásticas na medula óssea (ALIKIAN et al., 2017; HARRINGTON; KIZILORS; DE LAVALLADE, 2017).

O diagnóstico de LMC é comumente baseado na detecção do cromossomo Filadélfia (Ph). O Ph é resultado de uma translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22 [t (9;22)] que dá origem a um gene de fusão *BCR-ABL1*; o produto desse gene de fusão é uma proteína com atividade de tirosina quinase desregulada (p210) que desempenha um papel central na patogênese da LMC (RADICH et al., 2018). Assim, a descoberta de que o *BCR-ABL1* é necessário na patogênese da LMC e que sua atividade tirosina quinase é importante na transformação celular fez com que ele se tornasse um alvo importante para a intervenção terapêutica (HARRINGTON; KIZILORS; DE LAVALLADE, 2017).

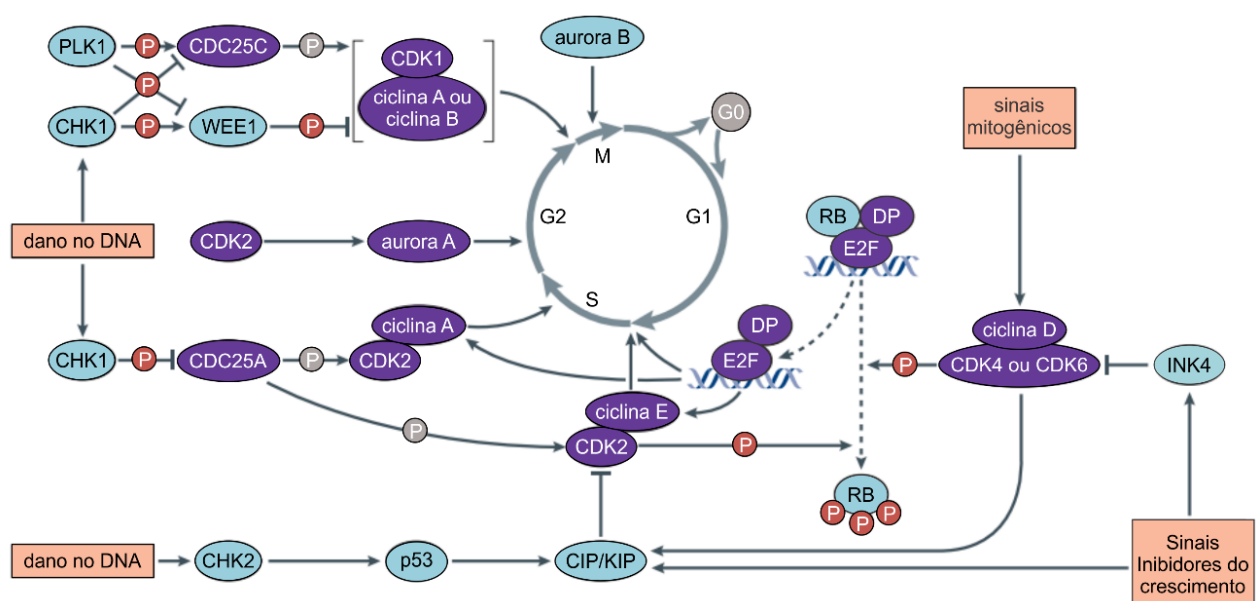
1.1.5 O ciclo celular e a apoptose no câncer

1.1.5.1 Ciclo celular

O ciclo celular dos mamíferos é um processo complexo e altamente regulado por sinais específicos que estão envolvidos na regulação do reparo de danos no material genético, bem como no crescimento e proliferação de células; além de estar relacionado ao desenvolvimento de doenças como o câncer (OTTO; SICINSKI, 2017; SCHAFER, 1998).

Sabe-se que a proliferação celular depende da progressão do ciclo por meio de quatro fases distintas (G0/G1, S, G2 e M), reguladas por ciclinas e várias outras proteínas quinases dependentes de ciclina (CDKs), que na maioria das vezes atuam em conjunto formando um complexo chamado ciclina-CDK. A atividade das CDKs envolvidas na regulação do ciclo celular é rigidamente controlada por sinais mitogênicos e pode ser inibida pela ativação de pontos de verificação do ciclo celular em resposta a danos no DNA, por meio da ação dos inibidores de quinases dependentes de ciclina (iCDKs), como os membros das famílias INK4 e CIP/KIP (Figura 3) (LEAL-ESTEBAN; FAJAS, 2020; OTTO; SICINSKI, 2017; SCHAFER, 1998).

Figura 3. Progressão do ciclo celular e principais proteínas reguladoras. **Fonte.** Adaptado de (OTTO; SICINSKI, 2017).



Os iCDKs, membros da família INK4 (p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C} e p19^{INK4D}), são os responsáveis por ligar-se a CDK4 e CDK6 e bloquear a associação com Ciclinas do tipo D, extinguindo assim a atividade quinase de CDK4 e CDK6. Enquanto que os iCDKs da família CIP/KIP (p21^{WAF/CIP1}, p27^{KIP1} e p57^{KIP2}) ligam-se a todos os complexos ciclina-CDK e inibem principalmente a atividade de CDK2 e CDK1 (LEAL-ESTEBAN; FAJAS, 2020; OTTO; SICINSKI, 2017).

Os complexos Ciclina D/CDK4 e Ciclina D/CDK6 são os principais responsáveis pela progressão do ciclo celular, e atuam por dois mecanismos distintos: (1) por meio do sequestro das proteínas p21 e p27 e (2) da fosforilação de vários alvos, por exemplo a proteína do retinoblastoma (RB), uma proteína supressora de tumor, e proteínas intimamente relacionadas a ela, como a p107 e a p130, também conhecidas como RBL1 e RBL2, respectivamente. A fosforilação das proteínas RB e relacionadas, permitem que os fatores de transcrição E2F ativem a transcrição dos genes envolvidos na replicação do DNA, na estrutura da cromatina, na segregação cromossômica, no ponto de checagem do conjunto do fuso mitótico (G2/M) e na progressão do ciclo celular (G1/S) (OTTO; SICINSKI, 2017; WANG et al., 2016).

Em células cancerosas, tais pontos de checagem podem estar comprometidos devido a mutações ou silenciamento de genes reguladores sabidamente associados ao câncer, como o gene *TP53*, responsável pela codificação da proteína p53 (OTTO; SICINSKI, 2017). Em condições normais, os níveis de *p53* são baixos e, em alguns casos, indetectáveis. Entretanto, em situação de estresse, como dano no material genético, ativação do oncogene ou hipóxia, há um aumento nos níveis intracelulares de p53 por meio de modificações pós-traducionais, como a fosforilação e a acetilação do DNA, o que não ocorre em células cancerosas que apresentam esse gene comprometido (WANG et al., 2016).

Nesse sentido, o *TP53* quando expresso corretamente, provoca uma variedade de respostas incluindo a parada do ciclo celular e apoptose, e atua como uma barreira importante para o desenvolvimento de um tumor por meio da interação com genes específicos que apresentam dentro de suas regiões reguladoras, sítios de ligação à proteína p53 (WANG et al., 2016). Dessa forma, a perda ou inativação do gene *TP53* irá permitir que células danificadas continuem a se dividir, aumentando significativamente o risco de desenvolvimento de tumores malignos (OTTO; SICINSKI, 2017).

A parada do ciclo celular mediada pela p53 é relacionada principalmente a ativação transcricional do gene que codifica a proteína p21, um iCDK da família CIP/KIP. A proteína p21 desempenha um papel crucial na regulação do ciclo celular, atuando como um regulador-chave capaz de inibir a atividade de complexos ciclina-CDK em resposta a danos no DNA, sinais antimitogênicos ou diferenciação celular, impedindo sobretudo a mudança da fase G1 para a fase S (CHEN, 2016; LEE et al., 2009; OTTO; SICINSKI, 2017). Contudo, a expressão do gene p21 também pode ser regulada por mecanismos independentes de p53, os quais compreendem o envolvimento de outras diversas vias de sinalização (KARIMIAN; AHMADI; YOUSEFI, 2016; LEE et al., 2009).

Em relação à apoptose, a função da p21 é altamente complexa e ainda é objeto de estudos. A regulação complexa da apoptose pela p21 pode depender do contexto celular específico, bem como das interações com outras moléculas e vias de sinalização intracelular que vão determinar sua ação como pró ou anti-apoptótica (ABBAS; DUTTA, 2009; KARIMIAN; AHMADI; YOUSEFI, 2016).

1.1.5.2 Apoptose e espécies reativas de oxigênio (EROs)

A apoptose é um tipo de morte celular programada essencial para a manutenção da homeostase tecidual; é um processo natural que resulta na remoção ordenada e eficiente de células danificadas (PISTRITTO et al., 2016).

A apoptose, pode ser desencadeada de duas maneiras: pela via mitocondrial ou pela via induzida pelo receptor de morte celular (WANG et al., 2016). A via mitocondrial da apoptose, também conhecida como via intrínseca, é regulada por sinais intracelulares que convergem no nível mitocondrial em resposta a várias condições de estresse, como irradiação, tratamento com agentes quimioterápicos, aumento nos níveis de Ca^{2+} citoplasmático, estresse oxidativo, entre outros (ELMORE, 2007; OTTO; SICINSKI, 2017).

Nessa via, a permeabilidade da membrana externa mitocondrial (MOMP) desempenha um papel crucial e é regulada por proteínas da família Bcl-2. Essa família inclui mais de 30 proteínas e seus membros podem ser divididos em dois grupos: as proteínas de sobrevivência antiapoptóticas e as proteínas pró-apoptóticas. Os membros antiapoptóticos incluem Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bcl-B, A1 e Mcl-1, enquanto

os pró-apoptóticos englobam Bax, Bak, Bok, Bad, Bik, Bmf, Hrk, SOUL, Bid, Bim, Puma e Noxa (REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016).

A maioria das células contém uma variedade dessas proteínas da família Bcl-2 pró e antiapoptóticas, e a regulação do equilíbrio entre elas desempenha um papel fundamental na determinação do destino celular, favorecendo a sobrevivência ou a apoptose mediada pelas mitocôndrias. Em condições normais, as proteínas pró-apoptóticas, como Bid, Bax e Bad, são encontradas no citosol, enquanto as antiapoptóticas, como Bcl-2 e Bcl-XL, estão principalmente localizadas na membrana externa mitocondrial (OMM), onde formam heterodímeros com Bax, Bim, Bak e Bad, inibindo suas propriedades pró-apoptóticas (REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016).

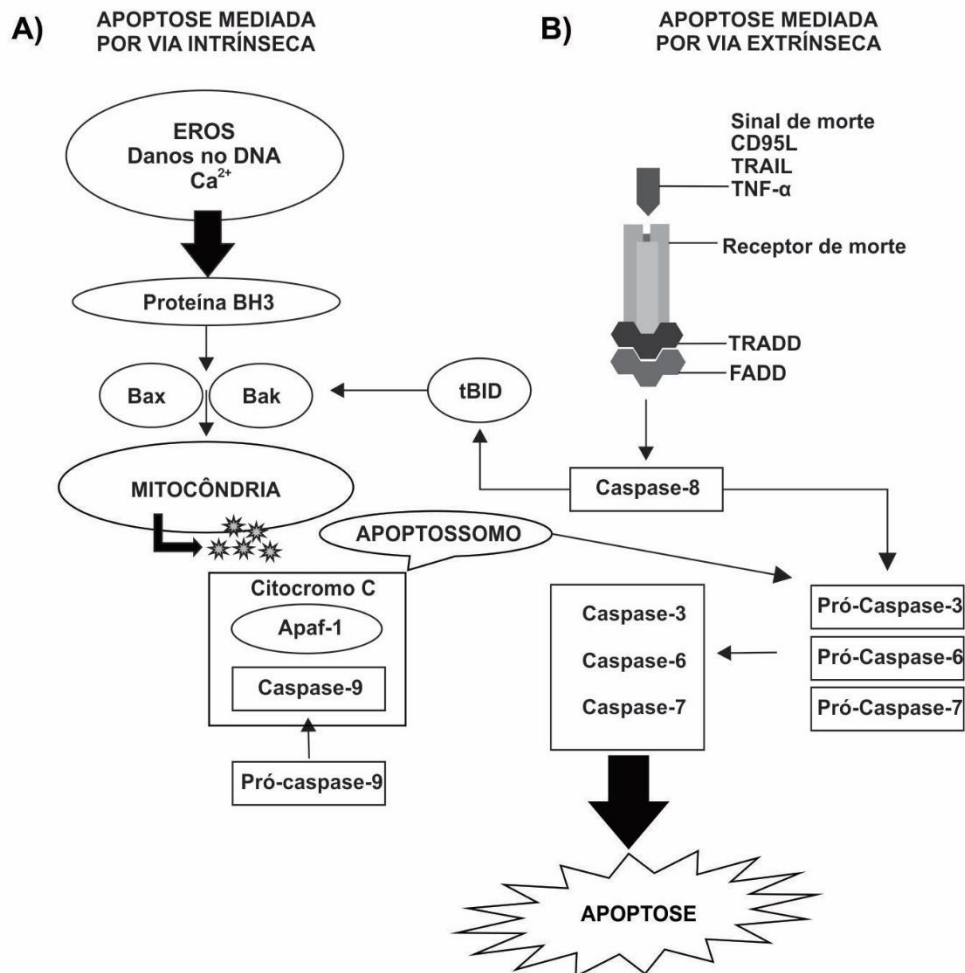
A ativação subsequente dos membros pró-apoptóticos da família Bcl-2, como BAX e BAK, neutraliza as proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Bcl-XL e Mcl-1, resultando na perda da permeabilidade da membrana mitocondrial externa, permitindo que proteínas normalmente confinadas no espaço intramembranoso se espalhem pelo citoplasma (BAIG et al., 2016). Essas proteínas incluem fatores apoptogênicos, como o citocromo C, que desempenha um papel crucial na ativação da morte celular apoptótica pela via intrínseca (PISTRITTO et al., 2016).

O Citocromo C, liga-se ao apaf-1 citoplasmático (fator ativador da protease da apoptose-1) e desencadeia a formação de um complexo denominado apoptossomo, que recruta a pró-caspase-9 iniciadora para seu domínio de recrutamento de caspases (CARD), permitindo a autoativação seguida de proteólise. O processo, por sua vez, ativa as caspases executoras a jusante -3, -6 e -7 para posterior clivagem de substratos celulares e consequente morte da célula (Figura 4A) (BAIG et al., 2016; PISTRITTO et al., 2016).

Em contrapartida, a via apoptótica induzida por receptor de morte ou extrínseca, é dependente da interação dos receptores expostos na superfície celular (pertencentes à superfamília de receptores do fator de necrose tumoral (TNFR)), com seus respectivos ligantes da família da proteína TNF (Figura 4B) (BAIG et al., 2016; PISTRITTO et al., 2016).

Os receptores de morte são estruturalmente definidos por um domínio de interação proteína-proteína intracelular, chamado de domínio de morte (DM), que está criticamente envolvido na sinalização indutiva de apoptose. Os sistemas de sinalização mais caracterizados de ligantes a receptores de morte incluem TNFR1-TNF α , FAS(CD95, APO-1)-FasL, TRAILR1(DR4)-TRAIL, TRAILR2(DR5)-TRAIL. Após a estimulação do receptor de morte pelo seu ligante correspondente, o mesmo receptor sofre oligomerização e uma mudança conformacional para revelar seu DM citoplasmático para suportar interações homotípicas com outras proteínas contendo DM (ELMORE, 2007).

Figura 4. Mecanismos apoptóticos: (A) via intrínseca; (B) via extrínseca. **Fonte.** Adaptado de (BAIG et al., 2016).



O papel das proteínas adaptadoras (FADD/TRADD) é sequestrar, no nível desse complexo proteico, os iniciadores pró-caspase-8 e/ou -10 resultando na formação do chamado complexo de sinalização indutor de morte (DISC), aumentando

a concentração local de pró-caspase e promovendo a autoativação mútua. A ativação de caspases iniciadoras resulta no processamento das caspases-3, -6 e -7 efetoras a jusante, cuja ativação leva à clivagem de substratos essenciais para a viabilidade celular, tendo como resultado, a morte da célula (ELMORE, 2007; PISTRITTO et al., 2016).

Entretanto, em certos contextos, as células não se rendem exclusivamente à ativação da via extrínseca da apoptose e, portanto, dependem de um passo adicional de amplificação, desencadeado pela caspase-8. Essa interação entre as vias extrínseca e intrínseca da apoptose assume um papel crucial na determinação do destino celular. Nessa situação específica, a caspase-8 dirige sua ação para a proteína BH3-Bid, um agonista de morte que interage com o domínio BH3. Isso resulta na clivagem da BH3-Bid, gerando o fragmento ativado conhecido como t-Bid. Posteriormente, o t-Bid desempenha o papel de ativar diretamente proteínas pró-apoptóticas com múltiplos domínios, promovendo assim a MOMP (Perda da Permeabilidade da Membrana Externa Mitocondrial) e, conseqüentemente, contribuindo significativamente para a via intrínseca da apoptose (Figura 4) (BAIG et al., 2016; PISTRITTO et al., 2016).

Além disso, essa interligação entre as vias extrínseca e intrínseca da apoptose desempenha um papel crucial na resposta celular ao estresse oxidativo. Em situações em que as células passam por um estresse oxidativo, como a exposição elevada a espécies reativas de oxigênio (EROs), a ativação indireta da caspase-8 e a subsequente geração do fragmento t-Bid representam um mecanismo de amplificação importante na indução da apoptose (PECCHILLO CIMMINO et al., 2023; REDZADUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016).

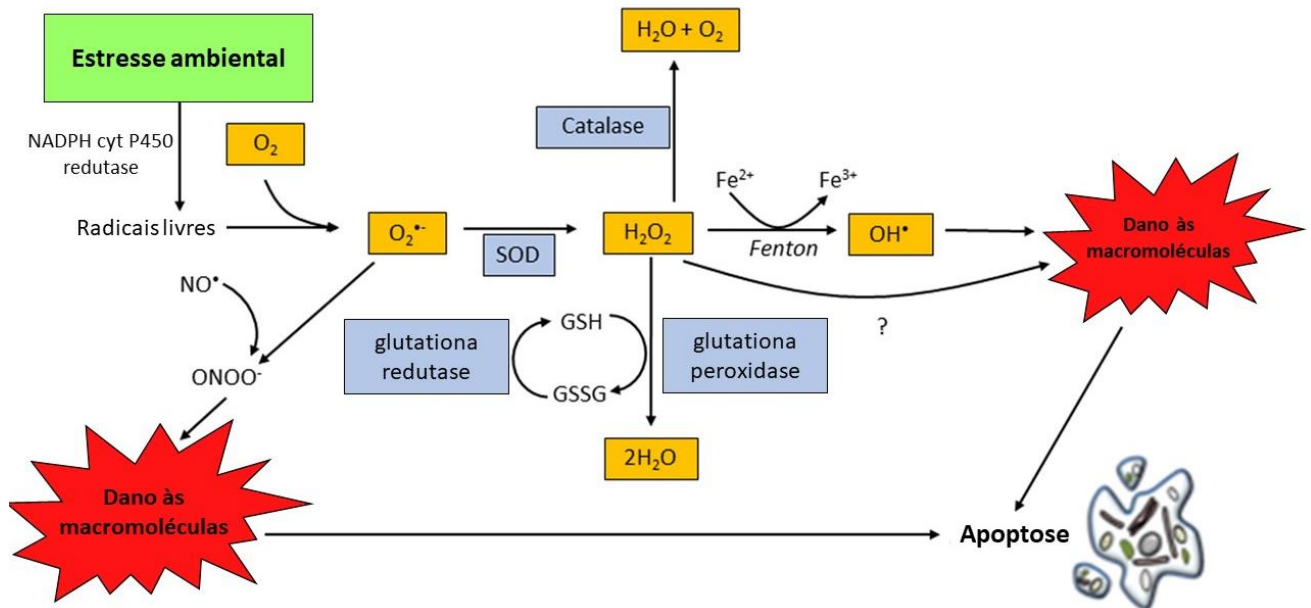
As EROs têm sido estreitamente associadas à ativação da via mitocondrial. De fato, as mitocôndrias são o principal local de produção de EROs intracelulares, resultado de vazamentos da cadeia de transporte de elétrons. As EROs geradas a partir das mitocôndrias podem afetar estruturas próximas, como o DNA mitocondrial (mtDNA), tornando-o suscetível a danos oxidativos. Os danos ao mtDNA interferem na transcrição do mesmo, responsável por proteínas envolvidas na cadeia de transporte de elétrons, provocando a interrupção da função da cadeia respiratória. Isso resulta em um aumento adicional na geração de EROs, levando à perda do potencial da membrana mitocondrial e prejudicando a síntese de ATP (PECCHILLO

CIMMINO et al., 2023; REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016; ROY et al., 2015).

Contudo, é essencial ressaltar que, embora níveis elevados de EROs possam potencialmente danificar os lipídios da membrana, resultando em mudanças em sua permeabilidade, a presença de baixos níveis de EROs geralmente está associado ao favorecimento da proliferação e a sobrevivência celular. Enquanto que, níveis intermediários podem desencadear uma pausa temporária ou permanente no ciclo celular, levando à diferenciação celular (KMA; BARUAH, 2022; REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016; ROY et al., 2015).

Nesse contexto, a quantidade e a origem da geração de EROs poderão ser desencadeadas nas células tanto por estímulos externos quanto por fatores endógenos. A produção interna de EROs, particularmente do superóxido ($O_2^{\cdot-}$), ocorre principalmente devido a vazamentos durante a atividade da cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias, sendo os complexos I e III da cadeia respiratória os principais locais de geração. Além disso, enzimas como as NADPH oxidases (NOX), xantina oxidases e a ativação enzimática de redutases do citocromo P450 também podem contribuir para a produção de superóxido, desempenhando papel pró-apoptóticos (Figura 5) (KMA; BARUAH, 2022; PECCHILLO CIMMINO et al., 2023; REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016).

Figura 5. O estresse ambiental atribuído a compostos tóxicos pode gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) que causam danos celulares e apoptose. Os radicais livres reagem com o oxigênio para produzir superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que reage com óxido nítrico (NO^{\cdot}) para produzir peroxinitrito ($ONOO^-$) ou sofre dissociação para gerar H_2O_2 , catalisado pela SOD (superóxido dismutase). O H_2O_2 pode ser detoxificado por antioxidantes, como a catalase e a GSH/glutationa peroxidase, ou pode gerar OH^{\cdot} por meio da reação de Fenton catalisada por metais. Fonte. Adaptado de (REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016).



1.1.6 Quimioterapia

De forma geral, o câncer nas suas inúmeras formas é comumente tratado pela combinação de diversos recursos terapêuticos. A cirurgia, a terapia hormonal, a radioterapia e a quimioterapia são exemplos atuais de tratamentos mais recorridos pela medicina moderna e a escolha do tratamento adequado leva em consideração o estadiamento e o tipo da doença, suas características biológicas e as condições gerais do paciente como a idade, presença de comorbidades e preferências (INCA, 2019; NICE, 2017).

Ao todo, mais de 90 medicamentos quimioterápicos já estão disponíveis para o tratamento do câncer e podem ser classificados de três maneiras: de acordo com a sua estrutura química, função em nível celular e especificidade de atuação no ciclo celular. Dentre os quimioterápicos mais comuns pode-se destacar os agentes alquilantes, os antimetabólitos, os inibidores do fuso mitótico, os inibidores da

topoisomerase e os inibidores da tirosina quinase (Figura 6) (ALMEIDA et al., 2005; PEART, 2015).

Os agentes alquilantes atuam em todas as fases do ciclo celular, diretamente no DNA, para impedir que as células cancerosas se proliferem. Os quimioterápicos pertencentes a essa classe de moléculas criam ligações cruzadas inter ou intra fitas ou transferem grupos alquila para os resíduos de guanina do DNA, o que resulta na formação de pares incorretos nas bases do DNA e evita a separação das fitas durante a síntese do material genético (BUKOWSKI; KCIUK; KONTEK, 2020).

Figura 6. Classificação dos quimioterápicos comumente utilizados de acordo com seu mecanismo de ação. **Fonte.** Adaptado de (BAIG et al., 2016).



Os antimetabólitos, por outro lado, são medicamentos que atuam durante a fase de síntese (S) do ciclo celular e interferem no alongamento do DNA e do RNA bloqueando a ação de enzimas (diidrofolato redutase, ribonucleotídeo redutase e DNA polimerase) e a produção de substâncias fundamentais para o metabolismo da célula. Já os inibidores do fuso mitótico, são alcaloides vegetais ou compostos derivados de produtos naturais que atuam durante a fase da mitose (M) do ciclo celular, sendo responsável pelo bloqueio da fase M e impedindo a reprodução celular (ALMEIDA et al., 2005; BUKOWSKI; KCIUK; KONTEK, 2020; PEART, 2015).

Os Inibidores da topoisomerase são conhecidos por inibirem a atividade das topoisomerasas envolvidas na replicação do material genético e causarem quebras na dupla fita do DNA. Enquanto, os inibidores de tirosina quinase, são descritos com a capacidade de inibirem a atividade das tirosinas quinases envolvidas em múltiplas vias intracelulares associadas à sinalização de crescimento mediada por receptores, levando à disfunção celular e subsequente morte celular (BUKOWSKI; KCIUK; KONTEK, 2020).

Dessa forma, apesar da grande parte dos pacientes com câncer responder muito bem inicialmente aos tratamentos quimioterápicos disponíveis hoje, problemas como a recorrência ainda se desenvolvem em uma proporção significativa devido ao surgimento de resistência aos medicamentos aprovados (CHEN et al., 2017). O quadro de resistência em pacientes pode ocorrer pela seleção das células tumorais após a exposição aos agentes quimioterápicos que passam a desenvolver somente os tipos celulares resistentes, permitindo-lhes seguir por vias metabólicas alternativas por meio da síntese de novas enzimas ou expressão de genes de resistência a múltiplos fármacos, incluindo o gene que codifica a glicoproteína P, relatado após a administração da Doxorubicina (HOLOHAN et al., 2013; LONGLEY; JOHNSTON, 2005)

A Doxorubicina (DOX) é um inibidor de topoisomerase, pertencente a classe das antraciclina, capaz de induzir a morte celular ou a parada do crescimento celular por meio de uma variedade de mecanismos moleculares, incluindo a inibição da topoisomerase II, a intercalação do DNA e a produção de radicais livres (CHEN et al., 2017). Devido ao seu efeito antitumoral de amplo espectro e baixo preço, a DOX tem sido amplamente utilizada no tratamento de muitos tipos de câncer, principalmente para o tratamento de câncer de mama (ALKREATHY et al., 2019; O'BRIEN et al., 2019).

No entanto, os benéficos potenciais terapêuticos da DOX são limitados; além do envolvimento no mecanismo de resistência, a DOX também está associada a riscos de cardiotoxicidade reconhecidos, particularmente no contexto de doses cumulativas mais altas, fatores de risco cardiovascular subjacentes, irradiação prévia e na coadministração de outros fármacos potencialmente cardiotoxícos (por exemplo, *Trastuzumabe*) (O'BRIEN et al., 2019). Estudos recentes relataram que o uso geral da DOX no tratamento do câncer de mama diminuiu significativamente com o passar

do tempo, contudo, ainda sim continua sendo o tratamento mais usual para certos subtipos, por exemplo o CMTN (ALMUWAQQAT et al., 2019).

O quadro de resistência também pode ser observado em pacientes diagnosticados com LMC após a exposição ao mesilato de Imatinibe (inibidor de tirosina quinase). Apesar de pacientes expostos a esse medicamento apresentar altas taxas de respostas ao tratamento, estima-se que um percentual de 30% desses pacientes desenvolva um quadro de resistência ao fármaco, principalmente em pacientes que se encontram em estágios mais avançados da doença (ALIKIAN et al., 2017; HARRINGTON; KIZILORS; DE LAVALLADE, 2017).

Já em pacientes diagnosticado com LMA, o tratamento usual emprega quimioterapia indutora de remissão, com aplicação dos quimioterápicos do grupo das antraciclinas e citarabina, seguido de quimioterapia de consolidação e/ou transplante alogênico de células-tronco para pacientes com alto risco de reincidência (DAVER et al., 2020).

Entretanto, embora essa abordagem seja a base da terapia da LMA nas últimas quatro décadas, alcançando taxas de remissão completa em até 80% dos pacientes com menos de 60 anos de idade, ainda sim pode ser mal tolerada, com maior risco de mortalidade por indução em pacientes com comorbidades ou idade avançada. Além disso, estudos recentes já demonstram que a quimioterapia convencional apresenta taxas de resposta e sobrevida insatisfatórias em pacientes com risco citogenético adverso ou mutações moleculares de alto risco, como TP53 (DAVER et al., 2020).

1.1.7 Compostos Heterocíclicos

Os heterocíclicos constituem uma unidade estrutural comum na maioria dos medicamentos comercializados atualmente (MARTINS et al., 2015). Tais compostos apresentam-se como uma divisão fundamental da química orgânica e podem ser definidos como compostos cíclicos contendo frequentemente átomos de nitrogênio e ou oxigênio em sua estrutura (GOMTSYAN, 2012; IUPAC, 2014; MARTINS et al., 2015). Definem uma importante classe de entidades químicas na pesquisa em ciências da vida e são frequentemente incorporados como base de construção em estudos de química medicinal com o objetivo de modular a afinidade e/ou seletividade

de um ligante em relação a um alvo biológico (ARULMURUGAN; KAVITHA; VENNILA, 2020; DEMMER; BUNCH, 2015).

Muitas das classes destes heterocíclicos são consideradas privilegiadas quanto ao seu perfil de atividade biológica; considerando-se estruturas privilegiadas, arcabouços moleculares capazes de originar compostos com amplo espectro de atividade biológica (CHEN et al., 2011; EVANS et al., 1988).

Entre as várias aplicações clínicas, os compostos heterocíclicos desempenham um papel ativo bem descrito e importante como fármacos antimicrobianos, antivirais, antifúngicos, anti-inflamatórios e antitumorais (MARTINS et al., 2015). Dessa forma, a presença de heterocíclicos em uma ampla gama de compostos com propriedades biologicamente e farmacologicamente interessantes é um testemunho de que sua relevância é inegável no campo da química medicinal, sendo que dos aproximadamente 20 milhões de compostos químicos documentados na literatura, mais da metade são classificados como heterocíclicos (HERAVI; ZADSIRJAN, 2020).

Estudos recentes já descrevem a atividade antitumoral de algumas classes de heterocíclicos por meio da inibição das topoisomerases I e II e a inibição da ação tirosina quinase (TK) de receptores envolvidos no câncer, como o receptor do fator de crescimento epidérmico tirosina quinase (EGFR, também conhecido como erbB1 ou HER1), fator de crescimento epidérmico humano 2 tirosina quinase (HER2, também conhecido como erbB2) e receptores do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFRs), que os tornam promissores e interessantes na busca de novos fármacos (GLAMOČLIJA et al., 2018; WONG; YEONG, 2021).

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2.1 Justificativa

Estima-se que a resistência a quimioterapia é hoje a causa de 90% do fracasso terapêutico em pacientes com câncer metastático. Sabe-se que tal resistência a agentes quimioterápicos pode ser classificada entre duas formas distintas, sendo elas, adquirida ou mediada por fatores intrínsecos (HOLOHAN et al., 2013).

A resistência mediada por fatores intrínsecos, se desenvolve por meio de fatores que já se encontram presentes entre as células, inativando a terapia. Já na resistência adquirida, é proposto que após o primeiro contato ao quimioterápico, o paciente passa a sofrer mutações celulares, causando mudanças epigenéticas que podem ativar vias de sinalização compensatória ou inativar via indutora de morte. Dessa forma, impossibilitam que a célula tumoral responda ao tratamento de forma adequada, conferindo vantagens proliferativas em relação a massa tumoral total (HOLOHAN et al., 2013; LONGLEY; JOHNSTON, 2005).

Nesse sentido, os desafios atuais impostos pelas alternativas terapêuticas limitadas e os inúmeros efeitos adversos da quimioterapia, justificam o interesse no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento do câncer, principalmente de novas alternativas que sejam capazes de contornar os mecanismos de resistência dos tratamentos disponíveis e/ou capazes de aumentar a eficiência dos agentes quimioterápicos comumente empregados, especialmente nos últimos estágios do desenvolvimento do câncer (BUKOWSKI; KCIUK; KONTEK, 2020; DOHNER; WEISDORF; BLOOMFIELD, 2015).

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo Geral

Avaliar por meio de plataformas *in vitro* e *in silico* o mecanismo de ação de compostos heterocíclicos inéditos e precursores contra linhagens celulares de câncer.

2.2.2 Objetivos Específicos

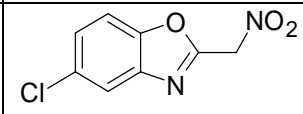
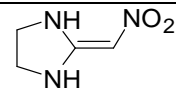
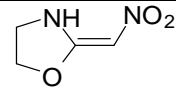
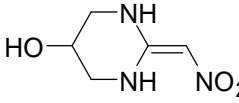
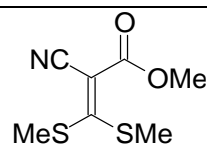
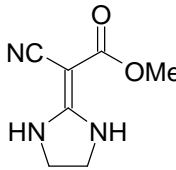
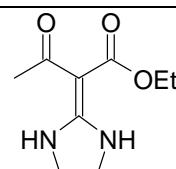
- I. Investigar a atividade citotóxica *in vitro* dos vinte três (23) compostos heterocíclicos inéditos e precursores contra as linhagens tumorais MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama triplo-negativo, ATCC® HTB-26™), TOV-21g (adenocarcinoma de ovário, ATCC® CRL-11730™), WI-26VA4 (fibroblasto pulmonar, ATCC® CCL-95.1™), K-562 (leucemia mieloide crônica, ATCC® CCL-243™), THP-1 (leucemia monocítica aguda, ATCC® TIB-202™) e HL-60 (Leucemia promielocítica aguda, ATCC® CCL-240™).
- II. Identificar e selecionar os compostos mais ativos para as linhagens tumorais e investigar seus efeitos na indução de apoptose, no ciclo celular e na regulação dos genes *TP53*, *p21*, *Bcl-2*, *NOX-2* e *p47-phox* pós-tratamento.
- III. Analisar *in silico* os perfis *drug-like* dos compostos mais ativos em termos de cinco regras empíricas de predição de biodisponibilidade oral e prever um possível alvo por meio da ancoragem molecular contra os alvos depositados no *Our Own Molecular Targets Data Bank* (OOMT).

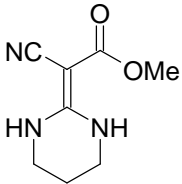
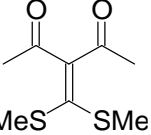
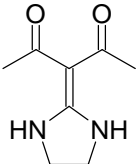
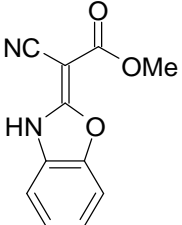
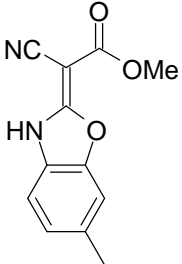
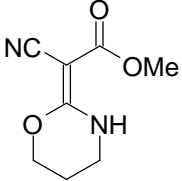
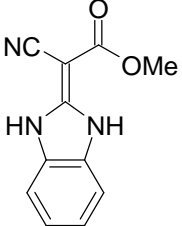
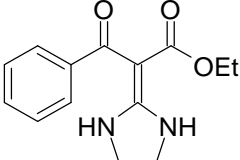
3 MATERIAIS E MÉTODOS

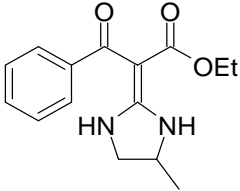
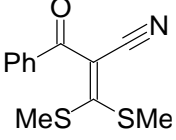
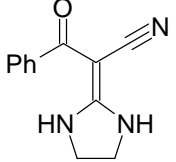
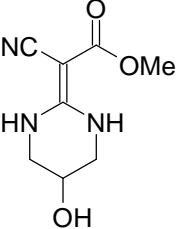
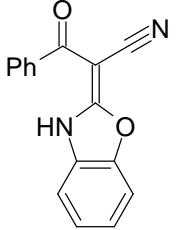
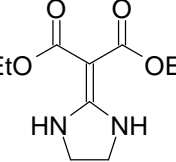
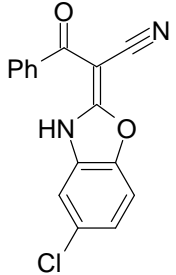
3.1 Obtenção dos Compostos

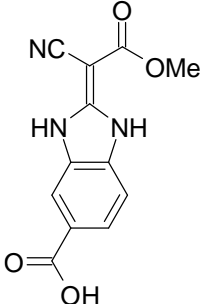
Os vinte e três (23) compostos utilizados no desenvolvimento desse trabalho foram sintetizados e cedidos pelo pesquisador Prof. Dr. Diego Sangi da Universidade Federal Fluminense – UFF. Esses compostos heterocíclicos e seus precursores são estruturas inéditas, pertencentes as classes dos benzoxazóis, imidazolidinas e oxazolidinas (Quadro 1). A síntese dos compostos identificados como **GSCB76**, **GSCB82** e **GSCB85**, bem como os resultados obtidos neste trabalho estão em processo de análise de proteção intelectual, o qual pode ser consultado no site do Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) por meio do número de processo do pedido de depósito da patente: BR10 2022 0065039 (ANEXO 3).

Quadro 1. Estrutura química, massa molecular e solubilidade dos compostos cedidos.

Código	Estrutura Química	Massa Molecular (MM)	Solubilidade
GSCB01		212,59 g mol ⁻¹	DMSO
GSCB05		129,12 g mol ⁻¹	DMSO
GSCB06		130,10 g mol ⁻¹	DMSO
GSCB15		159,15 g mol ⁻¹	DMSO
GSCB54		203,27 g mol ⁻¹	DMSO
GSCB55		167,17 g mol ⁻¹	DMSO
GSCB56		198,22 g mol ⁻¹	DMSO

GSCB59		181,20 gmol ⁻¹	DMSO
GSCB60		204,30 gmol ⁻¹	DMSO
GSCB61		168,20 gmol ⁻¹	DMSO
GSCB64		216,20 gmol ⁻¹	DMSO
GSCB65		230,22 gmol ⁻¹	DMSO
GSCB68		182,18 gmol ⁻¹	DMSO
GSCB69		215,21 gmol ⁻¹	DMSO
GSCB73		260,29 gmol ⁻¹	DMSO

GSCB74		274,32 gmol ⁻¹	DMSO
GSCB76		249,35 gmol ⁻¹	DMSO
GSCB77		213,24 gmol ⁻¹	DMSO
GSCB80		197,19 gmol ⁻¹	DMSO
GSCB82		262,27 gmol ⁻¹	DMSO
GSCB83		228,25 gmol ⁻¹	DMSO
GSCB85		296,71 gmol ⁻¹	DMSO

GSCB86		259,22 g mol ⁻¹	DMSO
--------	---	----------------------------	------

3.2 Ensaios Biológicos

3.2.1 Cultivo Celular

As linhagens celulares humanas utilizadas na análise de toxicidade foram MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama triplo-negativo, ATCC[®] HTB-26TM), TOV-21g (adenocarcinoma de ovário, ATCC[®] CRL-11730TM), WI-26VA4 (fibroblasto pulmonar, ATCC[®] CCL-95.1TM), K-562 (leucemia mieloide crônica, ATCC[®] CCL-243TM), THP-1 (leucemia monocítica aguda, ATCC[®] TIB-202TM) e HL-60 (Leucemia promielocítica aguda, ATCC[®] CCL-240TM), adquiridas por meio da *American Type Culture Collection* (ATCC).

O conteúdo do criotubo (linhagem celular com 5% de dimetilsulfóxido e soro), que estava mantido em nitrogênio líquido no banco de criopreservação (*CryoPlus 7405/Thermo Scientific*, EUA), foi descongelado a 37 °C, transferido para um tubo de centrifuga de 15 mL (*Corning*, EUA) contendo 2 mL de meio RPMI 1640 incompleto e então submetido à centrifugação de 70 x g durante 5 minutos (*mod. CS-6R, Beckman*, EUA). O sobrenadante foi descartado e a massa celular presente no fundo do tubo foi ressuspensa em 5 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) inativado pelo calor.

A suspensão celular foi transferida para garrafas plásticas de cultivo celular T25 (25 cm²) (*Corning Costar Inc.*, EUA) e mantidas a 37 °C em estufa (*Thermo electron co. EUA*) com atmosfera úmida de 5% de CO₂. Para a manutenção das linhagens, o meio de cultura foi substituído a cada 48 horas para garantir a renovação dos nutrientes. Contaminações, morfologia celular e formação da monocamada (para células aderentes) foram monitoradas ao microscópio invertido em aumento de 40x (modelo *Olympus*, CKX 41).

Além das linhagens acima mencionadas, também foram utilizadas neste trabalho as células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Para a obtenção das PBMC,

amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis, ou seja, que apresentaram hemograma dentro da faixa de referência e que relataram não ter nenhuma doença, foram coletadas e submetidas a separação por Ficoll® (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA); um polissacarídeo ramificado que promove a separação por gradiente de densidade celular. Para a realização da coleta, um termo de consentimento livre e esclarecido foi aplicado para todos os doadores (ANEXO 1) de acordo com o projeto aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (CEP) (CAAE: 02177612.0.0000.5149) (ANEXO 2).

Após a separação, o *pellet* de células obtido pela técnica de separação de PBMC, foi ressuspensionado em meio de cultura RPMI 1640 a 10% de soro fetal bovino e transferido para as garrafas de cultura celular, as quais foram mantidas na estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂ para posterior realização do ensaio de viabilidade celular.

3.2.2 Ensaio de Viabilidade Celular

A citotoxicidade dos compostos sintéticos em linhagens celulares foi avaliada pelo ensaio do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol]. O MTT é um sal tetrazólico que reage com as enzimas mitocondriais de células viáveis formando um cristal violeta chamado de Formazan; um cristal insolúvel em água, mas solúvel em dimetilsulfóxido (DMSO) (CARMICHAEL et al., 1987).

Para a realização deste ensaio, as células foram removidas das garrafas e centrifugadas a 70 x *g* por 5 minutos. Após a centrifugação, a massa celular foi ressuspensionada e uma alíquota de 50 µL da suspensão foi retirada e homogeneizada com 50 µL de azul de Tripán para contagem manual de células viáveis em câmara de Neubauer ao microscópio óptico 20x. Após contagem, as células foram distribuídas em placas de 96 poços na concentração de 1x10⁶ células/placa.

Para a montagem da placa de drogas, tanto os compostos testados quanto os controles positivos (Doxorrubicina, Cisplatina, Imatinibe e Citarabina) foram solubilizados em DMSO e diluídos em meio de cultivo contendo 1% de soro fetal bovino (SFB) antes de serem adicionados à placa de células. As concentrações utilizadas foram de 100, 10, 1 e 0,1 µg/mL. Após 48 horas de incubação, adicionou-se 100 µL/poço do sal tetrazólico MTT na concentração de 0,5 mg/mL, seguido de um

período de incubação de 3 horas. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e 100 µL de DMSO foram aplicados em cada poço para solubilizar os cristais de formazan. A absorbância por poço foi medida a um comprimento de onda de 550 nm utilizando o leitor de microplacas *Versamax (Molecular Devices)*. É importante ressaltar que a concentração final de DMSO utilizada no tratamento foi rigorosamente controlada em todas as etapas do experimento ($\leq 0,2\%$), garantindo que seu efeito não interferisse nos resultados obtidos.

Os dados foram analisados a partir de três experimentos independentes. A concentração mínima que reduziu em 50% a viabilidade celular (IC_{50}) na presença dos compostos testes foi determinada pela comparação com células cultivadas sem a presença de compostos (considerada 100% viáveis).

3.2.3 Determinação do IC_{50} para as linhagens celulares

A concentração mínima que reduziu em 50% a viabilidade celular foi obtida por meio de uma curva dose-resposta, em função da regressão não linear. Para a confecção da curva, foi utilizado o programa *GraphPad Prism 7 (GraphPad Software)*.

3.2.4 Determinação do Índice de Seletividade (IS) para as linhagens celulares

O índice de seletividade (IS) pode indicar a seletividade de um composto entre uma linhagem neoplásica e uma não-tumoral, indicando o potencial uso deste composto em testes clínicos (SUFFNESS et al., 1991). Assim, neste estudo, o IS corresponde a divisão entre o valor da IC_{50} de cada composto-teste encontrado na linhagem de células não-tumorais pelo valor da IC_{50} do mesmo composto na linhagem de células tumorais ($IS = IC_{50} \text{ células não-tumorais} / IC_{50} \text{ células tumorais}$). Para análise comparativa, foi considerado significativo um valor de IS próximo ou maior a 2,0, indicando que o composto foi aproximadamente duas vezes mais ativo na linhagem de células neoplásicas do que em células não-tumorais (SUFFNESS et al., 1991). Como referência para as linhagens de câncer sólido, foram utilizadas as células da linhagem WI-26-VA4, enquanto para as linhagens leucêmicas, utilizaram-se as células PBMC, ambas consideradas linhagens não tumorais.

3.2.5 Avaliação de apoptose por marcação com Anexina V/IP analisada por citometria de fluxo

Para a avaliação da indução da apoptose foi utilizado o Kit *Annexin V-FITC Apoptosis Detection* (BD biosciences, cat # 556547, EUA) de acordo com as instruções do próprio fabricante.

Neste ensaio, 1×10^6 células foram plaqueadas em microplacas de seis poços na presença do composto teste na concentração do valor do IC_{50} previamente determinado pelo ensaio de MTT e $IC_{50}/2$. Após exposição ao composto teste por 48 horas, as células foram centrifugadas, lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS - pH 7,4) e ressuspensas em 300 μ L de tampão de ligação de anexina (1X). Em seguida, as células foram marcadas com 5 μ L de Anexina V e 5 μ L de iodeto de propídeo (IP) e incubadas à 4 °C durante 15 minutos. Para a análise, 20.000 eventos foram utilizados para a quantificação celular em citômetro de fluxo (*LSR Fortessa BD biosciences*), em comprimento de onda de excitação de 488 nm para o IP e 530 nm para Anexina-V. Controles não marcados foram utilizados para avaliar a autofluorescência das células e controles de células não tratadas foram marcadas com anexina e IP para avaliar a morte celular das células sem tratamento. A população de células em cada quadrante foi determinada usando o *software FlowJo x10.0.7*.

Quanto a classificação, as células em apoptose inicial foram as marcadas apenas com Anexina V (AN+)/(IP-), as células em necrose apenas com IP (AN-)/(IP+), células em apoptose tardia foram as com dupla marcação de Anexina V e IP (AN+)/(IP+) e as células viáveis não apresentaram nenhuma marcação.

3.2.6 Análise do ciclo celular

A aplicação da citometria de fluxo para a quantificação do DNA em suspensões celulares, recorrendo à utilização de iodeto de propídeo (IP) (BD biosciences, cat # 556547, USA), permite avaliar a distribuição das células pelas diferentes fases do ciclo celular, G0/G1, S e G2/M, em um determinado momento, uma vez que a intensidade de fluorescência do IP é proporcional à quantidade de DNA.

Para a avaliação do ciclo celular tratou-se as células com os compostos mais ativos na concentração de IC_{50} por 48 horas. Após o tratamento, as células foram transferidas para tubo de 15 mL e incubadas a -20 °C com 500 μ L de etanol 70% por

12 horas. Em seguida, as células foram lavadas com 1 mL PBS, ressuspensas em 200 µL de solução de marcação (0,0914 g de MgCl₂; 0,0774 g de Citrato de Sódio; 0,0477 g de Hepes; 10 µL de Triton X-100 1%; 250 µL de IP 1 mg/mL; 9,74 mL de água destilada) e incubadas no gelo por 30 minutos. As células marcadas foram analisadas no citômetro de fluxo (*LSR Fortessa BD biosciences*), usando comprimento de onda de excitação de 488 nm. O filtro usado para a leitura da emissão foi o de 585/42 nm, relativos aos comprimentos de excitação e emissão do IP. Para cada análise, cerca de 20.000 eventos foram lidos em escala linear.

3.2.7 Análise da Expressão Gênica

3.2.7.1 Extração de RNA

Para a análise da expressão gênica, foram plaqueadas 1×10^7 células em microplacas de seis poços. Essas células foram divididas em dois grupos: o controle não tratado e o grupo tratado com os compostos selecionados em suas respectivas concentrações de IC₅₀, por um período de 48 horas. Após a incubação, as células foram coletadas e submetidas ao processo de extração de RNA, utilizando o Kit de extração *AllPrep DNA/RNA Mini* (QIAGEN®, cat. # QIA80204, EUA), seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

No processo de extração de RNA, as células foram centrifugadas e ressuspensas por pipetagem e agitação em vórtex em 600 µL de Tampão RLT *Plus*. O lisado resultante foi transferido para uma coluna de centrifugação *AllPrepDNA* e centrifugado por 30 segundos a 8.000 x g para separação do DNA. Enquanto a coluna foi preservada para posterior extração de DNA, adicionou-se 600 µL de etanol a 70% ao eluato contendo o RNA. Em seguida, 700 µL da amostra foram transferidos para uma coluna RNeasy e centrifugados por 15 segundos a 8.000 x g, repetindo o processo até que todo o conteúdo fosse processado.

Para a lavagem da membrana contendo o RNA, adicionou-se 700 µL de *Buffer RW1*, seguido de centrifugação por 15 segundos a 8.000 x g. Posteriormente, 500 µL de *Buffer RPE* foram adicionados para uma nova lavagem em duas etapas, com centrifugações de 15 segundos a 8.000 x g na primeira etapa e 2 minutos na mesma velocidade na segunda etapa. Após essa última lavagem, a coluna RNeasy foi

transferida para um novo tubo de coleta, e 50 µL de água livre de RNase foram adicionados. A eluição do RNA ocorreu por centrifugação a 8.000 x g por 1 minuto.

O RNA extraído foi quantificado por leitura espectrofotométrica usando o espectrofotômetro *NanoDrop™ Lite* (Thermo Fisher Scientific, CA, EUA), e a pureza foi avaliada através da razão 260/280 (Quadro 3 - ANEXO 3). Destaca-se que valores próximos a 2,0 indicaram grau de pureza satisfatória. Em seguida, os RNAs foram armazenados a -80 °C até que a etapa de confecção de cDNA fosse realizada.

3.2.7.2 Confecção de cDNA

Os RNAs extraídos foram submetidos à reação de transcriptase reversa para obtenção de DNA complementar (cDNA) utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription kit®* (Applied Biosystems, CA, USA) seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. A obtenção do cDNA foi realizada utilizando-se 100 ng de RNA total e o seguinte programa de ciclagem: 25 °C por 10 min; 37 °C por 120 min; 85 °C por 5 min; sendo finalizado a 4 °C, em Termociclador modelo *Veriti 96-Well Thermal Cycler*, 0,2 mL (Applied Biosystems, CA, USA).

3.2.7.3 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

A análise da expressão gênica foi realizada através da quantificação relativa de cada gene alvo, normalizada em relação à expressão de um gene endógeno de referência. A quantificação relativa descreve mudanças de nível de expressão de um gene de interesse em uma amostra teste, relacionando esses valores a uma amostra utilizada como calibrador. Esta amostra referência trata-se de uma amostra que não recebeu o tratamento em estudo, ou uma amostra no tempo zero de tratamento. A partir destes critérios, aplicou-se o método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para comparação relativa dos níveis de expressão entre os genes alvo das amostras tratadas e o calibrador (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

A expressão dos genes *TP53*, *p21*, *Bcl-2*, *NOX-2* e *p47-phox* (Quadro 2) foi quantificada por meio do método de PCR quantitativo (qPCR) utilizando-se o GAPDH como gene endógeno e o kit *QuantiNova™ SYBR® Green PCR* (QIAGEN, cat. # 208056, EUA), conforme indicações do fabricante. O ensaio de PCR em tempo real foi realizado em termociclador *QuantStudio™ 5* (Thermo Fisher Scientific, CA, EUA), nas seguintes condições: 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 60 °C

por 1 minuto. Para término do processo acrescentou-se o estágio da curva de dissociação dos amplicons (95 °C por 15 segundos), que representa a temperatura na qual a metade das fitas de cDNA está na forma de fitas simples e a outra metade na forma de dupla hélice. A curva de dissociação permite verificar a formação de dímeros de oligonucleotídeos, ampliações inespecíficas e contaminações.

Quadro 2. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores diretos (F) e reversos (R) utilizados na qPCR.

Primers	Sequências
<i>TP53– F</i> <i>TP53– R</i>	5'- TGCAGCTGTGGGTTGATTCC -3' 5'- AAACACGCACCTCAAAGCTGTTC -3'
<i>P21– F</i> <i>P21 – R</i>	5'- TGAGCCGCGACTGTGATG -3' 5'- GTCTCGGTGACAAAGTCAAGTT -3'
<i>BCL-2 – F</i> <i>BCL-2 – R</i>	5'-TCCGCATCAGGAAGGCTAGA-3' 5'-AGGACCAGGCCTCCAAGCT-3'
<i>NOX-2 – F</i> <i>NOX-2 – R</i>	5'-GGAGTTTCAAGATGCGTGGAAACTA-3' 5'-CCAGACTCAGAGTTGGAGATGCT-3'
<i>p47-phox – F</i> <i>p47-phox – R</i>	5'-TTGAGAAGCGCTTCGTACCC-3' 5'-CGTCAAACCACTTG GGAGCT-3'
<i>GAPDH – F</i> <i>GAPDH – R</i>	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'

3.3 Estudo *In Silico*

3.3.1 Predição dos perfis *drug-like* dos compostos mais ativos

Para a predição dos perfis *drug-like* dos compostos mais ativos (*hits*), sete propriedades físico-químicas e moleculares foram calculadas utilizando o servidor *web SwissADME*: massa molecular (MM); predição do logaritmo do coeficiente de partição (n-octanol/água) (Mlog P); número de ligações rotacionáveis (nRtB); número de aceptores de ligação de hidrogênio (HBA); número de doadores de ligação de hidrogênio (HBD); área da superfície topológica polar (tPSA); refratividade molecular (MR) (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

Os perfis *drug-like* dos três compostos mais ativos foram analisados em termos de cinco regras empíricas de predição de biodisponibilidade oral, baseados nas extensões de diferentes propriedades físico-químicas e moleculares (Tabela 2) (EGAN; MERZ; BALDWIN, 2000; GHOSE; VISWANADHAN; WENDOLOSKI, 1999; LIPINSKI et al., 2001; MUEGGE; HEALD; BRITTELLI, 2001; VEBER et al., 2002).

Tabela 2. Regras de predição de biodisponibilidade oral propostas por Lipinski, Veber, Egan, Muegge e Ghose. **Fonte.** Adaptado de (PROTTI et al., 2021).

	Lipinski	Veber	Egan	Muegge	Ghose
Log P	≤ 5	-	≤ 5.88	$-2 \leq \log P \leq 5$	$-0.4 \leq \log P \leq 5.6$
MM	≤ 500 Da	-	-	$200 \leq MW \leq 600$ Da	$160 \leq MW \leq 480$ Da
HBA	≤ 10	-	-	≤ 10	-
HBD	≤ 5	-	-	≤ 5	-
tPSA	-	≤ 140 Å ²	≤ 131.6 Å ²	≤ 150 Å ²	-
nRtB	-	≤ 10	-	≤ 15	-
nAtom	-	-	-	-	$20 \leq nAtom \leq 70$
nCarbon	-	-	-	> 4	-
nHet	-	-	-	> 1	-
nRings	-	-	-	≤ 7	-
MR	-	-	-	-	$40 \leq MR \leq 130$ cm ³ mol ⁻¹

Log P: predição do logaritmo do coeficiente de partição (n-octanol/água); MM: massa molecular (g mol⁻¹); HBA: número de aceptores de ligação de hidrogênio; HBD: número de doadores de ligação de hidrogênio; tPSA: área da superfície topológica polar (Å²); nRtB: número de ligações rotacionáveis; nAtom: número de átomos; nCarbon: quantidade de carbono átomos; nHet: quantidade de heteroátomos; nRings: número de anéis; MR: refratividade molecular (cm³ mol⁻¹).

3.3.2 Modelagem Molecular

Após a predição do perfil *drug-like* dos compostos mais ativos, também foi proposto para este trabalho a realização da ancoragem molecular por meio do MolAr - BR512018052442-7 (MAIA et al., 2017) contra o *Our Own Molecular Targets Data Bank* (OOMT), sob a supervisão do pesquisador Prof. Dr. Fernando de Pilla Varotti, chefe do Laboratório de Bioquímica Medicinal da Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ-CCO).

O OOMT é um banco de alvos moleculares que contém receptores depositados no *Protein Data Bank* (PDB) relacionados à fisiopatologia do câncer e da malária. O principal objetivo do OOMT é facilitar o *Docking-based Virtual Screening* (DBVS), permitindo caracterizar e validar estudos *in silico* de novos compostos que tenham atividades contra diferentes alvos.

Nesse sentido, por meio do OOMT é possível selecionar alvos moleculares apropriados para moléculas promissoras, além de prever possíveis mecanismos de ação de novas moléculas com potencial ação antitumoral, além de orientar no reposicionamento de novos fármacos (MAIA et al., 2017).

As estruturas 3D dos ligantes foram inicialmente desenhadas e geradas pelo programa Marvin Beans 16.8.1.0 (*ChemAxon*, Budapeste, Hungria) no formato PDB, cuja forma protonada e a presença de tautômeros foram cuidadosamente verificados usando pH 7,4 (BENDER et al., 2021; ELOKELY; DOERKSEN, 2013). Em seguida, todos os ligantes foram refinados pelo Método Semiempírico Paramétrico 7 (PM7) (STEWART, 2013), implementado no MOPAC2012 usando a rotina *Eigenvector Follow* (EF) para minimização (DOYE; WALES, 1997; DUTRA et al., 2013). Posteriormente, os ligantes refinados, agora no formato *pdibt*, tiveram as ligações roteáveis e os hidrogênios polares verificados pelo programa *MGLTools* (MORRIS et al., 2009). O programa também ajustou as cargas atômicas dos ligantes usando método de Gasteiger (GASTEIGER; MARSILI, 1980).

Após a preparação dos ligantes, foram realizados os cálculos de ancoragem molecular utilizando o *software AutoDock Vina* (The Scripps Research Institute, Califórnia, EUA) (TROTT; OLSON, 2009), acoplado à plataforma Octopus (MAIA et al., 2017), com o ajuste do estado de protonação dos alvos para pH 7,4. Todos os cálculos foram feitos em triplicata.

A inspeção visual dos resultados, assim como a produção dos mapas farmacofóricos, foi realizada usando o programa *Discovery Studio Visualizer* (*Dassault Systemes BIOVIA*, Califórnia, EUA).

3.4 Análises estatísticas

Todos os valores do ensaio de citotoxicidade foram expressos como médias \pm desvio padrão (DP). Os valores de IC₅₀ foram calculados usando o programa *GraphPad Prism 7.04* (*GraphPad Software Inc. San Diego, CA, EUA*). Cada valor obtido no ensaio de citotoxicidade correspondeu à média de pelo menos três experimentos independentes em cada grupo. Para a análise estatística dos resultados obtidos de apoptose, ciclo celular e expressão gênica, empregou-se o teste de análise de variância de um fator (one-way ANOVA), seguido do teste de Dunnett. Essa abordagem foi utilizada para avaliar as diferenças significativas entre os grupos e compará-los ao grupo de controle, permitindo identificar possíveis variações nos dados. Para todas as análises, foi considerado significativos valores de $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaio de Viabilidade Celular

No ensaio de viabilidade celular (MTT), os vinte e três (23) compostos tiveram sua atividade citotóxica avaliada contra linhagens celulares humanas não-tumoral e tumoral *in vitro* após o período de 48 h de tratamento em diferentes concentrações (Tabela 3).

Tabela 3. Valores de IC₅₀ obtido a partir do ensaio de viabilidade celular (MTT) após 48 h de tratamento contra as linhagens MDA-MB-231, TOV-21g, WI-26 VA4, K-562, THP-1, HL-60 e PBMC.

COMPOSTOS	IC ₅₀ (μM) ± DP ^a						
	MDA-MB-231 ^c	TOV-21g ^d	WI-26VA4 ^e	K562 ^f	THP-1 ^g	HL-60 ^h	PBMC ⁱ
GSCB01	20,2 ± 7,95	39,89 ± ND ^p	31,62 ± 5,65	>100	>100	>100	>100
GSCB05	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
GSCB06	>100	>100	>100	>100	65,01 ± 14,38	>100	>100
GSCB15	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
GSCB54	>100	93,17 ± 18,87	12,4 ± 5,04	>100	14,36 ± 0,65	51,44 ± 10,06	>100
GSCB55	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
GSCB56	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
GSCB59	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
GSCB60	>100	>100	20,87 ± 4,4	>100	>100	>100	>100
GSCB61	>100	37,61 ± ND	>100	>100	>100	>100	>100
GSCB64	41,89 ± 4,59	>100	77,4 ± 6,71	>100	78,86 ± 2,32	>100	>100
GSCB65	12,94 ± 0,8	>100	24,47 ± 3,94	>100	35,37 ± 8,35	>100	>100
GSCB68	>100	40,32 ± 4,58	>100	>100	>100	>100	>100
GSCB69	>100	>100	85,29 ± 1,15	>100	>100	>100	>100
GSCB73	>100	>100	>100	>100	30,67 ± 4,22	>100	>100
GSCB74	>100	>100	>100	>100	19,29 ± 2,43	>100	>100
GSCB76	>100	>100	62,26 ± 10,41	>100	7,66 ± 1,97	24,71 ± 3,61	>100
GSCB77	>100	>100	>100	>100	8,95 ± 2,31	>100	>100
GSCB80	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
GSCB82	6,14 ± 1,03	9,02 ± 0,87	7,44 ± 1,98	>100	23,18 ± 1,89	48,67 ± 10,57	>100
GSCB83	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
GSCB85	1,18 ± 0,04	22,34 ± 2,49	65,72 ± 12,51	>100	4,18 ± 1,28	16,91 ± 2,49	>100
GSCB86	>100	>100	24,13 ± 2,53	>100	>100	>100	>100
Doxorrubicina ^b	2,3 ± 0,55	4,37 ± 1,06	1,9 ± 0,9	-	-	-	-
Cisplatina ^b	8,46 ± 1,41	27,02 ± 4,25	1,35 ± 0,91	-	-	-	-
Citarabina ^b	-	-	-	-	40,75 ± 4,45	-	>100
Imatinibe ^b	-	-	-	34,58 ± 4,2	-	-	>100

^a Os valores de IC₅₀ foram apresentados como médias ± DP de três experimentos independentes; ^b Controle positivo; ^c MDA-MB-231, linhagem celular de adenocarcinoma de mama; ^d TOV-21g, linhagem celular de câncer de ovário; ^e WI-26 VA4, linhagem celular de fibroblasto pulmonar; ^f K-562, linhagem

celular de leucemia mieloide crônica; ^g THP-1, leucemia monocítica aguda; ^h HL-60, Leucemia promielocítica aguda e ⁱ PBMC, linhagem celular não-tumoral do sangue periférico.

Os grupos referentes ao controle positivo receberam o tratamento com Doxorubicina, Cisplatina, Citarabina e Imatinibe (quimioterápicos já aprovados para uso clínico no tratamento de câncer de mama, ovário e leucemias, respectivamente) (AL-OU DAT et al., 2019; BUKOWSKI; KCIUK; KONTEK, 2020), enquanto o controle negativo (controle de viabilidade) não recebeu nenhum tipo de tratamento.

Os compostos **GSCB76**, **GSCB82** e **GSCB85** foram os que se mostraram mais ativos da série, apresentando os menores valores de IC₅₀ para as linhagens tumorais em comparação aos demais compostos testados e exibiram atividade mais potente contra as linhagens tumorais do que os medicamentos de referência utilizados neste estudo (Tabela 3). Além disso, ressalta-se também que esses mesmos compostos apresentaram um bom índice de seletividade em relação aos controles positivos (Tabela 4), uma característica importante para um novo fármaco quimioterápico (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010).

Tabela 4. Índice de Seletividade (IS) dos compostos mais ativos obtidos a partir do ensaio de viabilidade celular (MTT).

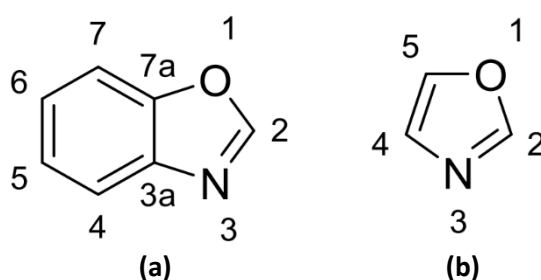
COMPOSTOS	Índice de Seletividade ^a				
	MDA-MB-231 ^d	TOV-21g ^e	K562 ^f	THP-1 ^g	HL-60 ^h
GSCB01	1,56	0,79	ND ^b	ND	ND
GSCB06	ND	ND	ND	>1,54	ND
GSCB54	ND	0,13	ND	>6,96	>1,94
GSCB61	ND	2,66	ND	ND	ND
GSCB64	1,85	ND	ND	>1,27	ND
GSCB65	1,89	ND	ND	>2,83	ND
GSCB68	ND	2,48	ND	ND	ND
GSCB73	ND	ND	ND	>3,26	ND
GSCB74	ND	ND	ND	>5,18	ND
GSCB76	ND	ND	ND	>13,05	>4,05
GSCB77	ND	ND	ND	>11,17	ND
GSCB82	1,21	0,82	ND	>4,31	>2,05
GSCB85	55,69	2,94	ND	>23,92	>5,91
Doxorrubicina ^c	0,83	0,43	ND	ND	ND
Cisplatina ^c	0,16	0,05	ND	ND	ND
Citarabina ^c	ND	ND	ND	>2,45	ND
Imatinibe ^c	ND	ND	>2,89	ND	ND

^a O índice de seletividade foi apresentado com base na relação IC₅₀ células não-tumorais/ IC₅₀ células tumorais; ^b Não Determinado (ND); ^c Controle positivo; ^d MDA-MB-231, linhagem celular de adenocarcinoma de mama; ^e TOV-21g, linhagem celular de câncer de ovário; ^f K-562, linhagem celular

de leucemia mieloide crônica; ^g THP-1; leucemia monocítica aguda e ^h HL-60, Leucemia promielocítica aguda.

Destaca-se que é possível estabelecer uma relação entre a atividade citotóxica e a estrutura química dos três compostos mais ativos e seletivos da série, uma vez que os compostos **GSCB82** e **GSCB85** são pertencentes a classe de benzoxazóis, enquanto o **GSCB76** é o precursor de ambos. O benzoxazol (Figura 6a) é um sistema aromático heterocíclico no qual um anel de benzeno está fundido às posições 4 e 5 do oxazol (Figura 6b). Por apresentarem uma atividade farmacológica diversa, os benzoxazóis representam um papel importante na busca por novas moléculas biologicamente ativas (WONG; YEONG, 2021).

Figura 7. Estrutura química Benzoxazol (a) e Oxazol (b). **Fonte.** Adaptado de (WONG; YEONG, 2021).



Nas últimas décadas, muito progresso foi feito para desenvolver derivados de benzoxazol em candidatos terapêuticos para o tratamento de diversos tipos de câncer (WONG; YEONG, 2021). Uma grande variedade de estudos já descreve a atividade citotóxica *in vitro* desses derivados, inclusive de forma semelhante a relatada com os compostos da mesma classe testados neste trabalho (EL-HELBY et al., 2019; GIORDANO et al., 2019; GLAMOČLIJA et al., 2018; PHILOPPES; LAMIE, 2019; ZILIFDAR et al., 2018). Nesse sentido, diante dos dados apresentados, esses três compostos foram os escolhidos para dar continuidade aos ensaios seguintes.

4.2 Avaliação de apoptose por marcação com Anexina V/IP analisada por citometria de fluxo

A redução significativa do número de células viáveis no ensaio de citotoxicidade na presença dos compostos **GSCB76**, **GSCB82** e **GSCB85**, principalmente para os modelos de câncer de mama (MDA-MB-231) e leucemia mieloide aguda (THP-1), pode ser explicada por uma provável ativação de mecanismos de morte celular. De

fato, em relação ao mecanismo de atuação dos compostos heterocíclicos, inúmeros estudos já relataram seu envolvimento em diversos processos celulares, como por exemplo, a capacidade de induzir a apoptose, gerar espécies reativas de oxigênio, inibir a angiogênese e promover a autofagia (AMEWU et al., 2021).

A apoptose é um processo rigorosamente regulado e caracteriza-se por numerosos eventos bioquímicos e alterações estruturais, como a ativação de caspases, externalização da fosfatidilserina, formação de corpos apoptóticos e a fragmentação nuclear (MOLLAZADEH; AFSHARI; HOSSEINZADEH, 2017). Nos estágios iniciais da apoptose, a fosfatidilserina é translocada para a superfície externa da membrana plasmática, e sua presença pode ser detectada por meio da ligação da proteína Anexina V marcada com fluoróforo (KOOPMAN et al., 1994; ZHANG; CHEN; LIANG, 2010).

Assim, com intuito de investigar se os compostos selecionados foram capazes de induzir a morte celular apoptótica, as células tratadas com os compostos testes nos valores de IC_{50} e $IC_{50}/2$ foram submetidas à análise por citometria de fluxo para distinguir as células viáveis das células apoptóticas ou necróticas, por emissão de fluorescência utilizando dois marcadores, a Anexina V (utilizada para marcar as células apoptóticas) e o Iodeto de Propídeo (IP) (usado para marcar células necróticas). Destaca-se que o IP, além de marcar células necróticas, também é capaz de marcar células em apoptose tardia pela sua capacidade de penetrar tanto em células mortas quanto em células que perderam a integridade de membrana, intercalando-se com o DNA e produzindo um aduto fluorescente (PIETKIEWICZ; SCHMIDT; LAVRIK, 2015; ZHANG; CHEN; LIANG, 2010).

Nesse contexto, as Figuras 8 e 10 evidenciam a distribuição percentual de células necróticas (Q1), células em apoptose tardia (Q2), células em apoptose inicial (Q3) e células viáveis (Q4) após um período de 48 horas de exposição aos compostos selecionados para o tratamento das linhagens celulares MDA-MB-231 e THP-1, respectivamente. De forma correspondente, as Figuras 8 e 10 retratam essas mesmas descobertas na forma de gráficos de barras. Vale ressaltar que tanto os compostos quanto as linhagens celulares foram escolhidos para este estudo com base em seus resultados mais favoráveis de atividade e seletividade no ensaio MTT em comparação com as outras linhagens testadas. É importante destacar que o composto **GSCB76**

não foi utilizado na linhagem MDA-MB-231 devido à baixa atividade citotóxica no ensaio anterior.

Figura 8. Indução de apoptose pelos compostos **GSCB76** (A), **GSCB82** (B) e **GSCB85** (C) em células THP-1 após 48 h de exposição. As células apoptóticas foram analisadas por citometria de fluxo e o ponto gráfico exibe a fluorescência Anexina V (eixo x, escala logarítmica) versus fluorescência IP (eixo y, escala logarítmica). (CV) controle de vida; (IC_{50} e $IC_{50}/2$) tratamentos.

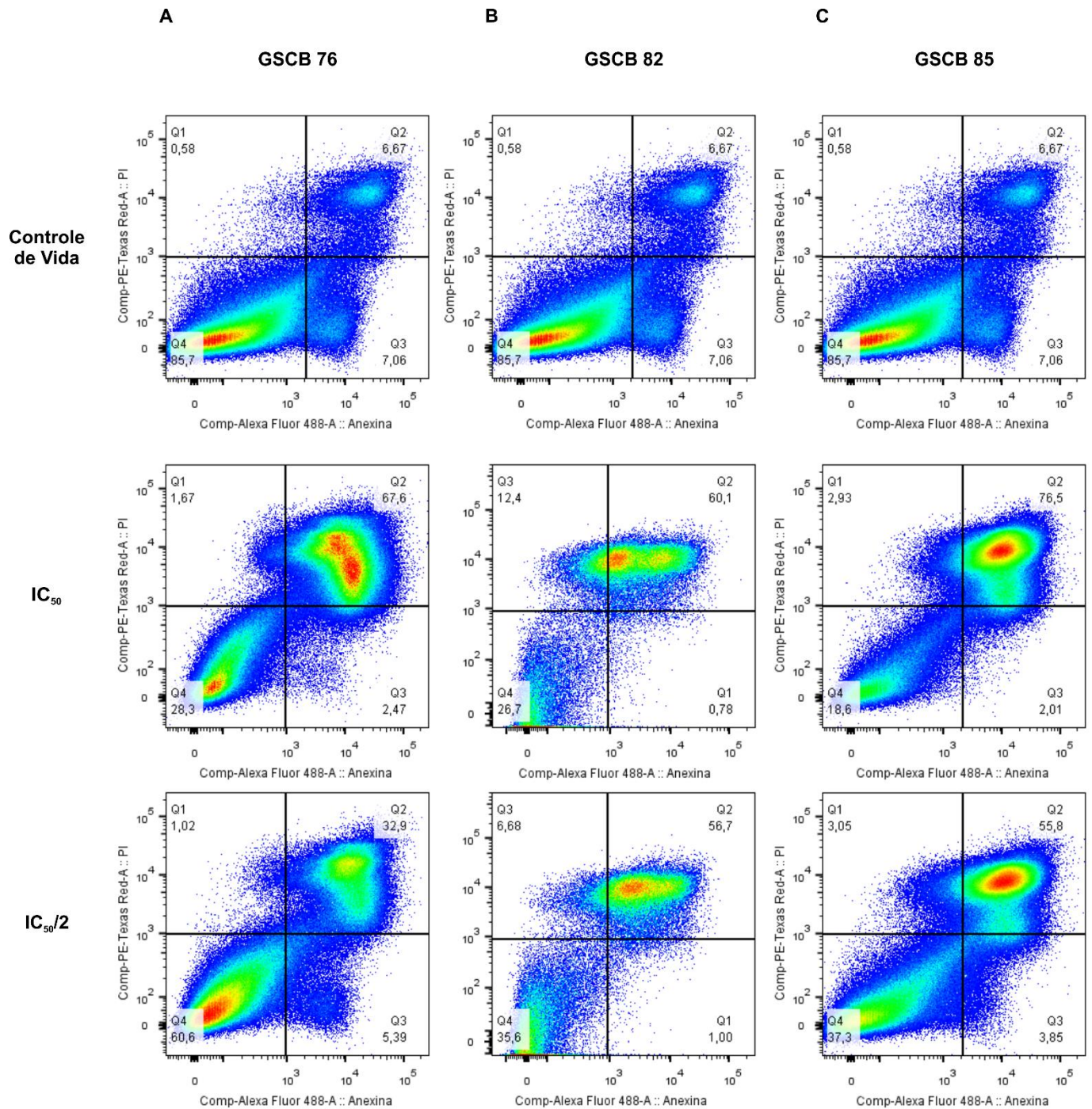
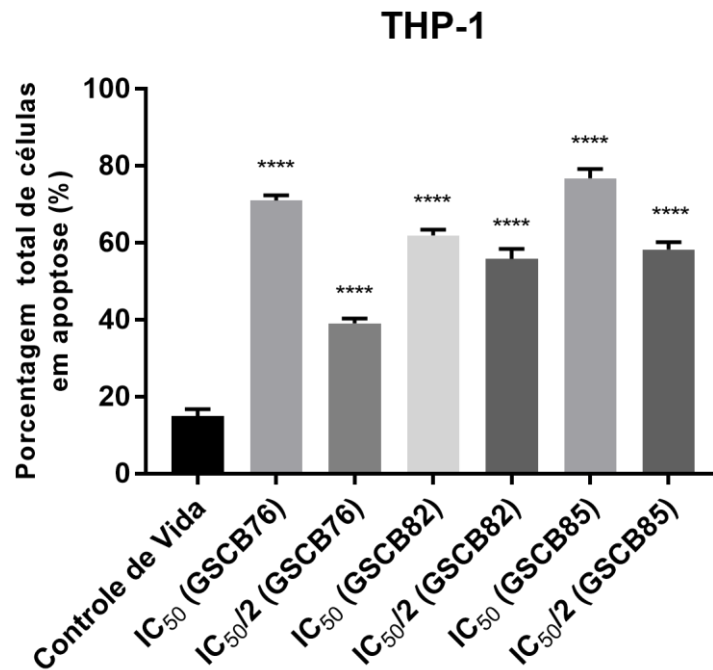


Figura 9. Porcentagem de células totais em apoptose (Q2 + Q3 – Figura 8) induzida pelos compostos **GSCB76**, **GSCB82** e **GSCB85** em células THP-1 após 48 h de exposição as respectivas concentrações IC_{50} e $IC_{50}/2$. Os resultados apresentam média e desvio padrão de pelo menos 2 resultados independentes. ** p valor $\leq 0,01$; *** p valor $\leq 0,001$; **** p valor $\leq 0,0001$.



Com base nos resultados apresentados acima, é possível observar que todos os compostos aumentaram expressivamente a porcentagem de células THP-1 nos quadrantes Q2 (apoptose tardia) após o período de 48 h de exposição, principalmente no grupo que recebeu o tratamento no valor de IC_{50} , quando comparados com o grupo controle que não recebeu nenhum tipo de tratamento (Figuras 8 e 9).

A apoptose tardia, representada pelo aumento da população de células no quadrante Q2, é um evento importante na avaliação da resposta celular aos compostos testados. Esse fenômeno indica que as células tratadas passaram por um estágio inicial de apoptose, caracterizado por alterações na morfologia celular e fragmentação do núcleo, porém ainda não alcançaram o estágio final de degradação completa (POON; HULETT; PARISH, 2010). A presença significativa de células no quadrante Q2 sugere que os compostos em questão estejam induzindo um processo apoptótico que se estende ao longo do período de observação de 48 horas. Esse prolongamento da apoptose pode ser um indicativo da eficácia desses compostos em desencadear uma resposta celular controlada, resultando eventualmente na eliminação das células tumorais.

Figura 10. Padrão de marcação de Indução de apoptose pelos compostos **GSCB82** (A) e **GSCB85** (B) em células MDA-MDB-231 após 48 h de exposição. As células apoptóticas foram analisadas por citometria de fluxo e o ponto gráfico exibe a fluorescência Anexina V (eixo x, escala logarítmica) versus fluorescência IP (eixo y, escala logarítmica). (CV) controle de vida; (IC_{50} e $IC_{50}/2$) tratamentos.

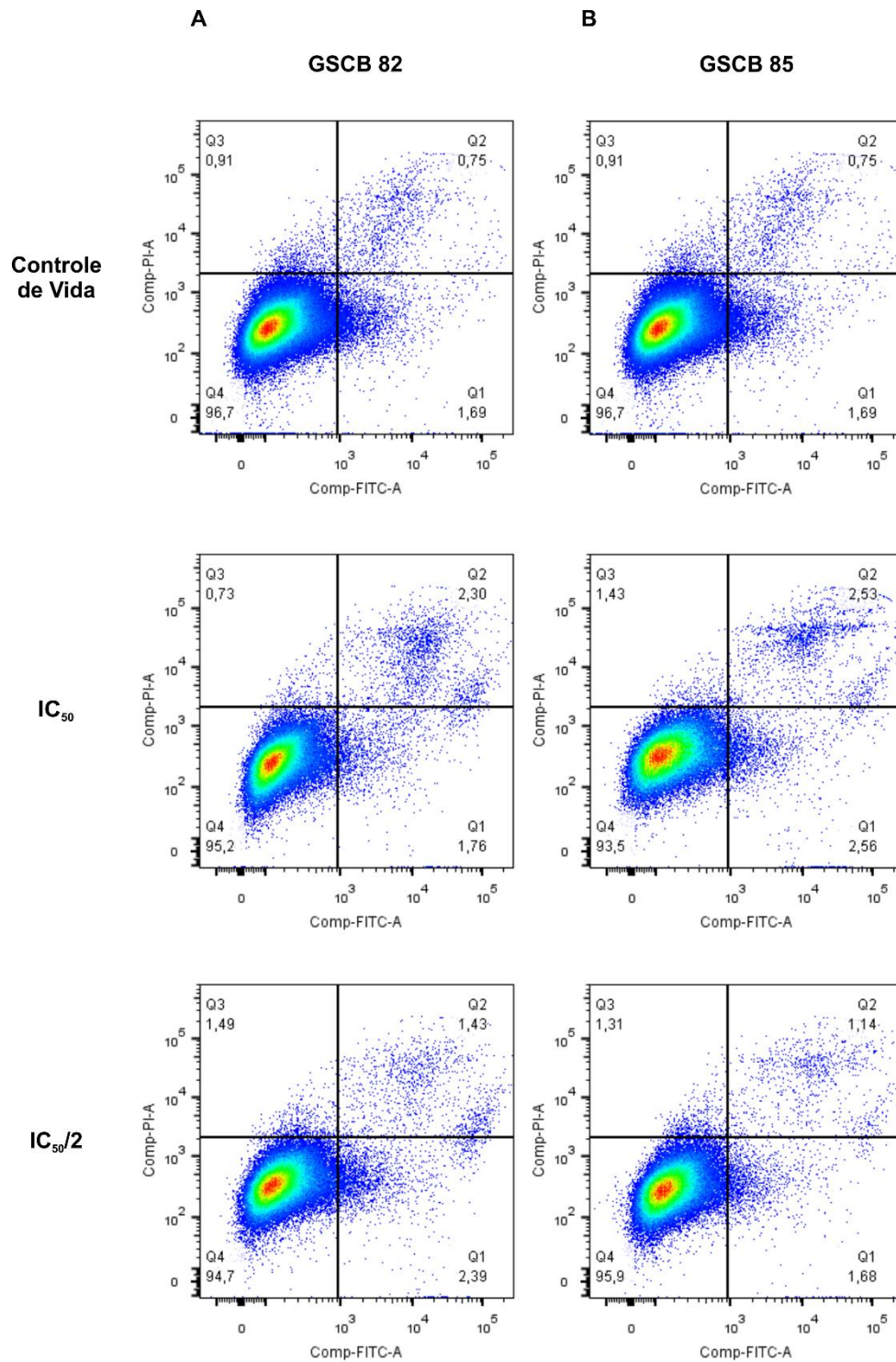
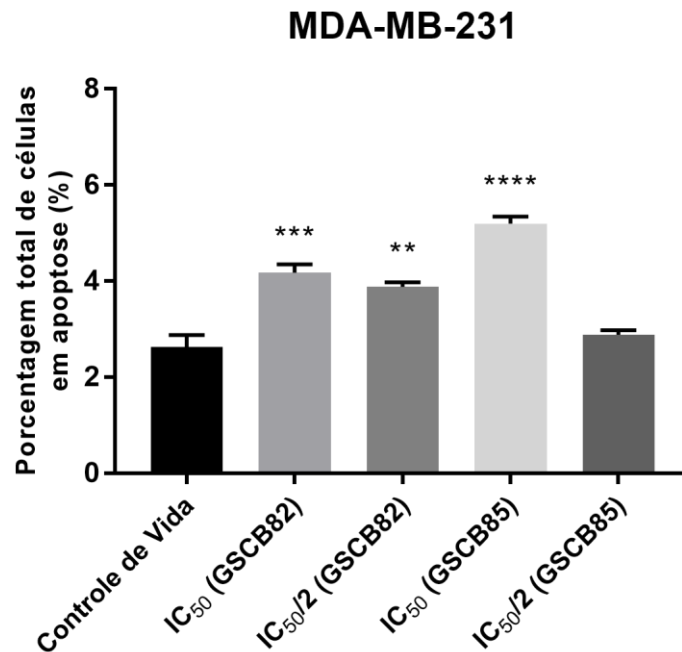


Figura 11. Porcentagem de células totais em apoptose (Q1 + Q2 – Figura 10) induzida pelos compostos **GSCB82** e **GSCB85** em células MDA-MB-231 após 48 h de exposição as respectivas concentrações IC_{50} e $IC_{50}/2$. Os resultados apresentam média e desvio padrão de pelo menos 2 resultados independentes. ** p valor $\leq 0,01$; *** p valor $\leq 0,001$; **** p valor $\leq 0,0001$.



No caso da linhagem MDA-MB-231, não foi observado o mesmo aumento expressivo na porcentagem de células em apoptose. No entanto, é importante ressaltar a diferença significativa entre os grupos tratado e não tratado (Figuras 10 e 11). Esse resultado pode sugerir que a alta citotoxicidade dos compostos **GSCB82** e **GSCB85**, evidenciada no ensaio de MTT, possa estar associada à ativação de mecanismos distintos do processo apoptótico. Um exemplo possível é o mecanismo autofágico.

O termo “autofagia” é comumente empregado para descrever, principalmente, a degradação dos próprios componentes celulares pelo lisossomo, e apesar da autofagia inicialmente ser considerada um mecanismo de morte celular, ele também pode atuar como um mecanismo que antecede a apoptose (HØYER-HANSEN et al., 2007; VICENCIO; LAVANDERO; SZABADKAI, 2010).

Essa inter-relação entre apoptose e autofagia, já foi associada a diversas vias de transdução de sinal ativadas por estresse celular e vias de sinalização mais específicas, como por exemplo, mediadores de estresse do tipo espécies reativas de

oxigênio (EROs); que podem estimular a atividade proteolítica das proteínas relacionadas à autofagia (Atg) e/ou favorecer a permeabilização da membrana mitocondrial externa, também chamada de transição de permeabilidade mitocondrial (TPM); um súbito aumento da permeabilidade da membrana interna que causa a dissipação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e subsequente permeabilização da membrana mitocondrial externa (LAVIEU et al., 2006; SCHERZ-SHOUVAL et al., 2007).

É sabido que, quando a TPM atinge uma grande fração de mitocôndrias, o processo de morte celular pode ser desencadeado. Entretanto, desde que a TPM afete apenas uma porção das mitocôndrias e que seja em condições de intensidade subapoptóticas, as mitocôndrias que sofreram a TPM podem ser removidas de forma seletiva por autofagia, processo chamado de mitofagia (VARA-PEREZ; FELIPE-ABRIO; AGOSTINIS, 2019).

Recentemente, a mitofagia vem sendo descrita como um mecanismo de sobrevivência celular utilizado pelas células cancerosas contra o início da apoptose mitocondrial, impulsionada pelo estresse celular consequente da exposição as várias classes de drogas ou tratamentos anticancerígenos disponíveis. Esses tratamentos causam, de forma direta ou indireta, a produção de EROs, disfunção mitocondrial e a liberação de citocromo C, iniciando a ativação de caspases e indução da apoptose. Nesse sentido, direcionar essas mitocôndrias disfuncionais à mitofagia parece dificultar o início da cascata apoptótica e contribuir de forma efetiva para a resistência às terapias já em uso (VARA-PEREZ; FELIPE-ABRIO; AGOSTINIS, 2019).

De forma geral, acredita-se que diferentes vias mitofágicas podem estar envolvidas na neutralização do dano mitocondrial induzido por tratamentos comumente empregados para diferentes tipos de câncer (VARA-PEREZ; FELIPE-ABRIO; AGOSTINIS, 2019). Estudos sugerem que a expressão de certos receptores ou mediadores da mitofagia em subtipos específicos de câncer é um fator decisivo na indução de resistência à terapia por depuração mitocondrial (CRISTOFANI et al., 2018; KIM et al., 2017; VILLA et al., 2017; YAN et al., 2017; YAO et al., 2019).

Ademais, apesar de ser prematuro concordar os dados obtidos até o momento com a indução de um possível mecanismo de mitofagia, a realização de estudos mais aprofundados acerca dos componentes chave envolvidos nessas vias pode ser

interessante para explicar a baixa correlação entre os resultados da análise de apoptose na linhagem celular MDA-MB-231 e o baixo valor de IC₅₀ encontrado no ensaio de MTT, um ensaio que baseia-se justamente na avaliação da atividade de enzimas mitocondriais (CARMICHAEL et al., 1987).

4.3 Análise do ciclo celular

A análise do ciclo celular foi realizada por citometria de fluxo, após 48 h de exposição aos compostos mais ativos na concentração dos respectivos valores de IC₅₀ previamente determinados no ensaio de MTT. A porcentagem de células apresentadas nas diferentes fases do ciclo (G0/G1, S e G2/M) foi estimada de forma quantitativa e transcrita na forma de gráficos de barras conforme demonstrado a seguir nas figuras 12 e 13. Ressalta-se que o composto **GSCB76** não foi testado contra a linhagem celular MDA-MB-231, uma vez que o mesmo não apresentou atividade citotóxica prévia.

Figura 12. Efeito do tratamento com os compostos **GSCB82** e **GSCB85** no ciclo celular nas células MDA-MB-231 após 48 h de exposição. As fases G0/G1, S e G2/M foram determinadas pela análise do conteúdo de DNA após marcação com IP e analisadas em citometria de fluxo. A porcentagem de células em cada fase foi quantificada pelo *software FlowJo x10.0.7*. Os resultados apresentam média e desvio padrão de pelo menos 2 resultados independentes. ** p valor ≤ 0,01; *** p valor ≤ 0,001; **** p valor ≤ 0,0001.

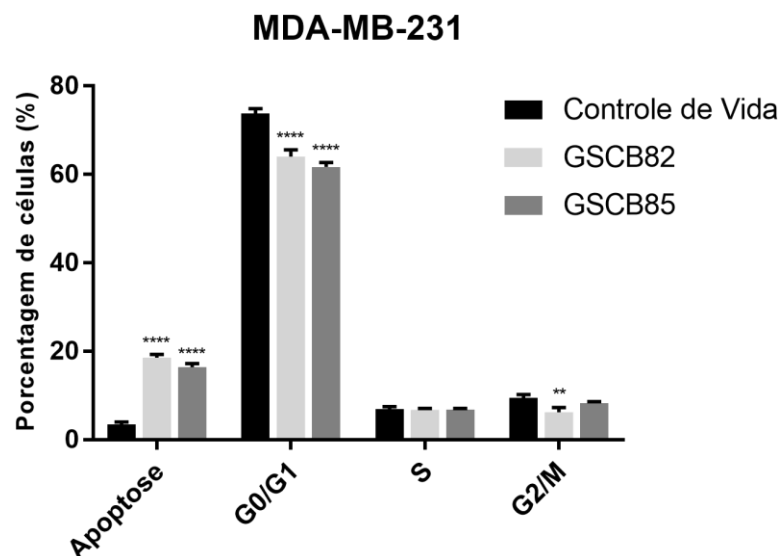
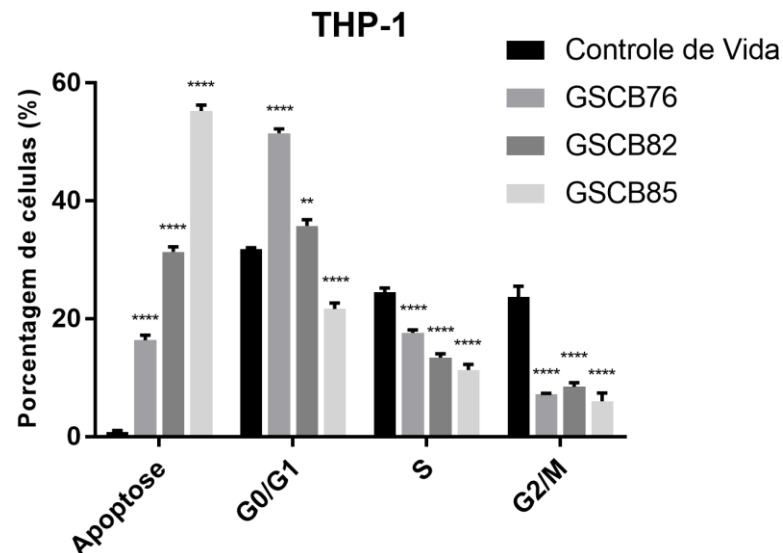


Figura 13. Efeito do tratamento com os compostos **GSCB76**, **GSCB82** e **GSCB85** no ciclo celular nas células THP-1 após 48 h de exposição. As fases G0/G1, S e G2/M foram determinadas pela análise do conteúdo de DNA após marcação com IP e analisadas em citometria de fluxo. A porcentagem de células em cada fase foi quantificada pelo *software FlowJo x10.0.7*. Os resultados apresentam média e desvio padrão de pelo menos 2 resultados independentes. ** p valor $\leq 0,01$; *** p valor $\leq 0,001$; **** p valor $\leq 0,0001$.



Mediante a análise visual dos gráficos fornecidos, torna-se evidente que, no contexto da linhagem MDA-MB-231 (Figura 12), os tratamentos com os compostos **GSCB82** e **GSCB85** não demonstraram um impacto significativo na progressão do ciclo celular. Apesar de ter havido uma redução notável no número de células na fase G0/G1, essa diminuição parece estar associada a um aumento correspondente no número de células em apoptose, em consonância com os resultados dos ensaios anteriores.

Essa tendência notável de aumento significativo na porcentagem de células em apoptose não se limitou à linhagem MDA-MB-231; também foi claramente observada nas células THP-1, conforme evidenciado na Figura 13. Além desse impacto pró-apoptótico, é importante destacar que, simultaneamente, houve uma redução significativa no número de células encontradas nas fases S e G2/M do ciclo celular, quando comparadas ao grupo controle que não recebeu tratamento. Esses resultados sugerem uma influência marcante dos compostos **GSCB76**, **GSCB82** e **GSCB85** sobre a progressão do ciclo celular, particularmente nas células THP-1.

No entanto, o fenômeno mais notável em relação às células THP-1 após o tratamento com os compostos **GSCB76** e **GSCB82** foi o acúmulo de células na fase G0/G1, como indicado na Figura 13. Esse acúmulo sugere uma possível interrupção da progressão do ciclo celular na transição da fase G1 para a fase S, o que pode ter implicações cruciais para o entendimento dos mecanismos de ação desses compostos.

Nesse sentido, considerando que o ciclo celular é uma sequência de eventos coordenados que culminam na divisão celular, um processo de vital importância para o desenvolvimento e a viabilidade de organismos multicelulares, é plausível supor que a interrupção observada no ciclo celular possa ser atribuída a uma reação de "alarme" desencadeada pelo estresse resultante da exposição prolongada aos compostos avaliados neste estudo. Essa resposta adaptativa pode indicar a ativação do processo de senescência celular, uma vez que se reconhece que, em função da intensidade e natureza do estresse, as células podem mobilizar vias de reparo, senescência ou até mesmo morte celular programada (GALLUZZI et al., 2018; KUMARI; JAT, 2021; SAPIEHA; MALLETT, 2018; SUROVA; ZHIVOTOVSKY, 2013).

Ademais, é importante salientar que esse acúmulo de células na fase G0/G1, observado após o tratamento com o compostos **GSCB82**, está em conformidade com os resultados de estudos anteriores envolvendo derivados benzoxazóis (KUZU et al., 2022; ZHONG et al., 2020). Pesquisas prévias relataram que compostos similares aos testados aqui perturbam o ciclo celular em células cancerosas, levando a uma parada na fase G0/G1, associada à inibição da proliferação celular e à indução da apoptose (ABOULWAFI; DAABEES; EL-SAID, 2023; ZHONG et al., 2020). Essas constatações reforçam a hipótese de que esses compostos podem estar agindo de maneira semelhante, interrompendo a progressão do ciclo celular na fase G0/G1. Isso, por sua vez, pode ser um dos principais mecanismos subjacentes aos seus efeitos inibitórios sobre o crescimento celular.

No geral, até o momento, os resultados estabelecem uma ligação significativa com a literatura, fornecendo evidências sólidas da influência desses compostos nas vias de regulação do ciclo celular. Isso destaca a importância de uma investigação mais aprofundada de seus mecanismos de ação, bem como do seu potencial valor terapêutico.

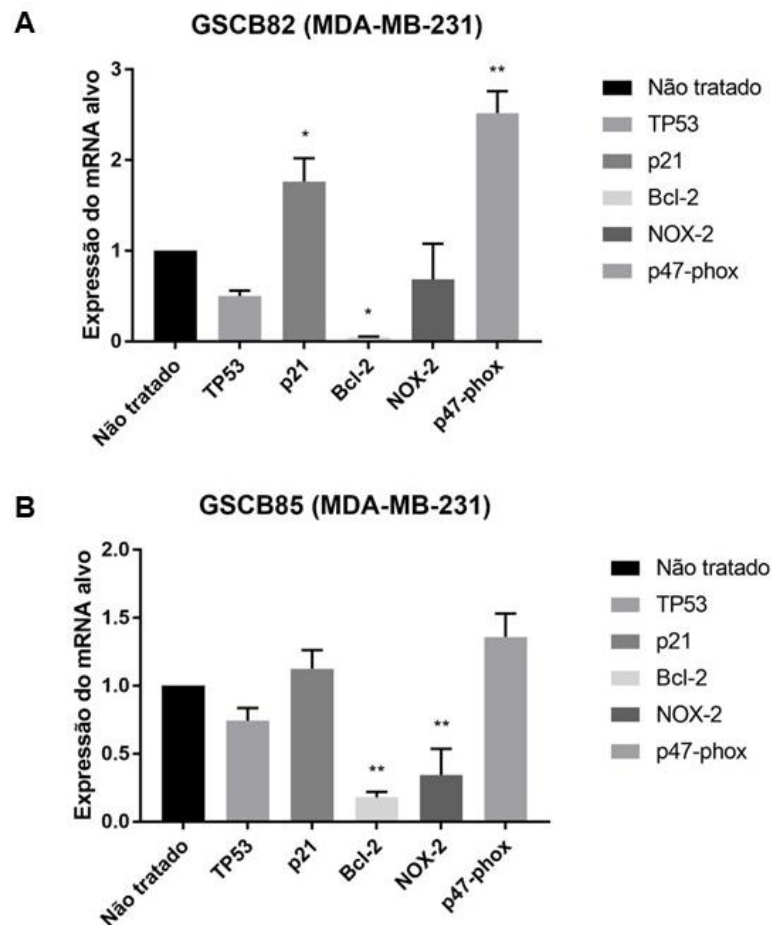
4.4 Expressão gênica

A análise da expressão dos genes *TP53*, *p21*, *Bcl-2*, *NOX-2* e *p47-phox*, realizada após a avaliação da apoptose e análise do ciclo celular em células tumorais, desempenhou neste estudo um papel significativo na compreensão dos possíveis mecanismos subjacentes à resposta celular diante dos tratamentos propostos.

É sabido que a apoptose desempenha um papel crucial no controle do crescimento celular anormal e a investigação dos genes *TP53* e *Bcl-2*, conhecidos reguladores desse processo biológico, permite uma compreensão mais profunda desse fenômeno (ENGELAND, 2018; FRIDMAN; LOWE, 2003; STRASSER et al., 2017). Além disso, a análise do gene *p21*, que regula a progressão do ciclo celular, e dos genes *NOX-2* e *p47-phox*, envolvidos na produção de EROs, desempenha um papel essencial na avaliação das possíveis interrupções do ciclo celular e ativação de processos de estresse oxidativo, respectivamente (ABBAS; DUTTA, 2009; LANDRY; COTTER, 2014; LEE et al., 2009; NOCELLA et al., 2023; PECCHILLO CIMMINO et al., 2023).

Nesse contexto, a análise da expressão dos genes *TP53*, *p21*, *Bcl-2*, *NOX-2* e *p47-phox*, posteriormente a exposição aos compostos **GSCB82** e **GSCB85** na linhagem de câncer de mama MDA-MB-231, bem como aos **GSCB76**, **GSCB82** e **GSCB85** na linhagem leucêmica THP-1, encontra-se ilustrada nas figuras 14 e 15 subsequentes. De modo geral, é importante destacar que os resultados aqui encontrados revelaram respostas diferenciadas entre os genes investigados. Essa variabilidade nos padrões de resposta evidencia a ocorrência de uma regulação complexa e contextualizada, diretamente influenciada tanto pelos compostos quanto pelas características específicas das linhagens celulares em questão.

Figura 14. Efeito do tratamento com os compostos **GSCB82 (A)** e **GSCB85 (B)** no padrão de expressão gênica de células MDA-MB-231 após 48 h de exposição. * p valor $\leq 0,05$; ** p valor $\leq 0,01$.



Para a linhagem MDA-MB-231 (Figura 14), o aumento significativo nos níveis de expressão dos genes *p21* e *p47-phox* após o tratamento com o composto **GSCB82** (Figura 13A) pode ser um achado notável quando correlacionamos esses resultados com as conclusões obtidas previamente durante a avaliação da apoptose e do ciclo celular por meio da citometria de fluxo. Essa observação é justificável, uma vez que o aumento na expressão desses genes sugere que esses compostos podem estar provocando respostas celulares que se associam a encontradas em mecanismos de resistência, por meio da ativação de genes envolvidos em vias de sinalização cruciais para a sobrevivência celular (ABBAS; DUTTA, 2009; LANDRY; COTTER, 2014).

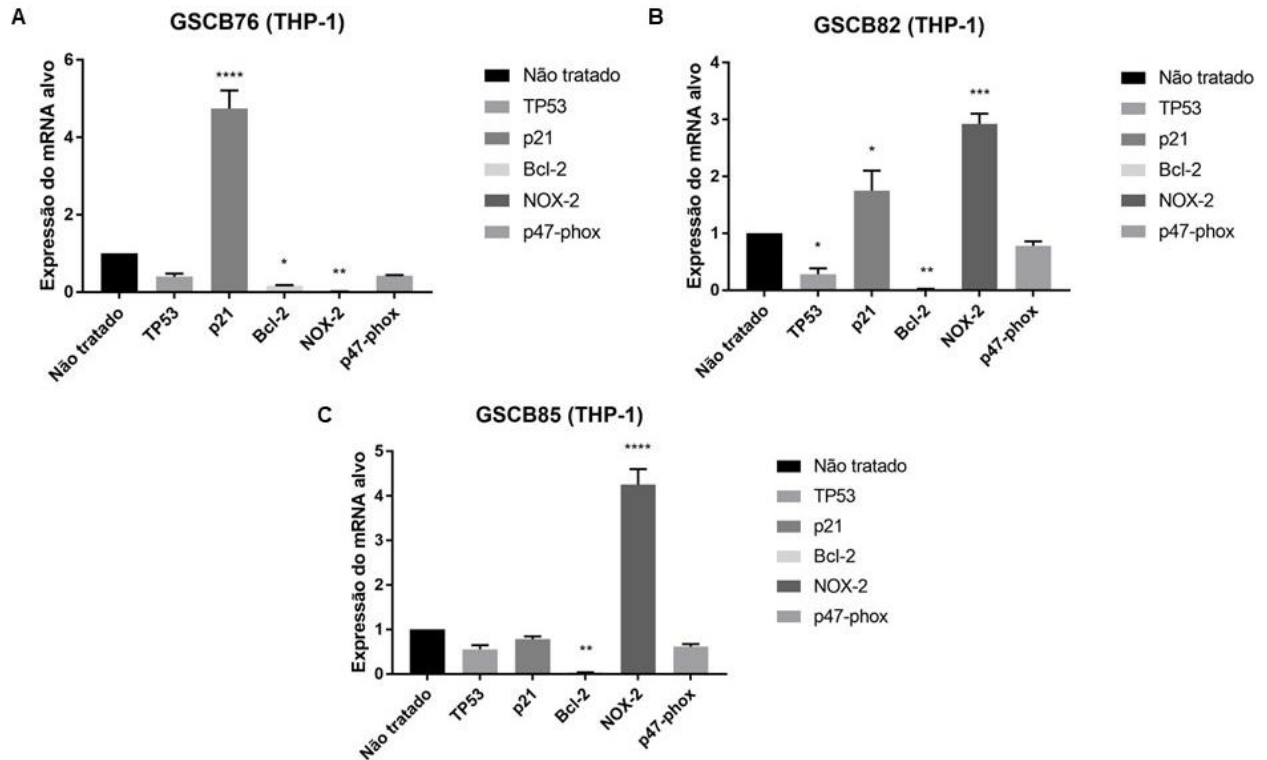
De maneira surpreendente, a expressão do gene que codifica a proteína antiapoptótica *Bcl-2* apresentou uma redução significativa após o tratamento com ambos os compostos em comparação com o grupo controle (sem tratamento), sugerindo um possível direcionamento da célula para a ativação da via apoptótica

(Figura 14A e 14B). No entanto, é válido ressaltar que, apesar da diminuição nos níveis de *Bcl-2* estar associada a ativação da apoptose, a baixa porcentagem de células em apoptose detectada na citometria indica um impacto mais sutil sobre o processo apoptótico. Isso ressalta a complexidade das respostas celulares e destaca a necessidade de considerar outros fatores na análise desses resultados.

Em relação a expressão do gene *TP53*, observa-se que ambos os compostos não foram capazes de estimular alterações significativas em relação ao grupo que não recebeu tratamento (Figura 14A e 14B). O *TP53* é um pilar na regulação de respostas ao estresse celular e apoptose, e sua falta de resposta direta pode indicar uma regulação dos processos mencionados de forma independente da proteína *p53* (LEE et al., 2009; PARK et al., 2017). Por outro lado, a redução significativa da expressão do gene *NOX-2* (Figura 14B) pode indicar que seus efeitos não estejam diretamente ligados à produção de EROs para esta linhagem após a exposição ao composto **GSCB85**, o que ainda sim não descartaria o envolvimento desse gene em um provável mecanismo de resistência ou indução de apoptose envolvendo EROs.

Já para linhagem THP-1 (Figura 15), em consideração aos resultados da expressão gênica encontrados na linhagem MDA-MB-231, revelou nuances intrigantes que destacam a complexidade das respostas celulares e a influência do tipo celular na regulação gênica, uma vez que, ao ser exposta aos mesmos compostos **GSCB82** e **GSCB85**, exibiu um padrão de expressão gênica distinto.

Figura 15. Efeito do tratamento com os compostos **GSCB76 (A)**, **GSCB82 (B)** e **GSCB85 (C)** no padrão de expressão gênica de células THP-1 após 48 h de exposição. * p valor $\leq 0,05$; ** p valor $\leq 0,01$; *** p valor $\leq 0,001$; **** p valor $\leq 0,0001$.



Embora algumas semelhanças tenham sido observadas entre as linhagens, como o aumento na expressão de *p21* e a notável redução na expressão de *Bcl-2*, que reforçam a hipótese de indução de morte celular programada, as diferenças nas respostas dos demais genes analisados revelam a especificidade das reações conforme o tipo de célula. Um exemplo, seria a inalteração nos níveis de expressão de *p47-phox* e o aumento significativo de *NOX-2* encontrados na linhagem THP-1, em contraste com a linhagem MDA-MB-231 (Figura 15B e 15C). No entanto, é importante salientar que esse aumento significativo nos níveis de *NOX-2* em THP-1 após a exposição aos compostos **GSCB82** e **GSCB85**, não foi verificado para o composto **GSCB76**. Pelo contrário, o que se observou foi uma marcante redução em comparação ao grupo não tratado (Figura 15A).

Essa última observação torna-se interessante quando se leva em consideração que estudos atuais destacam o papel crucial das EROs extracelulares, que dependem da atividade da *NOX-2*, na supressão da apoptose em pacientes com LMA e que a

expressão alterada da NOX-2 já foi documentada em mais de 60% dos indivíduos diagnosticados com essa doença (ROY et al., 2015).

A enzima NOX-2, também conhecida como gp91-phox, desempenha uma função vital no sistema imunológico, sendo amplamente expressa em células como monócitos, macrófagos e granulócitos, onde contribui de maneira significativa para a resposta imune inata. Além desse papel tradicional, a NOX-2 também é expressa em diversos tecidos e células que não estão diretamente relacionados à fagocitose, incluindo neurônios e células musculares esqueléticas, destacando sua versatilidade na biologia celular (NOCELLA et al., 2023).

A ativação da NOX-2 envolve a formação de um complexo com a proteína p22-phox e requer a translocação de fatores citosólicos, tais como p47-phox, p40-phox, p67-phox e Rac, para o complexo NOX-2/p22-phox. Isso desencadeia a produção aumentada de EROs, que por sua vez cria um ambiente oxidado com implicações críticas na tumorigênese, progressão tumoral, proliferação celular e metabolismo celular (NOCELLA et al., 2023; PECCHILLO CIMMINO et al., 2023).

De modo geral, é sabido que as EROs geradas pela NOX são capazes de induzir apoptose em variadas células cancerosas *in vitro*, ativando a cascata de caspases e resultando na morte da células. Alguns medicamentos antitumorais, como vinblastina, doxorrubicina e camptotecina, também demonstram atividade antitumoral ao promoverem a morte celular por apoptose dependente de EROs, o que reforça o potencial uso de substâncias com efeitos similares como agente antitumoral (SKONIECZNA et al., 2017). No entanto, é importante destacar um efeito bifásico das EROs na proliferação celular. Níveis baixos dessas moléculas, em concentrações submicromolares, podem estimular o crescimento celular, enquanto concentrações mais elevadas, tendem a induzir apoptose ou necrose. Esse fenômeno foi observado em diversos tipos celulares, incluindo células primárias, células imortalizadas e células transformadas de origens distintas (LANDRY; COTTER, 2014; SKONIECZNA et al., 2017).

Em células primárias de LMA, já foi descrito que a atividade da NOX-2 está diretamente relacionada à regulação de proteínas como a proteína desacopladora 2 (UCP2) e a fosforilação da proteína quinase ativada por 5'-AMP (AMPK), com efeitos positivos na expressão da enzima glicolítica 6-fosfofruto-2-quinase/frutose-2,6-

bifosfatase (PFKFB3), que desempenha um papel crucial na regulação da glicólise, promovendo a captação de glicose e estimulando a proliferação celular (PECCHILLO CIMMINO et al., 2023; ROBINSON et al., 2021).

Além disso, outros estudos demonstram que, em células leucêmicas de pacientes com LMA, as EROs geradas pela NOX-2 também podem desempenhar um papel de destaque no metabolismo dos esfingolipídios, na oxidação dos ácidos graxos, no metabolismo de purinas e na manutenção da homeostase de aminoácidos (ROBINSON et al., 2021). Portanto, torna-se evidente que a NOX-2 desempenha um papel multifacetado na regulação do metabolismo celular, com implicações significativas no contexto das células de LMA, o que a torna um objeto de estudo no âmbito tumoral.

4.5 Perfis *drug-like* dos compostos mais ativos

Para uma molécula bioativa, ter uma alta biodisponibilidade oral é de fato um requisito importante no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (VEBER et al., 2002). A biodisponibilidade oral de um fármaco depende da solubilidade, permeabilidade e características de transporte por meio das barreiras biológicas, estabilidade química no trato gastrointestinal e vários mecanismos de depuração. Assim, um objetivo importante para a descoberta de novas drogas é obter compreensão suficiente das propriedades moleculares que caracterizam a biodisponibilidade oral de um potencial candidato a novo fármaco (NAVIA; CHATURVERDI, 1996; VEBER et al., 2002).

Nesse sentido, é apresentado na Tabela 5 os resultados das predições das propriedades farmacêuticas dos três compostos de interesse (**GSCB76**, **GSCB82** e **GSCB85**).

Tabela 5. Propriedades físico-químicas e moleculares previstas para as moléculas sintetizadas.

COMPOSTOS	MM	<i>MlogP</i>	HBA	HBD	tPSA	nRtB	MR
GSCB76	249,35	1,88	2	0	91,46	4	70,32
GSCB82	262,26	1,36	3	1	69,79	2	74,39
GSCB85	296,71	1,87	3	1	69,79	2	79,40

MM: massa molecular (g mol^{-1}); *MlogP*: predição do logaritmo do coeficiente de partição (n-octanol/água); nRtB: número de ligações rotacionáveis; HBA: número de aceptores de ligação de hidrogênio; HBD: número de doadores de ligação de hidrogênio; tPSA: área da superfície topológica polar (Å^2); MR: refratividade molecular ($\text{cm}^{-3} \text{mol}^{-1}$).

A análise dos valores de *log P* revelou um baixo caráter lipofílico nos compostos selecionados. Além disso, ao comparar esses valores com as regras empíricas avaliadas, verificou-se que todos os três compostos atendem às cinco regras estudadas. Isso sugere que esses compostos apresentam um alto potencial *drug-like*, indicando que são promissores candidatos para o desenvolvimento de protótipos farmacêuticos que podem ser administrados por via oral (EGAN; MERZ; BALDWIN, 2000; GHOSE; VISWANADHAN; WENDOLOSKI, 1999; LIPINSKI et al., 2001; MUEGGE; HEALD; BRITTELLI, 2001; PROTTI et al., 2021; VEBER et al., 2002).

4.6 Modelagem molecular

A identificação e caracterização de moléculas farmacologicamente ativas é uma necessidade que move esforços nos âmbitos da pesquisa científica no mundo todo. Apesar da aplicabilidade de tais moléculas apresentarem-se de forma distinta, o objetivo principal do processo de desenvolvimento de novos fármacos é a obtenção de moléculas que tenham eficácia e especificidade frente ao alvo terapêutico, além de baixos custos e ausência ou diminuição de riscos aos potenciais pacientes (BHATNAGAR; KIM, 2010).

Nesse sentido, uma vez que a determinação de prováveis alvos moleculares com os quais uma nova molécula interage é relevante na descoberta e desenvolvimento racional de novos fármacos, a modelagem molecular neste trabalho buscou, por meio da triagem virtual, predizer possíveis interações dos compostos **GSCB76**, **GSCB82** e **GSCB85** com os alvos depositados no *Our Own Molecular*

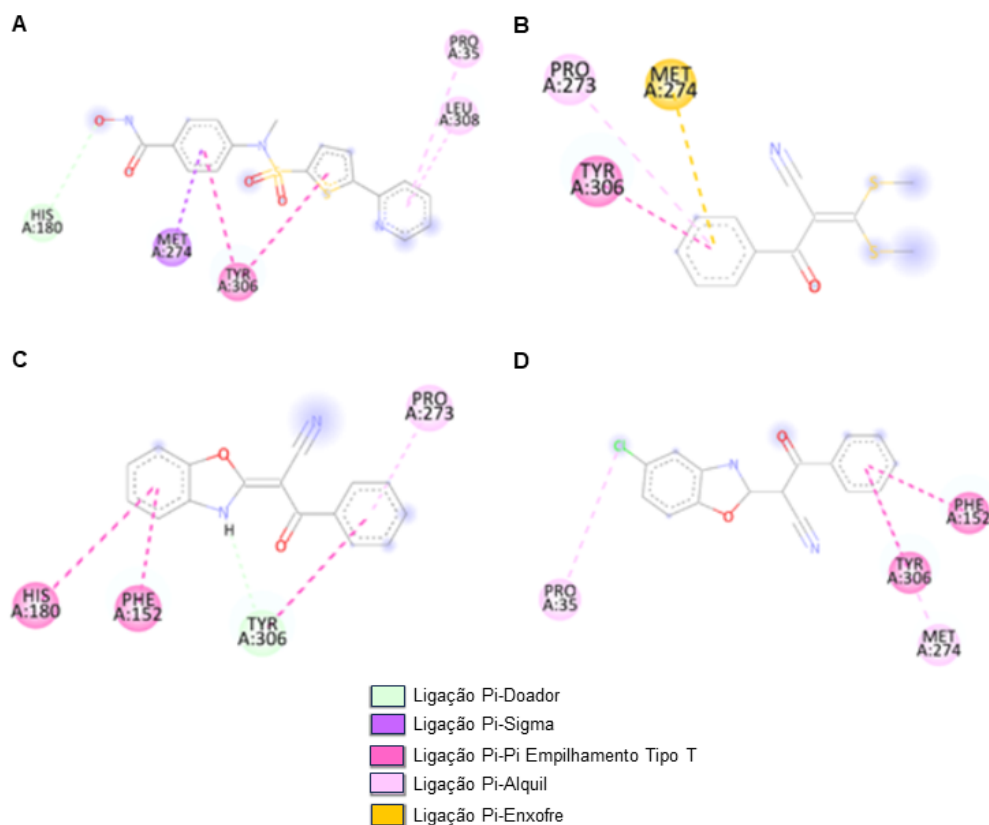
Targets Data Bank (OOMT). Os valores de energia de ligação gerados estão apresentados na Tabela 6 a seguir.

Tabela 6. Energia de ligação pela ancoragem molecular dos compostos contra o OOMT.

ALVOS	Energia de ligação kcal/mol			
	GSCB76	GSCB82	GSCB85	LIGANTE CRISTALOGRAFICO
1AGW	-5,6	-6,6	-6,7	-8,1
1DDX	-7,7	-9,3	-9,1	-9,2
1GKC	-6,5	-8,8	-8,2	-6,6
1GMY	-5,5	-6,0	-6,2	-7,7
1LD8	-5,8	-7,5	-7,9	-13,2
1LF3	-5,7	-7,9	-7,3	-10
1LRH	-4,3	-5,0	-5,6	-7,7
1QIB	-6,5	-8,9	-8,2	-9,3
1QJA	-4,7	-5,6	-6,1	-11
1R6A	-6,7	-7,7	-8,0	-8,2
1W22	-4,4	-5,5	-5,4	-4,3
1W6M	-4,3	-5,3	-6,1	-9
1Z57	-7,7	-8,2	-8,5	-9,5
1ZZ1	-5,2	-6,5	-7,0	-7,6
2ANL	-5,5	-7,3	-7,2	-10
2HYY	-6,6	-8,0	-7,7	-12,6
2K05	-5,2	-6,6	-6,5	-33,3
2QHN	-5,9	-7,1	-6,8	-7,4
2VV9	-6,4	-7,7	-8,0	-9,1
2W15	-6,4	-7,5	-7,7	-8,5
2YOE	-6,0	-7,2	-7,8	-5,4
2ZOQ	-6,3	-7,5	-8,0	-7,8
3BKY	-5,8	-7,0	-6,6	-9,1
3BPF	-5,3	-6,1	-5,9	-6,7
3BZ3	-6,2	-7,5	-7,4	-11,1
3C4C	-6,7	-9,3	-9,1	-10,4
3DV3	-6,0	-8,0	-8,0	-9,4
3EDQ	-5,2	-6,0	-6,6	-10,7
3ENE	-6,2	-7,1	-7,3	-9,8
3EYG	-7,2	-7,3	-7,4	-8,9
3FAP	-6,6	-7,7	-8,1	-19,4
3FL5	-6,4	-8,0	-8,4	-11,5
3G0E	-6,1	-7,4	-7,3	-10,4
3HIG	-5,7	-7,4	-7,3	-9,1
3JYA	-6,6	-7,6	-7,8	-8,4
3N8Z	-5,9	-6,5	-5,3	-9,3
3U1I	-5,0	-6,4	-7,0	-9,6
4AGN	-5,0	-5,7	-6,3	-6,5
4EY7	-0,0	-0,0	0,0	-12,7
4IAR	-6,5	-7,8	-8,2	-11,6
PFATP	-6,0	-7,4	-7,0	-8,5
PFHT	-5,3	-6,2	-6,4	-5,4

Com base nos dados apresentados acima, observa-se que a energia de ligação gerada entre o composto e seus alvos foi semelhante ou superior à dos ligantes cristalográficos para os alvos **1DDX**, oxidorreductase (KIEFER et al., 2000); **1GKC**, hidrolase (ROWSELL et al., 2002); **1W22**, hidrolase (VANNINI et al., 2004); **2YOE** proteína transportadora (SPURNY et al., 2012); **2ZOQ**, transferase (KINOSHITA et al., 2008) e **PFHT** transportador de hexose (FONSECA et al., 2016); sendo que, a interação dos três compostos mais ativos com os alvos **1W22** e **2YOE** apresentaram melhores valores de energia de ligação em comparação aos respectivos ligantes cristalográficos destes mesmos alvos. Dentre esses dois alvos, o **1W22** (Histona Desacetilase 8 - HDAC8) já apresenta correlação descrita ao câncer, o que justifica a análise detalhada da interação molecular apresentada a seguir (Figura 16) (CHAKRABARTI et al., 2015).

Figura 16. Representação bidimensional das interações intermoleculares entre a protease 1W22 e o ligante ou composto: (A) ligante cristalográfico; (B) **GSCB76**; (C) **GSCB82**; (D) **GSCB85**.

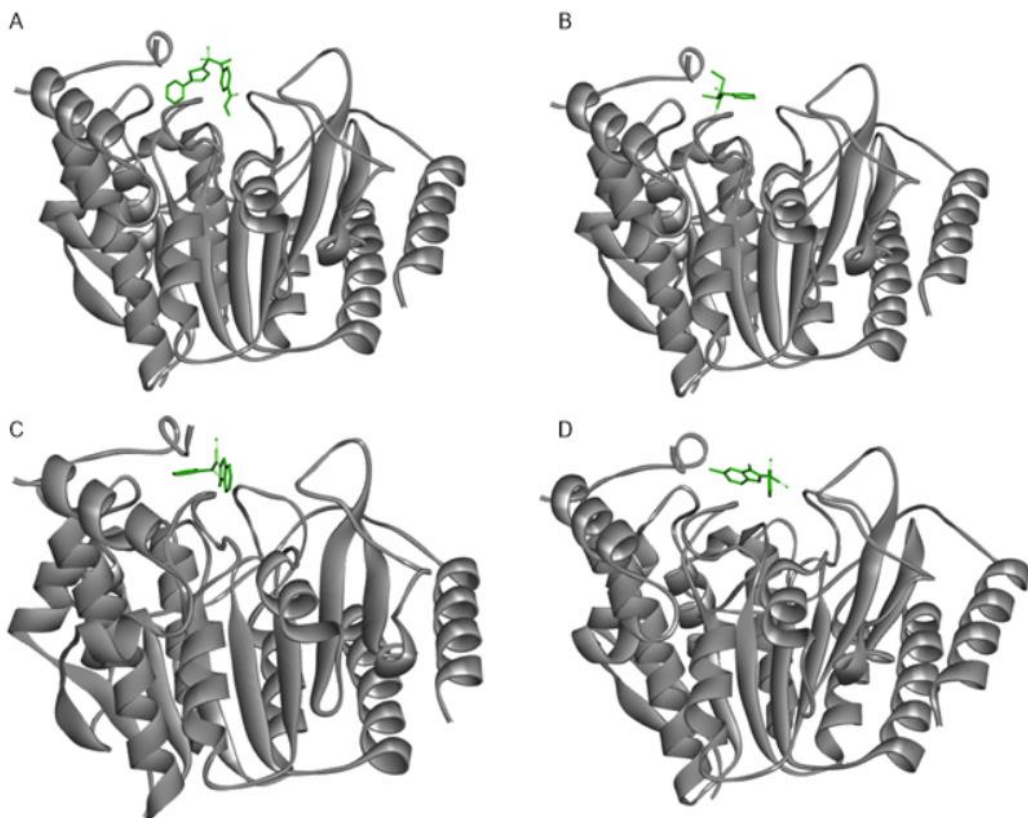


Ao analisar as interações moleculares, observa-se que os compostos aqui testados, interagem com os resíduos do sítio de ligação de forma semelhante ao ligante cristalográfico complexado a proteína **1W22**. Entre as semelhanças, estão

resíduos de Met274, Tyr306, Pro35 e His180 (Figura 16). Além disso, a posição no sítio também se manteve semelhante ao ligante cristalográfico, como evidenciado em visão tridimensional (Figura 17).

O perfil de interação dos ligantes é marcado predominantemente por ligações apolares. O composto **GSCB76** interage com resíduos de Pro273, Met274 e Tyr306 (Figura 16B); O composto **GSCB82** interage com resíduos de His180, Phe152, Pro273 e Tyr306 (Figura 16C); O composto **GSCB85** interage com resíduos de Pro35, Phe152, Met274 e Tyr306 (Figura 16D). Em relação aos demais, o composto **GSCB82** foi o que obteve o melhor valor de energia de ligação, podendo ser explicado pelo seu maior número de ligações com o sítio ativo do ligante, destacando principalmente a ligação dupla do tipo Pi-Doador e do tipo empilhamento T com o resíduo de Tyr306.

Figura 17. Representação tridimensional da interação entre a protease 1W22 (cinza) e o ligante ou composto (verde): (A) ligante cristalográfico; (B) **GSCB76**; (C) **GSCB82**; (D) **GSCB85**.



Esses resultados tornam-se interessantes uma vez que, a HDAC8, é uma enzima pertencente à classe I das histonas desacetilases e pode ser encontrada amplamente no núcleo e no citoplasma das células eucarióticas. Ela se diferencia de outras histonas desacetilases da mesma classe por não possuir um domínio de

ligação a proteínas em sua extremidade C-terminal. Além disso, sua atividade é regulada de forma peculiar pela quinase dependente de AMP cíclico (PKA), o que sugere uma especialização funcional (CHIU et al., 2019; SPREAFICO et al., 2020).

De fato, já é descrito que a HDAC8 é capaz de modificar não apenas as proteínas histonas, mas também proteínas não histonas, como a p53, desempenhando um papel importante na regulação de vários processos celulares, incluindo a relação entre a sobrevivência celular e apoptose, que desempenha um papel crítico na regulação de eventos celulares associados à oncogênese (SPREAFICO et al., 2020). Essa associação da HDAC8 com o câncer é particularmente relevante, uma vez que esta enzima está frequentemente superexpressa ou regulada de maneira anormal em diferentes tipos de câncer, como neuroblastoma, câncer de mama, câncer de cólon e malignidades hematológicas (CHAKRABARTI et al., 2015; SPREAFICO et al., 2020; VON KNETHEN; BRÜNE, 2019).

5 CONCLUSÕES

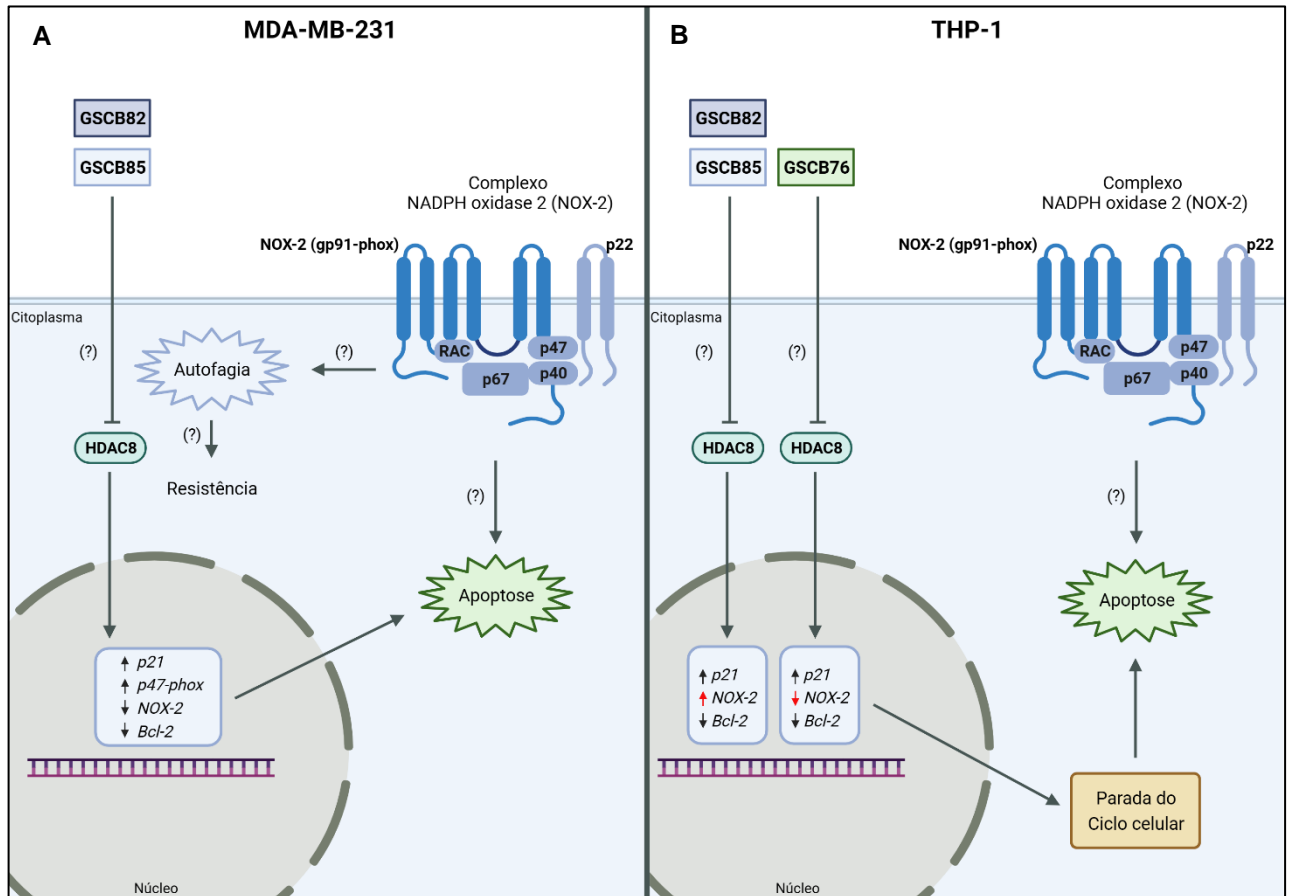
Baseando-se no ensaio de citotoxicidade, destaca-se a atividade de três compostos da série (**GSCB76**, **GCSB82** e **GSCB85**). Esses apresentaram-se como compostos ativos e seletivos para as linhagens tumorais testadas, com menores valores de IC₅₀ e um maior índice de seletividade quando comparado aos medicamentos de referência Cisplatina, Doxorubicina, Imatinibe e Citarabina (controles positivos).

Quanto ao mecanismo de ação (Figura 18), este requer melhor compreensão; entretanto, investigações preliminares sugerem que todos os três compostos em destaque desencadearam, de forma ainda desconhecida, o mecanismo de apoptose e possível senescência celular para a linhagem de leucemia mieloide aguda (THP-1), conforme demonstrado nos ensaios de detecção de apoptose e análise do ciclo celular. Enquanto isso, para a linhagem de câncer de mama (MDA-MB-231), não foram observadas alterações marcantes.

A análise da regulação gênica revelou respostas complexas nas linhagens MDA-MB-231 e THP-1 para os genes *TP53*, *p21*, *Bcl-2*, *NOX-2* e *p47-phox*. Na linhagem MDA-MB-231, os compostos **GSCB82** e **GSCB85** promoveram o aumento da expressão de *p21* e *p47-phox*, sugerindo o envolvimento de possíveis vias de resistência. No entanto, a redução de *Bcl-2* indica uma provável indução à apoptose, embora de forma sutil. Por outro lado, *TP53* e *NOX-2* não apresentaram alterações significativas. Já para a linhagem THP-1, padrões gênicos distintos entre os tratamentos foram observados. A notável elevação de *NOX-2* em resposta a **GSCB82** e **GSCB85** nesta linhagem contrasta com a diminuição observada em **GSCB76**. Esse achado ganha importância ao ser considerado junto à expressão elevada desse gene em pacientes com LMA, o que pode estar associado à resistência à quimioterapia, como já relatado na literatura.

Além disso, esses mesmos compostos apresentaram, por meio do estudo *in silico* uma provável interação com HDAC8, um alvo que já ostenta correlação descrita ao câncer, demonstrada no ensaio de ancoragem molecular; e um alto potencial *drug-like*, sugerindo a possibilidade de desenvolvimento de protótipos que podem ser administrados por via oral. Dessa forma, tais achados reforçam o futuro potencial de uso dessa classe de compostos na busca por novas terapias na área da oncologia.

Figura 18. Potencial mecanismo de ação dos compostos GSCB76, GCSB82 e GSCB85 contra as linhagens tumorais MDA-MB-231 (A) e THP-1 (B), com destaque para a possível indução de senescência celular e apoptose pós-tratamento. **Fonte.** Elaborado pelo autor, 2023.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, T.; DUTTA, A. P21 in cancer: Intricate networks and multiple activities. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 6, p. 400–414, 2009.

ABOULWAFA, O. M.; DAABEES, H. M. G.; EL-SAID, A. H. Benzoxazole-appended piperidine derivatives as novel anticancer candidates against breast cancer. **Bioorganic Chemistry**, v. 134, 1 maio 2023.

ALIKIAN, M. et al. Molecular techniques for the personalised management of patients with chronic myeloid leukaemia. **Biomolecular Detection and Quantification**, v. 11, p. 4–20, 2017.

ALIZADEH, A. M.; SHIRI, S.; FARSINEJAD, S. Metastasis review: from bench to bedside. **Tumor Biol.**, v. 35, p. 8483–8523, 2014.

ALKREATHY, H. M. et al. Enhanced anti-tumor activity of doxorubicin and simvastatin combination loaded nanoemulsion treatment against a Swiss albino mouse model of Ehrlich ascites carcinoma. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, p. 1440–1471, 2019.

ALMEIDA, V. L. DE et al. CÂNCER E AGENTES ANTINEOPLÁSICOS CICLO-CELULAR ESPECÍFICOS E CICLO-CELULAR NÃO ESPECÍFICOS QUE INTERAGEM COM O DNA: UMA INTRODUÇÃO. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.

ALMUWAQQAT, Z. et al. Breast Cancer and Heart Failure. **Heart Failure Clinics**, v. 15, n. 1, p. 65–75, 2019.

AL-OU DAT, B. A. et al. Design, synthesis, and biologic evaluation of novel chrysin derivatives as cytotoxic agents and caspase-3/7 activators. **Drug Design, Development and Therapy**, v. Volume 13, n. January, p. 423–433, 2019.

AMEWU, R. K. et al. Synthetic and naturally occurring heterocyclic anticancer compounds with multiple biological targets. **Molecules**, v. 26, n. 23, 2021.

ARBER, D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2391–2405, 2016.

ARULMURUGAN, S.; KAVITHA, H. P.; VENNILA, J. P. Review on the Synthetic Methods of Biologically Potent Benzoxazole Derivatives. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 769–785, 2020.

BAIG, S. et al. Potential of apoptotic pathway-targeted cancer therapeutic research: Where do we stand? **Cell Death and Disease**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2016.

BENDER, B. J. et al. A practical guide to large-scale docking. **Nature Protocols**, v. 16, n. 10, p. 4799–4832, 24 out. 2021.

BHATNAGAR, I.; KIM, S. K. Marine antitumor drugs: Status, shortfalls and strategies. **Marine Drugs**, v. 8, n. 10, p. 2702–2720, 2010.

BUKOWSKI, K.; KCIUK, M.; KONTEK, R. Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy¹. Bukowski K, Kciuk M, Kontek R. Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Int J Mol Sci*. 2020;21(9). doi:10.3390/ijms21093233. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 9, 2020.

CAREY, L. A. et al. riple Negative Paradox : Primary T umor Chemosensitivity of Breast Cancer Subtypes. v. 13, n. 8, p. 2329–2335, 2007.

CARMICHAEL, J. et al. Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay: Assessment of Chemosensitivity Testing Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay: Assessment. **American Association for Cancer Research**, v. 47, p. 936–942, 1987.

CASTANEDA, S. A.; STRASSER, J. Updates in the Treatment of Breast Cancer with Radiotherapy. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 26, n. 3, p. 371–382, 2017.

CHAKRABARTI, A. et al. HDAC8: A multifaceted target for therapeutic interventions. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n. 7, p. 481–492, 26 jun. 2015.

CHEN, C. et al. Autophagy and Doxorubicin resistance in cancer. **Anti-Cancer Drugs**, v. 29, n. 1, p. 1–9, 2018.

CHEN, J. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic and Progression. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, p. 1–16, 2016.

CHEN, M. et al. A survival analysis comparing women with ovarian low-grade serous carcinoma to those with high-grade histology. **OncoTargets and Therapy**, v. 7, p. 1891–1899, 2014.

CHEN, Q. et al. 2,3-Substituted quinoxalin-6-amine analogs as antiproliferatives: A structure-activity relationship study. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 7, p. 1929–1932, 2011.

CHEN, Y.-J. et al. Novel histone deacetylase inhibitor AR-42 exhibits antitumor activity in pancreatic cancer cells by affecting multiple biochemical pathways. **PLoS one**, v. 12, n. 8, p. e0183368, 2017.

CHIU, C. F. et al. Induction of apoptosis and autophagy in breast cancer cells by a novel hdac8 inhibitor. **Biomolecules**, v. 9, n. 12, 1 dez. 2019.

CHU, S. et al. MiR-93 and PTEN: Key regulators of doxorubicin-resistance and EMT in breast cancer. **Oncology Reports**, v. 38, n. 4, p. 2401–2407, 2017.

CINTRA, J. R. D. et al. Perfil imuno-histoquímico e variáveis clinicopatológicas no câncer de mama. 2012.

CIRQUEIRA, M. B. et al. Subtipos moleculares do câncer de mama. **Femina**, v. 39, 2011.

CRISTOFANI, R. et al. Dual role of autophagy on docetaxel-sensitivity in prostate cancer cells. **Cell Death and Disease**, v. 9, n. 9, 1 set. 2018.

DAINA, A.; MICHELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, n. January, p. 1–13, 2017.

DANTAS, É. L. R. et al. GENÉTICA DO CÂNCER HEREDITÁRIO. v. 55, n. 3, p. 263–269, 2009.

DAVER, N. et al. New directions for emerging therapies in acute myeloid leukemia: the next chapter. **Blood Cancer Journal**, v. 10, n. 10, p. 1–12, 2020.

DAVIS, A. S.; VIERA, A. J.; MEAD, M. D. Leukemia: An overview for primary care. **American Family Physician**, v. 89, n. 9, p. 731–738, 2014.

DEMMER, C. S.; BUNCH, L. Benzoxazoles and oxazolopyridines in medicinal chemistry studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, n. 1, p. 778–785, 2015.

DIER, U. et al. Bioenergetic analysis of ovarian cancer cell lines: Profiling of histological subtypes and identification of a mitochondria-defective cell line. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, 2014.

DOHNER, H.; WEISDORF, D. J.; BLOOMFIELD, C. D. Acute Myeloid Leukemia. **THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE**, v. 373, n. 12, p. 1136–1152, 2015.

DOUBENI, C. A.; DOUBENI, A. R. B.; MYERS, A. E. Diagnosis and management of ovarian cancer. **American Family Physician**, v. 93, n. 11, p. 1–8, 2016.

DOYE, J. P. K.; WALES, D. J. Surveying a potential energy surface by eigenvector-following. Em: **Small Particles and Inorganic Clusters**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1997. v. 197p. 194–197.

DUTRA, J. D. L. et al. Sparkle/PM7 Lanthanide Parameters for the Modeling of Complexes and Materials. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 9, n. 8, p. 3333–3341, 13 ago. 2013.

EGAN, W. J.; MERZ, K. M.; BALDWIN, J. J. Prediction of Drug Absorption Using Multivariate Statistics. p. 3867–3877, 2000.

EL-HELBY, A. G. A. et al. Design, synthesis, molecular docking, and anticancer activity of benzoxazole derivatives as VEGFR-2 inhibitors. **Archiv der Pharmazie**, v. 352, n. 10, p. 1–19, 2019.

ELMORE, S. Apoptosis: A Reveiw of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 496–516, 2007.

ELOKELY, K. M.; DOERKSEN, R. J. Docking Challenge: Protein Sampling and Molecular Docking Performance. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 8, p. 1934–1945, 26 ago. 2013.

ENGELAND, K. **Cell cycle arrest through indirect transcriptional repression by p53: I have a DREAM.** *Cell Death and Differentiation* Nature Publishing Group, , 2018.

EVANS, B. E. et al. Methods for Drug Discovery: Development of Potent, Selective, Orally Effective Cholecystinin Antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 31, n. 12, p. 2235–2246, 1988.

FERLAY, J. et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*, v. 149, n. 4, p. 778–789, 15 ago. 2021.

FERREIRA, P. A. R. et al. Carcinoma de ovário seroso e não seroso: tipo histológico em relação ao grau de diferenciação e prognóstico. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 34, n. 5, p. 196–202, 2012.

FONSECA, A. L. DA et al. Docking, QM/MM, and molecular dynamics simulations of the hexose transporter from Plasmodium falciparum (PfHT). *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, v. 66, p. 174–186, 1 maio 2016.

FRIDMAN, J. S.; LOWE, S. W. Control of apoptosis by p53. *Oncogene*, v. 22, n. 56, p. 9030–9040, 2003.

GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation*, v. 25, n. 3, p. 486–541, 1 mar. 2018.

GASTEIGER, J.; MARSILI, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity—a rapid access to atomic charges. *Tetrahedron*, v. 36, n. 22, p. 3219–3228, jan. 1980.

GHOSE, A. K.; VISWANADHAN, V. N.; WENDOLOSKI, J. J. A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery . 1 . A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases. **J. Comb. Chem.**, v. 1, p. 55–68, 1999.

GILLILAND, D. G.; JORDAN, C. T.; FELIX, C. A. The Molecular Basis of Leukemia. **American Society of Hematology**, v. 2004, n. 1, p. 80–97, 2004.

GIORDANO, A. et al. Identification of the 2 -Benzoxazol-2-yl-phenol Scaffold as New Hit for JMJD3 Inhibition. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, p. 601–605, 2019.

GLAMOČLIJA, U. et al. Synthesis, biological evaluation and docking studies of benzoxazoles derived from thymoquinone. **Molecules**, v. 23, n. 12, p. 1–17, 2018.

GOLDHIRSCH, A. et al. Strategies for subtypes — dealing with the diversity of breast cancer : highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. n. June, p. 1736–1747, 2011.

GOMTSYAN, A. Heterocycles in Drugs and Drug Discovery. **Chemistry of Heterocyclic Compounds**, v. 48, n. 1, 2012.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Drug design, biotechnology and medicinal chemistry: applications to infectious diseases. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 81–98, 2010.

HARRINGTON, P.; KIZILORS, A.; DE LAVALLADE, H. The Role of Early Molecular Response in the Management of Chronic Phase CML. **Current Hematologic Malignancy Reports**, v. 12, n. 2, p. 79–84, 2017.

HERAVI, M. M.; ZADSIRJAN, V. Prescribed drugs containing nitrogen heterocycles: an overview. **RSC Advances**, v. 10, n. 72, p. 44247–44311, 2020.

HOGG, S. J. et al. A method to investigate the anti-metabolic activity of anti-cancer agents on ovarian cancer cells cultured in a 96-well high throughput format. **Journal of Ovarian Research**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2015.

HÖGLUND, M.; SANDIN, F.; SIMONSSON, B. Epidemiology of chronic myeloid leukaemia: an update. **Annals of Hematology**, v. 94, n. 2, p. 241–247, 1 abr. 2015.

HOLOHAN, C. et al. Cancer drug resistance: An evolving paradigm. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 10, p. 714–726, 2013.

HØYER-HANSEN, M. et al. Control of Macroautophagy by Calcium, Calmodulin-Dependent Kinase Kinase- β , and Bcl-2. **Molecular Cell**, v. 25, n. 2, p. 193–205, 26 jan. 2007.

INCA. **Estimativa 2020: Incidência de câncer no Brasil**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/estimativa>>. Acesso em: 14 jul. 2021.

INCA. **Estimativa 2023: Incidência de Câncer no Brasil**. [s.l.: s.n.].

IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology (the “Gold Book”)**. Research Triangle Park, NC: International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), 2014.

JAFFE, E. S.; BARR, P. M.; SMITH, S. M. Understanding the New WHO Classification of Lymphoid Malignancies: Why It’s Important and How It Will Affect Practice. **American Society of Clinical Oncology Educational Book**, v. 37, p. 535–546, 2017.

KARIMIAN, A.; AHMADI, Y.; YOUSEFI, B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. **DNA Repair**, v. 42, p. 63–71, 1 jun. 2016.

KIEFER, J. R. et al. Structural insights into the stereochemistry of the cyclooxygenase reaction. **Nature**, v. 405, p. 97–101, 2000.

KIM, T. W. et al. Opa-interacting protein 5 modulates docetaxel-induced cell death via regulation of mitophagy in gastric cancer. **Tumor Biology**, v. 39, n. 10, p. 1–13, 1 out. 2017.

KINOSHITA, T. et al. Crystal structure of human mono-phosphorylated ERK1 at Tyr204. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 377, n. 4, p. 1123–1127, 26 dez. 2008.

KMA, L.; BARUAH, T. J. **The interplay of ROS and the PI3K/Akt pathway in autophagy regulation. Biotechnology and Applied Biochemistry** John Wiley and Sons Inc, , 1 fev. 2022.

KONTOMANOLIS, E. N. et al. Role of oncogenes and tumor-suppressor genes in carcinogenesis: A review. **Anticancer Research**, v. 40, n. 11, p. 6009–6015, 1 nov. 2020.

KOOPMAN, B. G. et al. Annexin V for Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on B Cells Undergoing Apoptosis. v. 3, n. c, p. 11–12, 1994.

KUMARI, R.; JAT, P. Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, 29 mar. 2021.

KUZU, B. et al. Design, synthesis and in vitro antiproliferation activity of some 2-aryl and -heteroaryl benzoxazole derivatives. **Future Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 14, p. 1027–1048, jul. 2022.

LANDRY, W. D.; COTTER, T. G. **ROS signalling, NADPH oxidases and cancer.** Biochemical Society Transactions. **Anais...**Portland Press Ltd, 2014.

LAVIEU, G. et al. Regulation of autophagy by sphingosine kinase 1 and its role in cell survival during nutrient starvation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 13, p. 8518–8527, 31 mar. 2006.

LEAL-ESTEBAN, L. C.; FAJAS, L. Cell cycle regulators in cancer cell metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 5, 1 maio 2020.

LEE, Y. J. et al. Involvement of a p53-independent and post-transcriptional up-regulation for p21WAF/CIP1 following destabilization of the actin cytoskeleton. **International Journal of Oncology**, v. 34, n. 2, p. 581–589, 2009.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. v. 46, p. 3–26, 2001.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LONGLEY, D. B.; JOHNSTON, P. G. Molecular mechanism of drug resistance. **Journal of Pathology**, v. 205, p. 275–292, 2005.

MAIA, E. H. B. et al. Octopus: a platform for the virtual high-throughput screening of a pool of compounds against a set of molecular targets. **Journal of Molecular Modeling**, v. 23, n. 1, 1 jan. 2017.

MARTINS, P. et al. Heterocyclic anticancer compounds: Recent advances and the paradigm shift towards the use of nanomedicine's tool Box. **Molecules**, v. 20, n. 9, p. 16852–16891, 2015.

MOLLAZADEH, H.; AFSHARI, A. R.; HOSSEINZADEH, H. Review on the potential therapeutic roles of *Nigella sativa* in the treatment of patients with cancer: Involvement of apoptosis: - Black cumin and cancer -. **Journal of Pharmacopuncture**, v. 20, n. 3, p. 158–172, 2017.

MOMENIMOVAHED, Z.; SALEHINIYA, H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, v. 11, p. 151–164, 2019.

MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, dez. 2009.

MUEGGE, I.; HEALD, S. L.; BRITTELLI, D. Simple Selection Criteria for Drug-like Chemical Matter. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 12, p. 1–6, 2001.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Ovarian Epithelial, Fallopian Tube, and Primary Peritoneal Cancer Treatment (PDQ®). **PDQ Cancer Information Summaries**, 2021.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NIH). **SEER Cancer Statistics Review: 1975-2018, overview, median age at diagnosis**. Disponível em: <https://seer.cancer.gov/csr/1975_2018/>. Acesso em: 4 jan. 2022.

NAVIA, M. A.; CHATURVERDI, P. R. Design principles for orally bioavailable drugs. **Research focus**, v. 1, n. 5, p. 179–189, 1996.

NICE. Advanced breast cancer: diagnosis and treatment. **National Institute for Health and Care Excellence**, p. 1–18, 2017.

NOCELLA, C. et al. Structure, Activation, and Regulation of NOX2: At the Crossroad between the Innate Immunity and Oxidative Stress-Mediated Pathologies. **Antioxidants**, v. 12, n. 2, 1 fev. 2023.

O'BRIEN, P. et al. The clinical utility of baseline cardiac assessments prior to adjuvant anthracycline chemotherapy in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 0, n. 0, p. 0, 2019.

OMS. **Prevenção e Controle do Câncer**. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 14 set. 2018.

OTTO, T.; SICINSKI, P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 2, p. 93–115, 2017.

PAPA, A. et al. Triple-negative breast cancer: investigating potential molecular therapeutic target. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 19, n. 1, p. 55–75, 2015.

PARK, H. Y. et al. Induction of p53-independent apoptosis and G1 cell cycle arrest by fucoidan in HCT116 human colorectal carcinoma cells. **Marine Drugs**, v. 15, n. 6, 1 jun. 2017.

PEART, O. Breast intervention and breast cancer treatment options. **Radiologic technology**, v. 86, n. 5, p. 535M-558M; quiz 559–62, 2015.

PECCHILLO CIMMINO, T. et al. NOX Dependent ROS Generation and Cell Metabolism. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, 1 fev. 2023.

PELCOVITS, A.; NIROULA, R. Acute Myeloid Leukemia: A Review. **Rhode Island medical journal (2013)**, v. 103, n. 3, p. 38–40, 2020.

PHILOPPES, J. N.; LAMIE, P. F. Design and synthesis of new benzoxazole/benzothiazole-phthalimide hybrids as antitumor-apoptotic agents. **Bioorganic Chemistry**, v. 89, n. May, p. 102978, 2019.

PIETKIEWICZ, S.; SCHMIDT, J. H.; LAVRIK, I. N. Quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination of Imaging Flow Cytometry with classical Annexin V/propidium iodide staining. **Journal of Immunological Methods**, v. 423, p. 99–103, 2015.

PISTRITTO, G. et al. Apoptosis as anticancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. **Aging**, v. 8, n. 4, p. 603–619, 2016.

POON, I. K. H.; HULETT, M. D.; PARISH, C. R. **Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance**. **Cell Death and Differentiation**, mar. 2010.

POPOLIN, C. P. et al. Cytotoxicity and anti-tumor effects of new ruthenium complexes on triple negative breast cancer cells. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. 1–21, 2017.

PROTTI, Í. F. et al. Do Drug-likeness Rules Apply to Oral Prodrugs? **ChemMedChem**, v. 16, n. 9, p. 1446–1456, 2021.

QUINTANILLA-MARTINEZ, L. The 2016 updated WHO classification of lymphoid neoplasias. **Hematological Oncology**, v. 35, n. S1, p. 37–45, 2017.

RADICH, J. P. et al. Chronic myeloid leukemia, version 1.2019. **JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 16, n. 9, p. 1108–1135, 2018.

RAMACHANDRAN, K. C. et al. Isodicentric Philadelphia Chromosome: A Rare Chromosomal Aberration in Imatinib-Resistant Chronic Myelogenous Leukemia

Patients-Case Report with Review of the Literature. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 150, n. 3–4, p. 273–280, 1 mar. 2017.

REDZA-DUTORDOIR, M.; AVERILL-BATES, D. A. **Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research** Elsevier B.V., , 1 dez. 2016.

ROBINSON, A. J. et al. Reactive Oxygen Species Rewires Metabolic Activity in Acute Myeloid Leukemia. **Frontiers in Oncology**, v. 11, 11 mar. 2021.

ROWSELL, S. et al. Crystal structure of human MMP9 in complex with a reverse hydroxamate inhibitor. **Journal of Molecular Biology**, v. 319, n. 1, p. 173–181, 2002.

ROY, K. et al. **NADPH oxidases and cancer. Clinical Science** Portland Press Ltd, , 2015.

SAPIEHA, P.; MALLETTTE, F. A. Cellular Senescence in Postmitotic Cells: Beyond Growth Arrest. **Trends in Cell Biology**, v. 28, n. 8, p. 595–607, 1 ago. 2018.

SCHAFFER, K. A. The Cell Cycle: A Review. **Vet Pathol**, v. 35, n. 6, p. 461–478, 1998.

SCHERZ-SHOVAL, R. et al. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. **EMBO Journal**, v. 26, n. 7, p. 1749–1760, 4 abr. 2007.

SHI, C.; ZHANG, Z. The prognostic value of the miR-200 family in ovarian cancer: A meta-analysis. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v. 95, n. 5, p. 505–512, 2016.

SIEGEL, R. L. et al. Cancer Statistics, 2021. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 1, p. 7–33, 2021.

SKONIECZNA, M. et al. **NADPH Oxidases (NOX): Insights into Selected Functions and Mechanisms of Action in Cancer and Stem Cells. Oxidative Medicine and Cellular Longevity** Hindawi Limited, , 2017.

SMOLLE, E. et al. Targeting signaling pathways in epithelial ovarian cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 5, p. 9536–9555, 2013.

SPREAFICO, M. et al. HDAC8: A Promising Therapeutic Target for Acute Myeloid Leukemia. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, 4 set. 2020.

SPURNY, R. et al. Pentameric ligand-gated ion channel ELIC is activated by GABA and modulated by benzodiazepines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 44, 30 out. 2012.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. **Journal of Molecular Modeling**, v. 19, n. 1, p. 1–32, 28 jan. 2013.

STRASSER, A. et al. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? **Cell Death and Differentiation**, v. 25, n. 1, p. 104–113, 2017.

SUFFNESS, M. et al. A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. **Phytochemical Analysis**, v. 2, n. 3, p. 107–111, 1991.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, maio 2021.

SUROVA, O.; ZHIVOTOVSKY, B. Various modes of cell death induced by DNA damage. **Oncogene**, v. 32, n. 33, p. 3789–3797, 15 ago. 2013.

TALLMAN, M. S. et al. Acute myeloid leukemia, version 3.2019. **JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 17, n. 6, p. 721–749, 2019.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, p. NA-NA, 2009.

VANNINI, A. et al. Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor. **PNAS**, v. 101, p. 15064–15069, 2004.

VARA-PEREZ, M.; FELIPE-ABRIO, B.; AGOSTINIS, P. Mitophagy in cancer: A tale of adaptation. **Cells**, v. 8, n. 5, 1 maio 2019.

VEBER, D. F. et al. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 2615–2623, 2002.

VICENCIO, J. M.; LAVANDERO, S.; SZABADKAI, G. Ca²⁺, autophagy and protein degradation: Thrown off balance in neurodegenerative disease. **Cell Calcium**, v. 47, n. 2, p. 112–121, 2010.

VIDAL, S. J. et al. Targeting cancer stem cells to suppress acquired chemotherapy resistance. **Oncogene**, v. 33, n. 36, p. 4451–4463, 2014.

VIDEIRA, R. S. et al. Oncogenes e desenvolvimento do cancer. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, v. 6, n. 1, p. 71–76, 2002.

VILLA, E. et al. Parkin-Independent Mitophagy Controls Chemotherapeutic Response in Cancer Cells. **Cell Reports**, v. 20, n. 12, p. 2846–2859, 19 set. 2017.

VON KNETHEN, A.; BRÜNE, B. Histone Deacetylation Inhibitors as Therapy Concept in Sepsis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 2, p. 346, 2019.

WANG, Y. et al. TP53 mutations are associated with higher rates of pathologic complete response to anthracycline/cyclophosphamide-based neoadjuvant chemotherapy in operable primary breast cancer. **International Journal of Cancer**, v. 138, n. 2, p. 489–496, 2016.

WONG, X. K.; YEONG, K. Y. A Patent Review on the Current Developments of Benzoxazoles in Drug Discovery. **ChemMedChem**, p. 2–25, 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Cancer**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em: 18 jul. 2021.

YAN, C. et al. Doxorubicin-induced mitophagy contributes to drug resistance in cancer stem cells from HCT8 human colorectal cancer cells. **Cancer Letters**, v. 388, p. 34–42, 1 mar. 2017.

YAO, N. et al. Inhibition of PINK1/Parkin-dependent mitophagy sensitizes multidrug-resistant cancer cells to B5G1, a new betulinic acid analog. **Cell Death and Disease**, v. 10, n. 3, 1 mar. 2019.

ZHANG, P.; CHEN, J.; LIANG, Y. DNA binding, cytotoxicity, and apoptotic-inducing activity of ruthenium(II) polypyridyl complex. **Acta Biochim Biophys Sin**, v. 42, n. June, p. 440–449, 2010.

ZHONG, W. et al. Benzoxazole derivative K313 induces cell cycle arrest, apoptosis and autophagy blockage and suppresses mTOR/p70S6K pathway in Nalm-6 and Daudi cells. **Molecules**, v. 25, n. 4, 21 fev. 2020.

ZILIFDAR, F. et al. Biological evaluation and pharmacophore modeling of some benzoxazoles and their possible metabolites. **Archiv der Pharmazie**, v. 351, n. 2, p. 1–10, 2018.

ANEXOS

ANEXO 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: “Análise celular, molecular e plasmática de biomarcadores de diagnóstico, prognóstico e avaliação in vitro de potencial terapêutico de biomoléculas sintéticas em amostras de pacientes com neoplasias mieloides, linfoides e mielodisplasia”

SUBPROJETO: Avaliação in vitro de potencial terapêutico de biomoléculas sintéticas em amostras humanas e linhagens celulares

Prezado(a),

O Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais está realizando um estudo para o tratamento de cânceres. Caso esteja disposto(a) a participar desse estudo como indivíduo controle, solicitamos que autorize a coleta de apenas 10 mL de seu sangue para realizarmos exames laboratoriais que incluirão dosagens de proteínas, exames genéticos e testes com biomoléculas, importantes parâmetros para o diagnóstico, avaliação de prognóstico e descoberta de novas drogas para tratamento destas doenças. A coleta da amostra de sangue venoso pode, às vezes, resultar na formação de um pequeno hematoma (roxo) e leve dor localizada. Entretanto, a coleta será feita por profissional capacitado e com grande experiência. Será utilizado material descartável de qualidade (agulhas e tubos a vácuo), visando o êxito da coleta. Toda informação obtida nessa pesquisa é considerada confidencial. Sua participação será totalmente voluntária e caso não queira participar não haverá nenhum prejuízo. A coleta não implica qualquer tipo de despesa e o indivíduo não receberá remuneração por sua participação. O participante e o pesquisador assinarão duas vias iguais, ficando uma via com o participante e a outra com o pesquisador.

Qualquer outra informação que desejar poderá ser obtida com o Professor Adriano de Paula Sabino da Faculdade de Farmácia/UFMG, por meio do telefone 3409-6882. Informações sobre os aspectos éticos da pesquisa poderão ser obtidas com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG/COEP, pelo telefone 3409-4592, localizado à Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, Campus Pampulha, Belo Horizonte - MG. Desde já agradecemos sua colaboração.

Prof. Adriano de Paula Sabino (Coordenador do projeto, Professor de Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFMG).

Nome: _____

Documento de identificação: _____

Assinatura: _____ **Data:** ____/____/____

ANEXO 2 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Análise Celular, Molecular e Plasmática de Biomarcadores de Diagnóstico, Prognóstico e Avaliação in vitro de Potencial Terapêutico de Biomoléculas em Amostras de Pacientes com Neoplasias Mielóides, Linfóides e Mielodisplasia/Não Hematológicas

Pesquisador: Adriano de Paula Sabino

Área Temática:

Versão: 9

CAAE: 02177612.0.0000.5149

Instituição Proponente: PRO REITORIA DE PESQUISA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E
TECNOLOGICO-CNPQ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.072.805

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma Emenda ao projeto: "Análise Celular, Molecular e Plasmática de Biomarcadores de Diagnóstico, Prognóstico e Avaliação in vitro de Potencial Terapêutico de Biomoléculas em Amostras de Pacientes com Neoplasias Mielóides, Linfóides e Mielodisplasia/Não Hematológicas" já aprovado por este Comitê.

Justificativa da Emenda: "Atualmente pelas características das análises em andamento, não está havendo necessidade de recrutamento de voluntários, coleta de materiais biológicos e nem intervenção por parte da pesquisa em quaisquer condutas na internação e assistência dos pacientes assistidos no HC-UFMG. As análises laboratoriais do presente trabalho estão sendo conduzidas em amostras sanguíneas já colhidas e processadas na rotina assistencial dos pacientes do HC-UFMG, cujos resultados já foram liberados aos médicos solicitantes. Tais amostras são selecionadas pelos pesquisadores no momento do descarte, que ocorre uma vez por semana no setor de hematologia/bioquímica. As pesquisas de novos biomarcadores nessas amostras que seriam descartadas não terão impactos às condutas clínicas dos respectivos pacientes, pois trata-se de pesquisa básica visando a descoberta de potenciais novos biomarcadores e alvos terapêuticos nestas amostras descartadas. Os dados serão avaliados no coletivo, sem qualquer

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º Andar Sala 2005 Campus Pampulha

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 5.072.805

identificação dos pacientes assistidos no serviço. O projeto se configura em um projeto amplo, eixo principal da linha de pesquisa do pesquisador responsável: Oncologia. Vale ressaltar que se para objetivos futuros houver necessidade de coleta do TCLE, este será coletado de acordo com as normas vigentes. Diante do exposto acima, do uso de amostras de descarte, solicito dispensa do TCLE. Desde já agradeço a atenção e aguardo retorno. Conforme carta resposta em anexo, as sugestões foram acatadas e o TCLE será obtido dos pacientes."

Sobre o estudo: O câncer pode ser definido como uma doença na qual as células anormais se dividem sem controle e são capazes de invadir outros tecidos. As células cancerosas podem se espalhar para outras partes do corpo por meio dos sistemas sanguíneos e linfáticos. Várias alterações genéticas podem ser necessárias para a transformação de um célula saudável para um câncer. Portanto, a avaliação de alterações cromossômicas é utilizada para estabelecer o risco de câncer e triagem da doença. A proliferação de células normais é regulada por oncogenes promotores do crescimento contrabalançados por inibidores do crescimento e genes supressores de tumores. O desenvolvimento do câncer pode envolver a ativação ou expressão alterada de oncogenes e/ou perda ou inativação de um gene supressor de tumor. A detecção precoce do câncer oferece a melhor chance de cura quando o tumor é pequeno o suficiente para ser completamente removido cirurgicamente, mas a maioria dos tumores não produzem sintomas até serem demasiadamente grandes ou até que as células cancerosas tenham se espalhado para outros tecidos, processo conhecido como metástase. A maioria dos oncogenes produz proteínas que funcionam em alguma fase da ativação de células para a proliferação e a sua ativação leva à divisão celular. Muitos oncogenes estão associados a malignidades hematológicas. Alguns oncogenes importantes são RAS, HER2 e BCR/ABL. A oncogenicidade dos genes supressores de tumores é derivada de perda do gene em vez de sua ativação. BRCA1 e BRCA2 são exemplos de genes supressores de tumores. As leucemias são neoplasias que surgem a partir do tecido hematopoiético. São proliferações clonais, originadas de células que sofreram mutações na sequência de bases do DNA, ou rearranjos cromossômicos com expressão inadequada de oncogenes e/ou inibição de mecanismos de controle proliferativo. Embora as causas para o desenvolvimento de leucemia ainda não sejam bem conhecidas, existem evidências para alguns fatores de risco, como a predisposição genética, a exposição à radiação ionizante, medicamentos utilizados em quimioterapia e exposição ocupacional ao benzeno. Os principais sintomas da leucemia decorrem do acúmulo das células hematopoiéticas na medula óssea, prejudicando ou impedindo a produção dos glóbulos vermelhos (causando anemia), dos glóbulos brancos (causando infecções) e das plaquetas (causando hemorragias). Depois de instalada, dependendo

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º Andar 2 Sala 2005 2 Campus Pampulha
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 5.072.805

do subtipo, a doença progride rapidamente, exigindo com isso que o tratamento seja iniciado logo após o diagnóstico e a classificação da leucemia. Segundo o Instituto de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), no Brasil, no ano de 2014, estimou-se um risco de 5,20 casos novos de leucemia para cada 100 mil homens e 4,24 para cada 100 mil mulheres [2]. As incidências desses casos diagnosticados e estimados demonstraram a necessidade de uma boa articulação da clínica médica com a pesquisa laboratorial e os procedimentos terapêuticos corretos. Além de evitar a oneração do Sistema de Saúde, uma conduta bem fundamentada aumentaria a sobrevivência dos pacientes acometidos. A classificação correta do tipo e subtipo de leucemia/tumor sólido é imprescindível para o melhor tratamento de cada caso. No entanto, além das características imunofenotípicas que já estão estabelecidas para orientação na clínica médica, muitas outras mutações e fatores prognósticos distintos têm sido correlacionados e têm sido investigados.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Investigar do ponto de vista celular, molecular e plasmática, biomarcadores de diagnóstico, prognóstico e avaliação in vitro de potencial terapêutico de biomoléculas sintéticas em amostras de pacientes com neoplasias mieloides, linfoides e mielodisplasia/tumores sólidos.

Objetivo Secundário:

Análise Celular e Molecular - Avaliação de ciclo celular - Avaliação da apoptose - Avaliação de vias de sinalização molecular (genes, mRNA, MirRNAs) - Análise de perfil de proteínas - Análise de perfil metabólico Biomarcadores plasmáticos - Busca por novos biomarcadores plasmáticos de diagnóstico e prognóstico nas leucemias linfóides, mielóides e mielodisplasia/Tumores sólidos;

- Quantificar micropartículas circulantes de diferentes origens celulares;
- Avaliar a capacidade de cada tipo de micropartícula em carrear um determinado cluster de miRNAs selecionado, servindo como ponte entre a célula de origem e o alvo;
- Testes in vitro- Conduzir teste in vitro de atividade antitumoral com moléculas sintéticas em amostra de pacientes e linhagens de leucemias linfóides, mielóides e mielodisplasia/tumores sólidos;
- Correlacionar os parâmetros avaliados com os dados clínico-laboratoriais dos pacientes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com os autores:

Na Plataforma Brasil:

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º Andar 2 Sala 2005 2 Campus Pampulha
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 5.072.805

Riscos:

A coleta de amostras de sangue venoso inclui um pequeno risco de acidente de punção, representado, principalmente por extravasamento sanguíneo subcutâneo sem gravidade, que pode resultar em leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Para minimizar o risco de formação de hematomas, a coleta de sangue será realizada por um profissional farmacêutico, com experiência e capacidade técnica e em local com infra-estrutura adequada. Em caso de punção de medula, este procedimento será realizado pelo seu médico hematologista ou patologista.

Benefícios:

Espera-se obter resultados que possibilitem fornecer explicações sobre as complexas alterações genéticas em portadores de neoplasias hematológicas/não hematológicas LLC, além de identificar possíveis marcadores de diagnóstico, prognóstico e tratamento. Acredita-se que os resultados ajudarão a esclarecer a relação dos eventos regulatórios e o desenvolvimento das alterações neoplásicas hematológicas/não hematológicas, bem como poderão contribuir para o desenvolvimento de uma alternativa terapêutica, para o tratamento das mesmas.

No TCLE:

Benefícios:

Você não será remunerado por sua participação e esta pesquisa poderá não oferecer benefícios diretos a você. Se você concordar com o uso de suas informações e/ou do material do modo descrito acima, é necessário esclarecer que você não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre eventuais resultados decorrentes desta pesquisa. O benefício principal da sua participação é possibilitar que no futuro, com os resultados alcançados com esta pesquisa, o diagnóstico e o tratamento para esse tipo de câncer beneficiem outros pacientes.

Riscos:

Não existem riscos físicos adicionais a você pela sua participação nesta pesquisa. Os materiais utilizados nessa pesquisa serão somente aqueles considerados excedentes dos coletados para exames laboratoriais de rotina para o seu diagnóstico. Os riscos físicos e inconvenientes não serão diferentes daqueles previstos durante os procedimentos normais para a obtenção de amostras biológicas para o diagnóstico da sua doença. O seu médico irá informá-la em detalhes sobre os

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º Andar Sala 2005 4 Campus Pampulha
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 5.072.805

riscos associados aos procedimentos adicionais de biópsia e da coleta de sangue, uma vez que o nível do risco dependerá de onde o(s) tumor(es) está(ão) localizado(s) no seu corpo. De maneira geral, fazer uma biópsia causa dor, inchaço, sangramento e/ou infecção no local onde a agulha da biópsia penetra na sua pele; se seu médico decidir usar anestesia, pode ocorrer reação alérgica. Os prováveis riscos e efeitos adversos (efeitos danosos) de se realizar uma biópsia incluem: sangramento e dor no local onde a agulha foi inserida, um inchaço debaixo da pele que contém sangue (hematoma), sonolência, se você optar por receber um analgésico e/ou medicamento que faça você relaxar. De maneira menos provável, porém de riscos sérios, os efeitos colaterais em se submeter a uma biópsia incluem: infecção, falta de ar, baixa frequência cardíaca e baixa pressão arterial, se você optar por receber um analgésico e/ou medicamento que faça você relaxar. Os riscos da coleta de sangue podem incluir desmaio, dor e/ou hematoma (mancha roxa na pele). Raramente pode haver um pequeno coágulo sanguíneo ou infecção no local da picada da agulha.

Como os procedimentos de biópsia, coleta de sangue, punção na medula são realizados para fins de tratamento (e não da pesquisa), os riscos e benefícios desses procedimentos não devem ser considerados como riscos da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante para a Oncologia. Término previsto para 01/08/2024. Os pesquisadores esclarecem que "Não há previsão de interrupção da pesquisa, salvo alguma situação especial que não é possível prever no momento. - Não haverá custos para a instituição envolvida na pesquisa. O estudo será custeado por instituições de fomento à pesquisa."

Trata-se de uma emenda com a seguinte justificativa: "Atualmente pelas características das análises em andamento, não está havendo necessidade de recrutamento de voluntários, recoleta de materiais biológicos e nem intervenção por parte da pesquisa em quaisquer condutas na internação e assistência dos pacientes assistidos no HC-UFMG. As análises laboratoriais do presente trabalho estão sendo conduzidas em amostras sanguíneas já colhidas e processadas na rotina assistencial dos pacientes do HC-UFMG, cujos resultados já foram liberados aos médicos solicitantes. Tais amostras são selecionadas pelos pesquisadores no momento do descarte, que ocorre uma vez por semana no setor de hematologia/bioquímica. As pesquisas de novos biomarcadores nessas amostras que seriam descartadas não terão impactos às condutas clínicas dos respectivos pacientes, pois trata-se de pesquisa básica visando a descoberta de potenciais novos biomarcadores e alvos terapêuticos nestas amostras descartadas. Os dados serão avaliados no coletivo, sem qualquer identificação dos pacientes assistidos no serviço. O projeto se configura

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º Andar 2 Sala 2005 2 Campus Pampulha
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 5.072.805

em um projeto amplo, eixo principal da linha de pesquisa do pesquisador responsável: Oncologia. Vale ressaltar que se para objetivos futuros houver necessidade de coleta do TCLE, este será coletado de acordo com as normas vigentes. Diante do exposto acima, do uso de amostras de descarte, solicito dispensa do TCLE. Desde já agradeço a atenção e aguardo retorno. Conforme carta resposta em anexo, as sugestões foram acatadas e o TCLE será obtido dos pacientes."

Os autores esclareceram que a coleta de sangue venoso e de sangue de medula, são realizadas rotineiramente, como parte da rotina assistencial aos pacientes pela Clínica Médica e parte deste material coletado será utilizados na pesquisa. Os riscos da pesquisa foram reformulados no TCLE, porém, ainda fazem referência aos procedimentos de biópsia e coleta de sangue, que não são procedimentos da pesquisa.

Foi adequadamente anexado Termo de constituição de biorrepositório.

Em relação à solicitação de dispensa de TCLE: o material a ser utilizado na pesquisa trata-se de amostra biológica dos participantes, que têm o direito de saberem que parte de seu material (como amostras de sangue) estão sendo utilizados para fins de pesquisa também. Assim, deverá ser solicitada autorização aos participantes para o uso de suas amostras biológicas para fins de pesquisa. Os autores concordaram com este posicionamento e nas Informações Básicas da Pesquisa anexadas na Plataforma Brasil não solicitaram a dispensa.

Em relação ao TCLE:

- caso haja participante menor, deve ser incluído um TALE e um TCLE para o responsável;
- numerar as páginas e inserir campo para rubrica do participante e do pesquisador responsável nas páginas que não contém assinatura;
- em relação aos benefícios da pesquisa, relatar que não existem benefícios DIRETOS aos participantes, e que os benefícios indiretos são os descritos em adquirir conhecimentos para futuros diagnósticos e intervenções;
- em relação aos riscos, sugiro remover a seguinte sentença, já que não se refere a riscos da pesquisa: "De maneira geral, fazer uma biópsia causa dor, inchaço, sangramento e/ou infecção no local onde a agulha da biópsia penetra na sua pele; se seu médico decidir usar anestesia, pode ocorrer reação alérgica. Os prováveis riscos e efeitos adversos (efeitos danosos) de se realizar uma biópsia incluem: sangramento e dor no local onde a agulha foi inserida, um inchaço debaixo da pele que contém sangue (hematoma), sonolência, se você optar por receber um analgésico e/ou medicamento que faça você relaxar. De maneira menos provável, porém de riscos sérios, os efeitos colaterais em se submeter a uma biópsia incluem: infecção, falta de ar, baixa frequência cardíaca e baixa pressão arterial, se você optar por receber um analgésico e/ou medicamento que

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º Andar 2 Sala 2005 2 Campus Pampulha
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 5.072.805

faça você relaxar. Os riscos da coleta de sangue podem incluir desmaio, dor e/ou hematoma (mancha roxa na pele). Raramente pode haver um pequeno coágulo sanguíneo ou infecção no local da picada da agulha." Para a pesquisa, considerar o risco de identificação dos participantes, e o que será feito para minimizar esse risco (anonimização);

- informar que caso algum risco relacionado à pesquisa se manifeste, o participante terá direito à indenização e/ou atendimento especializado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Além dos documentos já anexados para o projeto original e as emendas anteriores, para esta Emenda foram anexados ainda os seguintes documentos:

- Informações Básicas do Projeto atualizadas na Plataforma Brasil;
- Carta-resposta ao parecer 4.888.698;
- TCLE;
- TCLE alterado;
- Termo de constituição de biorrepositório;
- Carta-resposta às pendências documentais.

Recomendações:

Recomenda-se:

Em relação ao TCLE:

- caso haja participante menor, deve ser incluído um TALE e um TCLE para o responsável em próxima emenda (este parecer somente está aprovando participantes maiores de 18 anos, não curatelados);
- numerar as páginas e inserir campo para rubrica do participante e do pesquisador responsável nas páginas que não contém assinatura;
- em relação aos benefícios da pesquisa, analisar se não existem potenciais benefícios DIRETOS aos participantes, e informar no TCLE que os benefícios indiretos são os descritos em adquirir conhecimentos para futuros diagnósticos e intervenções;
- em relação aos riscos, sugiro remover a seguinte sentença, já que não se refere a riscos da pesquisa (já que se trata de pesquisa de material já coletado em biópsia): "De maneira geral, fazer uma biópsia causa dor, inchaço, sangramento e/ou infecção no local onde a agulha da biópsia penetra na sua pele; se seu médico decidir usar anestesia, pode ocorrer reação alérgica. Os prováveis riscos e efeitos adversos (efeitos danosos) de se realizar uma biópsia incluem: sangramento e dor no local onde a agulha foi inserida, um inchaço debaixo da pele que contém

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º Andar 2 Sala 2005 2 Campus Pampulha
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 5.072.805

sangue (hematoma), sonolência, se você optar por receber um analgésico e/ou medicamento que faça você relaxar. De maneira menos provável, porém de riscos sérios, os efeitos colaterais em se submeter a uma biópsia incluem: infecção, falta de ar, baixa frequência cardíaca e baixa pressão arterial, se você optar por receber um analgésico e/ou medicamento que faça você relaxar. Os riscos da coleta de sangue podem incluir desmaio, dor e/ou hematoma (mancha roxa na pele). Raramente pode haver um pequeno coágulo sanguíneo ou infecção no local da picada da agulha."

Para a pesquisa, considerar o risco de identificação dos participantes, e o que será feito para minimizar esse risco (anonimização);

- informar que caso algum risco relacionado à pesquisa se manifeste, o participante terá direito à indenização e/ou atendimento especializado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda aprovada, solicitando atenção às recomendações descritas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o CEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1523414_E5.pdf	30/09/2021 12:43:40		Aceito
Outros	Carta_Resposta_ao_parecer_4_888_698.pdf	30/09/2021 12:40:32	Adriano de Paula Sabino	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_2021_atualizado_30_09_21.pdf	30/09/2021 12:37:20	Adriano de Paula Sabino	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_2021.pdf	22/07/2021 12:28:59	Adriano de Paula Sabino	Aceito
Declaração de Manuseio Material	Biorepositorio.pdf	22/07/2021 12:25:08	Adriano de Paula Sabino	Aceito

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º Andar 2 Sala 2005 4 Campus Pampulha
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 5.072.805

Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorepositorio.pdf	22/07/2021 12:25:08	Adriano de Paula Sabino	Aceito
Outros	Carta_Resposta.docx	22/07/2021 12:07:32	Adriano de Paula Sabino	Aceito
Outros	Emenda.docx	04/11/2020 13:59:16	Adriano de Paula Sabino	Aceito
Outros	EMENDA_2019.pdf	10/04/2019 21:21:22	Adriano de Paula Sabino	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_2019.pdf	09/04/2019 22:25:06	Adriano de Paula Sabino	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO_2019.pdf	09/04/2019 21:50:07	Adriano de Paula Sabino	Aceito
Outros	021776120parecer.pdf	01/08/2016 18:29:40	Telma Campos Medeiros Lorentz	Aceito
Outros	02177612aprovacao.pdf	01/08/2016 18:29:12	Telma Campos Medeiros Lorentz	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	08/07/2016 22:20:59	Adriano de Paula Sabino	Aceito
Outros	Emenda ao Projeto 2015.doc	10/04/2015 15:50:52		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE modificado.docx	09/08/2013 12:39:30		Aceito
Outros	Emenda ao Projeto.doc	09/08/2013 12:25:14		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto de Pesquisa.doc	09/08/2013 12:05:15		Aceito
Outros	Divulgação resultados.jpg	01/06/2012 10:27:41		Aceito
Outros	Destino material.jpg	01/06/2012 10:27:20		Aceito
Outros	Termo de compromisso pesquisadores.jpg	16/04/2012 15:19:01		Aceito
Outros	Termo compromisso pesquisador responsável.jpg	04/04/2012 10:57:54		Aceito
Outros	Termo compromisso instituicao.jpg	04/04/2012 10:57:26		Aceito
Outros	Protocolo DEPE.HC.UFMG.jpg	04/04/2012 10:57:01		Aceito
Outros	Aprovacao camarall.jpg	04/04/2012 10:56:38		Aceito
Outros	Aprovacao camarall.jpg	04/04/2012		Aceito

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 e 2º. Andar e Sala 2005 e Campus Pampulha
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 5.072.805

Outros	Aprovacao camarall.jpg	10:56:19		Aceito
Outros	Aprovacao camaral.jpg	04/04/2012 10:55:57		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 29 de Outubro de 2021

Assinado por:
Críssia Carem Paiva Fontainha
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 e 2º. Andar e Sala 2005 e Campus Pampulha
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

ANEXO 3 – Quantificação RNA**Quadro 3.** Quantificação de RNA total.

Amostra	Concentração de RNA (ng/μL)	Razão A260/280
Controle de vida (MDA-MB-231)	362,3	2,04
GSCB82 (MDA-MB-231)	223,9	2,03
GSCB85 (MDA-MB-231)	284,3	2,03
Controle de vida (THP-1)	343,6	2,04
GSCB76 (THP-1)	14,4	2,13
GSCB82 (THP-1)	48,2	2,03
GSCB85 (THP-1)	72,4	2,05

ANEXO 4 – Produções Científicas

- Artigos completos publicados em periódicos durante o período de Doutorado.



Article

Virtual Screening of Adenylate Kinase 3 Inhibitors Employing Pharmacophoric Model, Molecular Docking, and Molecular Dynamics Simulations as Potential Therapeutic Target in Chronic Lymphocytic Leukemia

Barbara Lima Fonseca Barbosa ¹, Tulio Resende Freitas ¹, Michell de Oliveira Almeida ², Sérgio Schusterschitz da Silva Araújo ³, Ana Clara Andrade ¹, Geovana Gomes Dornelas ¹, Jlyana Gayva Fiorotto ¹, Vinicius Gonçalves Maltarollo ^{4,*} and Adriano de Paula Sabino ^{1,*}

¹ Clinical and Toxicological Analysis Department, Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Presidente Antônio Carlos Ave, Pampulha, Belo Horizonte 31270-901, Brazil; barbaralimafonseca@gmail.com (B.L.F.B.); tulio1478@gmail.com (T.R.F.); anaclara.de.andrade@hotmail.com (A.C.A.); geovanagdornelas@gmail.com (G.G.D.); juhghyva_@hotmail.com (J.G.F.)

² São Carlos Institute of Chemistry, University of São Paulo, Avenida Trabalhador São Carlense, Parque Arnold Schmidt, São Carlos 13566-590, Brazil; michelloliveira02@gmail.com

³ Clinical Hospital, Federal University of Minas Gerais, Presidente Antônio Carlos Ave, Pampulha, Belo Horizonte 31270-901, Brazil; sergioschuster@terra.com.br

⁴ Pharmaceutical Products Department, Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Presidente Antônio Carlos Ave, Pampulha, Belo Horizonte 31270-901, Brazil

* Correspondence: maltarollo@ufmg.br (V.G.M.); adriansabin@ufmg.br (A.d.P.S.)



Citation: Barbosa, B.L.F.; Freitas, T.R.; Almeida, M.d.O.; Araújo, S.S.d.S.; Andrade, A.C.; Dornelas, G.G.; Fiorotto, J.G.; Maltarollo, V.G.; Sabino, A.d.P. Virtual Screening of Adenylate Kinase 3 Inhibitors Employing Pharmacophoric Model, Molecular Docking, and Molecular Dynamics Simulations as Potential Therapeutic Target in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Future Pharm.* **2021**, *1*, 60–79. <https://doi.org/10.3390/futurepharmacol1010006>

Academic Editor: Fabrizio Schifano

Received: 27 July 2021

Accepted: 8 November 2021

Published: 3 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Adenylate kinase 3 (AK3) is an enzyme located in the mitochondrial matrix involved in purine homeostasis. This protein has been considered a potential therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia (CLL), because the silencing of the AK3 gene has inhibited cell growth in CLL in vitro models. This study aimed to design potential AK3 inhibitors by applying molecular modeling techniques. Through the mapping of AK3 binding sites, essential interaction fields for pharmacophore design were identified. Online libraries were virtually screened by using a pharmacophore model, and 6891 compounds exhibited the functional groups for interaction with the target. These compounds underwent molecular docking simulations through Surflex and GOLD programs. After visual inspection, we selected 13 compounds for pharmacokinetic properties toxicology prediction via admetSAR and Prottox web servers. Finally, six compounds were chosen for further analysis.

Keywords: chronic lymphocytic leukemia; adenylate kinase; molecular modeling; virtual screening

1. Introduction

The adenylate kinase (AK) isoenzyme family consists of proteins that catalyze a reversible high-energy phosphoryl transfer reaction between purine nucleotides [1]. AKs perform an important role in the level maintenance of adenine nucleotides, which are essential to cell metabolism, either as a source of chemical energy or as mediators of cell signaling pathways [2]. Adenylate kinase 3, also called GTP:AMP phosphotransferase, is located in the mitochondrial matrix and promotes the reversible transfer of a phosphate group from GTP to AMP, generating GDP and ADP [3]. Thus, AK3 promotes a GDP formation for the next acid citric cycle and substrate availability for ATP production.

AK3 levels are increased in peripheral blood mononuclear cells of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients [4]. CLL is the most common form of lymphoid malignancies in adults and is characterized by the progressive accumulation of small mature B cells in the peripheral blood and lymphoid organs. Conventional therapeutic options for CLL patients



SARS-CoV-2 Omicron BA.1, BA.2, and XAG identification during routine surveillance on a university campus in Belo Horizonte, Brazil, 2022

Daniel Costa Queiroz¹ · Natália Virtude Carobin² · Luiza Campos Guerra de Araújo e Santos¹ · Paula Luize Camargos Fonseca¹ · Isabela Lorraine Braga-Paz¹ · Rillery Calixto Dias¹ · Jorge Gomes Goulart Ferreira¹ · Túlio Resende Freitas² · Diego Menezes¹ · Sílvia Cristina Verde Mendes Nolasco² · Simone Rodrigues Ribeiro² · Thaís Salviana Ribeiro² · Laura do Amaral Xavier² · Karina Braga Gomes² · Adriano de Paula Sabino² · Renato Santana de Aguiar^{1,3} · Renan Pedra de Souza¹

Received: 29 July 2022 / Accepted: 12 October 2022 / Published online: 22 October 2022
 © The Author(s) under exclusive licence to Sociedade Brasileira de Microbiologia 2022

Abstract

We report SARS-CoV-2 genomic surveillance results between Belo Horizonte, Brazil's third and fourth case waves. Samples were obtained through a routine university monitoring COVID-19 program from the 9th to the 22nd epidemiological weeks (March and June 2022). We identified ten samples from the BA.1 clade (BA.1, BA.1.1, and BA.1.14.1 lineages) and 45 samples from the BA.2 clade (BA.2, BA.2.56, BA.2.9, BA.2.62, BA.2.23, BA.2.81, and BA.2.10). We observed progressive replacement of the BA.1 by the BA.2 clade. Furthermore, two XAG recombinants were found in the 22nd week. Diversification of the omicron variant seems to have contributed to the resurgence of cases in Belo Horizonte, similarly to what has been reported in South Africa.

Keywords Genomic surveillance · Variants of concern · Phylogeny · Viral evolution · Recombinant variant

Responsible Editor: Luis Augusto Nero

Daniel Costa Queiroz and Natália Virtude Carobin contributed equally.

✉ Adriano de Paula Sabino
adriansabin01@gmail.com

✉ Renato Santana de Aguiar
santanarnt@gmail.com

✉ Renan Pedra de Souza
renanpedra@gmail.com

¹ Laboratório de Biologia Integrativa Departamento de Genética Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

² Laboratório Institucional de Pesquisa Em Biomarcadores Laboratório de Hematologia Clínica Departamento de Análises Clínicas E Toxicológicas Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627 ICB – Pampulha, Minas Gerais 31270901 Belo Horizonte, Brazil

³ Instituto D'OR de Pesquisa E Ensino, Rio de Janeiro, Brazil

Introduction

COVID-19 has strongly impacted Brazil. The country presents the second-largest death toll worldwide and a significant reduction in life expectancy due to the pandemic [1]. Brazil, a country with a continental proportion, showed substantial heterogeneity in the number of cases and deaths across its territory. Minas Gerais, a state with more than 20,000,000 inhabitants, reported more than 60,000 deaths reaching almost 10% of the Brazilian total. Belo Horizonte, the capital of the Minas Gerais state, presented one of the lowest state capital mortality rates in Brazil [2].

SARS-CoV-2 variants played a significant role in the COVID-19 waves in Brazil [3]. Four waves could be identified in Minas Gerais: the first was in mid-2020 when B.1.1.28 and B.1.1.33 variants were circulating [4–6]; the second was after the introduction of alpha (B.1.1.7) and gamma (P.1) variants in late 2020 [7, 8]. The other two waves were observed in early 2022 after introducing the omicron variant and its subvariants. Interestingly, the delta variant in Brazil did not result in increased cases [9, 10].


All genomic surveillance studies published from Minas Gerais have used samples from the Brazilian Public Health



Research Article

For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

miR-197, miR-26a and miR-27a analysis in chronic lymphocytic leukemia

Ana C Andrade^{1,†}, Tulio R Freitas¹, Geovana G Dornelas¹, Lorena C Gomes, Barbara LF Barbosa, Sérgio SS Araújo², Karina B Gomes¹ & Adriano P Sabino^{*,1} 

¹Department of Clinical & Toxicological Analysis, Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, 6627, Presidente Antônio Carlos Ave, Pampulha, Belo Horizonte, MG, 31270901, Brazil

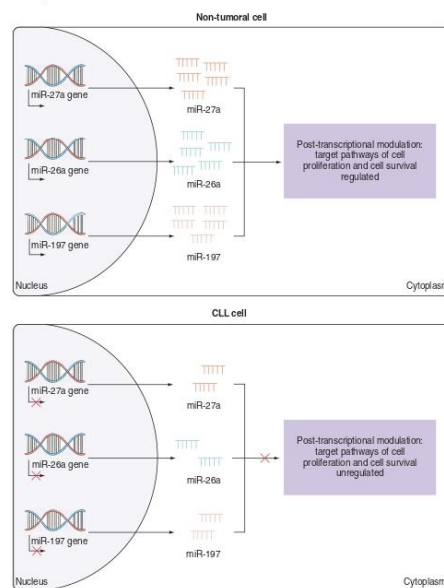
²Clinical Hospital, Federal University of Minas Gerais, Presidente Antônio Carlos Ave, Pampulha, Belo Horizonte, MG, 31270901, Brazil

*Author for correspondence: adriansabin@ufmg.br

[†]Authors contributed equally

Aims: Chronic lymphocytic leukemia (CLL) involves the proliferation and increase of B-lymphocytes in the peripheral blood, bone marrow and lymphoid organs. This study evaluated the microRNAs miR-197, miR-26a and miR-27a as potential biomarkers for CLL. **Patients & Methods:** Eighty-two patients with CLL and 62 control subjects (CT) were investigated for these targets, using quantitative PCR (qPCR). **Results:** A significant reduction of all microRNAs was observed in CLL compared to the controls ($p < 0.001$). Significant negative correlations were observed for the clinical staging groups. After adjusting for multiple logistic regression analysis, miR-197 and miR-26a remained as possible independent risk factors related to the CLL. **Conclusions:** Our data indicated good performance of this microRNAs as potential biomarkers in CLL.

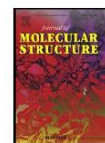
Graphical abstract:





Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Molecular Structure

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molstr

Computer-aided molecular design, synthesis and evaluation of antifungal activity of heterocyclic compounds



Nereu Junio Cândido Oliveira^a, Iasmin Natália Santos Teixeira^a,
 Philipe Oliveira Fernandes^a, Gabriel Corrêa Veríssimo^a, Aline Dias Valério^b,
 Carolina Paula de Souza Moreira^c, Túlio Resende Freitas^d, Anna Clara Ventura Fonseca^d,
 Adriano de Paula Sabino^d, Susana Johann^b, Vinicius Gonçalves Maltarollo^a,
 Renata Barbosa de Oliveira^{a,*}

^a Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

^b Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^c Serviço de Desenvolvimento Tecnológico Farmacêutico, Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento, Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Belo Horizonte, MG, Brazil

^d Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 17 April 2022
 Revised 4 June 2022
 Accepted 21 June 2022
 Available online 24 June 2022

Keywords:
 Thiazolylhydrazones
 Antifungals
Cryptococcus
Candida
 Computational studies

ABSTRACT

Outpatient complications for fungal infections in immunocompromised patients and the development of antimicrobial drug resistance mechanisms demonstrate the need to develop new antifungal agents. In this perspective, heterocyclic compounds namely thiazolylhydrazones, furan, tetrazole, triazole and thiazoline derivatives were synthesized and tested *in vitro* against seven clinical importance *Cryptococcus* and *Candida* species. In this study, virtual screening techniques were applied using a scaffold-hopping database, FDA approved drugs and a ZINC subset. Some of the compounds evaluated showed promising antifungal activity against *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. neoformans* and *C. gatti*, displaying minimal inhibitory concentration (MIC) values in the range of 0.12–250 μ M.

© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cryptococcosis and candidiasis are opportunistic infections caused by fungi of the genera *Cryptococcus* and *Candida*, which are often associated with pulmonary and vulvovaginal lesions, respectively. The pathogenicity and virulence of these microorganisms vary depending on species and degree of susceptibility of the host and may progress to systemic infections. In recent years, the prevalence of these infections has been increasing due to AIDS-related immunosuppression and in transplant and autoimmune disease patients [1,2].

Despite pharmacotherapeutic advances, the development of new antifungal drugs faces several limitations. These include the high toxicity resulting from the structural similarity between the fungal and mammalian cells (both eukaryotes), which makes it difficult to design drugs for specific targets in the fungal cells without compromising the homeostatic system of the human organism [3].

In addition, some fungal species have intrinsic resistance to certain drugs, as observed for *Candida krusei* which has a natural resistance to fluconazole [4]. Another alarming situation refers to the indiscriminate use of antimicrobials that have led to the emergence of species resistant to conventional therapies [5,6].

In this perspective, thiazolylhydrazone derivatives have shown promising activity against fungal proliferation with a broad spectrum of action and potency similar to or greater than standard drugs used as positive control in the assays. Besides bioactive properties, obtaining novel thiazolylhydrazone-based structures are particularly interesting due to their synthetic versatility, allowing the optimization of biological activity and modulation of pharmacokinetics and pharmacodynamics parameters [7–9]. Furthermore, RN104 and RN113 (Fig. 1), thiazolylhydrazone derivatives with potent antifungal activity, showed low toxicity *in vitro* and *in vivo* assays reinforcing the potential of this class [8,10,11].

Chemical similarity models (CSM) and quantitative structure-activity relationship (QSAR) studies for anti-*C. neoformans* activity of thiazolylhydrazones have been reported in previous work [12]. The computational studies indicated the importance of thiazolylhydrazone moiety and hydrophobic substituents attached to the

* Corresponding author.
 E-mail address: renatabo.ufmg@gmail.com (R.B. de Oliveira).



**Síntese e avaliação de potencial atividade antitumoral de derivados
arilfuranos**

**Synthesis and evaluation of potential antitumor activity of arylfuran
derivatives**

DOI:10.34119/bjhrv5n3-109

Recebimento dos originais: 14/02/2022

Aceitação para publicação: 28/03/2022

Pedro Augusto Lemos Santana

Farmacêutico

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos 6627 - Pampulha, Belo Horizonte

E-mail: pedrogutols1@gmail.com

Marina Mol Sena Andrade

Mestra em Ciências Farmacêuticas

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos 6627 - Pampulha, Belo Horizonte

marinamolandrade@gmail.com

Gabriel Vitor de Lima Marques

Mestre em Ciências Farmacêuticas

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos 6627 - Pampulha, Belo Horizonte

E-mail: leirbaglm@gmail.com

Fernanda Cristina Gontijo Evangelista

Doutora em Análises Clínicas e Toxicológicas

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos 6627 - Pampulha, Belo Horizonte

E-mail: fernandacge@gmail.com

Túlio Resende Freitas

Mestre em Biotecnologia

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos 6627 - Pampulha, Belo Horizonte

E-mail: tuliorfreitas@gmail.com

Adriano de Paula Sabino

Doutor em Ciências Farmacêuticas

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos 6627 - Pampulha, Belo Horizonte

E-mail: adriansabin01@gmail.com


Renata Barbosa de Oliveira

Doutora em Química

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos 6627 - Pampulha, Belo Horizonte

E-mail: renatabo.ufmg@gmail.com

RESUMO

Fármacos que possuem um anel furano em sua estrutura são versáteis quanto à sua atividade biológica, sendo utilizados para diversas funções terapêuticas, como antitumoral. O câncer é, atualmente, um dos principais problemas de saúde pública mundial, estando entre as quatro principais causas de morte prematura na maioria dos países. No presente trabalho, oito derivados arilfuranos foram sintetizados e testados frente a linhagens de células tumorais de mama (MCF7) e leucemia mieloide (K562). Desses, alguns demonstraram valores de IC_{50} bastante promissores, como **(3)** ($30,55 \mu\text{M} \pm 1,78$ para MCF7 e $41,68 \pm 2,33$ para K562), **(5)** ($29,20 \mu\text{M} \pm 1,10$ para K562), **(6)** ($32,50 \pm 2,50$ para K562) e **(10)** ($30,46 \mu\text{M} \pm 2,52$ para MCF7 e $28,98 \mu\text{M} \pm 1,84$ para K562).

Palavras-chave: arilfuranos, antitumoral, química medicinal

ABSTRACT

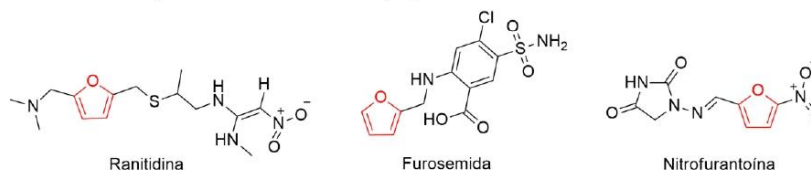
Drugs that have a furan ring in their structure are versatile as to their biological activity, being used for various therapeutic functions, such as antitumor. Cancer is currently one of the main public health problems worldwide, being among the four main causes of premature death in most countries. In the present work, eight arylfuran derivatives were synthesized and tested against breast (MCF7) and myeloid leukemia (K562) tumor cell lines. Of these, some showed quite promising IC_{50} values, such as **(3)** ($30.55 \mu\text{M} \pm 1.78$ for MCF7 and 41.68 ± 2.33 for K562), **(5)** ($29.20 \mu\text{M} \pm 1.10$ for K562), **(6)** (32.50 ± 2.50 for K562) and **(10)** ($30.46 \mu\text{M} \pm 2.52$ for MCF7 and $28.98 \mu\text{M} \pm 1.84$ for K562).

Keywords: arylfurans, antitumor, medicinal chemistry

1 INTRODUÇÃO

Fármacos que possuem um anel furano em sua estrutura são versáteis quanto sua atividade biológica, sendo utilizados para diversas funções terapêuticas, como antiúlcera (ranitidina), diurética (furosemida) e antibacteriana (nitrofurantoína) (Figura 1). Além disso, algumas substâncias que possuem esse grupamento demonstraram propriedades antitumorais descritas, como para o tratamento de câncer de mama¹.

Figura 1: Estrutura de fármacos que possuem anel furano em sua estrutura





Abordagens do tratamento da leucemia mieloide aguda: revisão integrativa

Approaches to treatment of acute myeloid leukemia: integrative review

DOI:10.34117/bjdv8n2-077

Recebimento dos originais: 07/01/2022

Aceitação para publicação: 07/02/2022

Letícia Paula Lopes

Ensino superior incompleto - Enfermagem
Instituição de atuação atual: Universidade do Estado de Minas Gerais
Endereço: Av. Sete de Setembro, 665, Afonso Pena. Divinópolis-MG
E-mail: leticiaplopes14@gmail.com

Cecília Silva Santos

Ensino superior incompleto - Enfermagem
Instituição de atuação atual: Universidade do Estado de Minas Gerais
Endereço: Rua Afrânio Peixoto, 2211, São José. Divinópolis-MG
E-mail: firminoceci@gmail.com

Gabriele de Souza Severino

Ensino superior incompleto - Enfermagem
Instituição de atuação atual: Universidade do Estado de Minas Gerais
Endereço: Rua São Francisco de Assis, 591, Nossa Senhora do Carmo. Carmo do
Cajuru-MG
E-mail: gabrielesouzagabi@gmail.com

Túlio Resende Freitas

Mestre em Biotecnologia
Instituição de atuação atual: Universidade Federal de Minas Gerais
Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, Pampulha. Belo Horizonte-MG
E-mail: tuliorfreitas@gmail.com

Isaías de Moraes Caetano

Especialista em Enfermagem Oncológica
Instituição de atuação atual: Faculdade Unyleya
Endereço: Rua Jácome Ribeiro, 30, Morro do Sol. Itaúna-MG
E-mail: isaiascaetano@gmail.com

Fernando de Pilla Varotti

Doutor em Farmacologia Bioquímica Molecular
Instituição de atuação atual: Universidade Federal de São João del-Rei
Endereço: Av. Sebastião Gonçalves Coelho, 400. Divinópolis-MG
E-mail: varotti@ufsj.edu.br



Silmara Nunes Andrade

Doutora em Ciências da Saúde

Instituição de atuação atual: Universidade do Estado de Minas Gerais

Endereço: Av. Paraná, 3001. Divinópolis-MG

E-mail: silmaranunesandrade@hotmail.com

RESUMO

O presente artigo buscou identificar os tratamentos utilizados na Leucemia Mielóide Aguda (LMA), apontando os achados relevantes e suas limitações acerca da temática. Trata-se de uma revisão integrativa de literatura acerca da LMA, seus mecanismos genéticos e os tratamentos atualmente utilizados no combate a neoplasia. Foi realizado o levantamento de artigos no período de janeiro e fevereiro de 2021, nas bases de dados Medline e LILACS, sendo selecionados três estudos para a discussão. Os artigos selecionados abordavam sobre tratamento e prognóstico por grupos de idade, tratamento farmacológico e sobrevida de pacientes em tratamento farmacológico. Notabiliza-se que os tratamentos empregados no combate a LMA devem ser categoricamente analisados a depender do estado clínico do paciente.

Palavras-chave: Leucemia Mielóide Aguda, Diagnóstico, Terapia.

ABSTRACT

This article sought to identify the treatments used in Acute Myeloid Leukemia (AML), pointing out the relevant findings and their limitations on the subject. This is an integrative literature review about AML, its genetic mechanisms and the treatments currently used to combat cancer. A survey of articles was carried out between January and February 2021, in the Medline and LILACS databases, and three studies were selected for discussion. The selected articles addressed treatment and prognosis by age groups, pharmacological treatment and survival of patients undergoing pharmacological treatment. It should be noted that the treatments used to combat AML must be categorically analyzed depending on the patient's clinical status.

Keywords: Acute Myeloid Leukemia, Diagnosis, Therapy.

1 INTRODUÇÃO

O sistema hematopoiético é um mecanismo substancial a manutenção da vida, tendo como função específica o processo de formação, desenvolvimento e maturação das células sanguíneas e apresentando seu prelúdio no saco vitelínico do indivíduo. No entanto, no decurso do desenvolvimento fetal, a hematopoiese passa a sobrevir definitivamente na medula óssea vermelha, localizada no canal medular dos ossos longos. A medula amarela, por sua vez, é constituída por células adiposas que conferem a ela a coloração amarelada. Esse tecido, eventualmente, gera células sanguíneas, sendo esse fato restrito a eventos de enfermidades, como hemorragias e anemias severas (FRANCISCO, 2016).



Câncer de mama: diagnóstico e tratamento quimioterápico e radioterápico

Breast cancer: diagnosis, drug therapy and radiotherapy treatment

DOI:10.34117/bjdv7n10-341

Recebimento dos originais: 07/09/2021
Aceitação para publicação: 25/10/2021

Gabriele de Souza Severino

Ensino superior incompleto - Enfermagem
Instituição: Universidade do Estado de Minas Gerais
Endereço: Rua São Francisco de Assis, 591, Nossa Senhora do Carmo. Carmo do
Cajuru-MG
E-mail: gabrielesouzagabi@gmail.com

Cecília Silva Santos

Ensino superior incompleto - Enfermagem
Instituição: Universidade do Estado de Minas Gerais
Endereço: Rua Afrânio Peixoto, 2211, São José. Divinópolis-MG
E-mail: firminoceci@gmail.com

Letícia Paula Lopes

Ensino superior incompleto - Enfermagem
Instituição: Universidade do Estado de Minas Gerais
Endereço: Av. Sete de Setembro, 665, Afonso Pena. Divinópolis-MG
E-mail: leticiaplopes14@gmail.com

Túlio Resende Freitas

Mestre em Biotecnologia
Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais
Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, Pampulha. Belo Horizonte-MG
E-mail: tuliorfreitas@gmail.com

Isaiás de Moraes Caetano

Especialista em Enfermagem Oncológica
Instituição: Faculdade Unyleya
Endereço: Rua Jácome Ribeiro, 30, Morro do Sol. Itaúna-MG
E-mail: isaiascaetano@gmail.com

Fernando de Pilla Varotti

Doutor em Farmacologia Bioquímica Molecular
Instituição: Universidade Federal de São João del-Rei
Endereço: Av. Sebastião Gonçalves Coelho, 400. Divinópolis-MG
E-mail: varotti@ufsj.edu.br

Silmara Nunes Andrade

Doutora em Ciências da Saúde
Instituição: Universidade do Estado de Minas Gerais



Endereço: Av. Paraná, 3001. Divinópolis-MG
E-mail: silmaranunesandrade@hotmail.com

RESUMO

O presente artigo avalia o diagnóstico e o tratamento quimioterápico e radioterápico no câncer de mama. Trata-se de uma revisão integrativa de literatura acerca do diagnóstico e tratamentos quimioterápicos e radioterápicos no câncer de mama. Foi realizado o levantamento artigos no período de janeiro a fevereiro de 2021, nas bases de dados LILACS e MEDLINE, sendo 3 estudos selecionados para discussão. Destes, um tratou acerca da resposta de pacientes ao tratamento ofertado para o câncer, outro sobre o acompanhamento de uma paciente diagnosticada com linfoma primário de mama, e outro acerca das medicações utilizadas em tratamento do câncer. Embora haja diversos tipos de tratamento além dos selecionados pela pesquisa, o tratamento quimioterápico e radioterápico associado a cirurgia de remoção é a principal conduta adotada para tratamento de câncer de mama.

Palavras-chave: Câncer de Mama, Diagnóstico, Tratamento, Quimioterapia, Radioterapia.

ABSTRACT

This article evaluates the diagnosis and chemotherapy and radiotherapy treatment in breast cancer. This is an integrative literature review on the diagnosis and chemotherapy and radiotherapy treatments in breast cancer. Articles were surveyed from January to February 2021, in LILACS and MEDLINE databases, with 3 studies selected for discussion. Of these, one dealt with the response of patients to the treatment offered for cancer, another with the monitoring of a patient diagnosed with primary breast lymphoma, and another with the medications used in cancer treatment. Although there are several types of treatment in addition to those selected by the research, chemotherapy and radiotherapy treatment associated with removal surgery is the main approach adopted for the treatment of breast cancer.

Keywords: Breast Cancer, Diagnosis, Treatment, Chemotherapy, Radiotherapy.

1 INTRODUÇÃO

O câncer compreende um conjunto de doenças que têm por característica comum o crescimento desordenado das células (BRASIL, 2018a), e é considerado hoje como um grave problema de saúde pública. O Ministério da Saúde, visando cumprir o seu dever estabelecido pela Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, que determina que o Estado deve “garantir a saúde consiste na formulação e execução de políticas econômicas e sociais que visem à redução de riscos de doenças e de outros agravos” (BRASIL, 1990), criou a Política Nacional para a Prevenção e Controle do Câncer, instituída pela Portaria nº 874, de 16 de maio de 2013, que visa reduzir a mortalidade e a incapacidade advindas da neoplasia, e diminuir a incidência de alguns tipos de câncer (BRASIL, 2013).

- Depósitos de patentes realizados durante o período de Doutorado.

Título: Derivados indólicos com atividade antileucêmica e uso



19/10/2022 870220096521
15:57

29409161948460547

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2022 021225 2

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 17217985000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31270-901

País: Brasil

Telefone: (31) 3409-6430

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 19/10/2022 às 15:57, Petição 870220096521

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): DERIVADOS INDÓLICOS COM ATIVIDADE ANTILEUCÊMICA E USO.

Resumo: A presente tecnologia trata de derivados indol-2-ilamínicos e indol-2-ilamídicos e de seu uso no preparo de medicamentos antileucêmicos. Os derivados apresentaram valores de seletividade elevados frente a linhagens de células leucêmicas, especialmente do tipo THP-1, atingindo valores tão altos quanto 311,2 e sendo próximos ou superiores aos observados para os fármacos comerciais Imatinib e Citarabina. Além disso, possuem considerável facilidade de preparo, necessitando de, no máximo, duas etapas de síntese e etapas simples de isolamento e purificação.

Figura a publicar: 1

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 19/10/2022 às 15:57, Petição 870220096521

Nome: ADRIANO DE PAULA SABINO
CPF: 02824275626
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Professor do ensino superior
Endereço: Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha
Cidade: Belo Horizonte
Estado: MG
CEP: 31270-901
País: BRASIL
Telefone: (31) 340 93932
Fax:
Email: adriansabin01@gmail.com

Inventor 4 de 5

Nome: TÚLIO RESENDE FREITAS
CPF: 07996619611
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Pesquisador
Endereço: Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha
Cidade: Belo Horizonte
Estado: MG
CEP: 31270-901
País: BRASIL
Telefone: (31) 340 93932
Fax:
Email: patentes@ctit.ufmg.br

Inventor 5 de 5

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 19/10/2022 às 15:57, Petição 870220096521

Título: Compostos sintéticos N-heterocíclicos e seu precursor, composição farmacêutica, processo e uso



04/04/2022 870220028998
17:45

29409161945593180

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2022 006503 9

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 3

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 17217985000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31270-901

País: Brasil

Telefone: (31) 3409-6430

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 04/04/2022 às 17:45, Petição 870220028998

Depositante 2 de 3

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL REI - UFSJ

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 21186804000105

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Praça Frei Orlando, 170 - Centro

Cidade: São João del Rei

Estado: MG

CEP: 36307-352

País: BRASIL

Telefone: (32) 337 94908

Fax:

Email: seipi@ufsj.edu.br

Depositante 3 de 3

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE - UFF

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 28523215000106

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua Miguel de Frias, 9 - 7º andar - Icaraí

Cidade: Niterói

Estado: RJ

CEP: 24220-900

País: BRASIL

Telefone: (21) 262 95119

Fax:

Email: agir.proppi@id.uff.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 04/04/2022 às 17:45, Petição 870220028998

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): COMPOSTOS SINTÉTICOS N-HETEROCÍCLICOS E SEU PRECURSOR, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, PROCESSO E USOS

Resumo: A presente tecnologia refere-se a dois compostos sintéticos N-heterocíclicos e seu precursor, seu processo de síntese, composições farmacêuticas contendo tais compostos e seu uso na preparação de medicamentos antitumorais.

Figura a publicar: 1

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 04/04/2022 às 17:45, Petição 870220028998

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 9**Nome:** ADRIANO DE PAULA SABINO**CPF:** 02824275626**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Professor do ensino superior**Endereço:** Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha**Cidade:** Belo Horizonte**Estado:** MG**CEP:** 31270-901**País:** BRASIL**Telefone:** (31) 340 94774**Fax:****Email:** patentes@ctit.ufmg.br**Inventor 2 de 9****Nome:** TÚLIO RESENDE FREITAS**CPF:** 07996619611**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Pesquisador**Endereço:** Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha**Cidade:** Belo Horizonte**Estado:** MG**CEP:** 31270-901**País:** BRASIL**Telefone:** (31) 340 94774**Fax:****Email:** patentes@ctit.ufmg.br**Inventor 3 de 9****PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 04/04/2022 às 17:45, Petição 870220028998