



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

IRIS TRINDADE TENÓRIO JACOB

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA *IN VITRO*, INIBIÇÃO
TOPOISOMERASE, INTERAÇÃO COM BIOMACROMÓLECULAS DE
DERIVADOS INDOL-TIOSSEMICARBAZÔNICOS E ESTUDO DE DOCKING**

RECIFE

2022

IRIS TRINDADE TENORIO JACOB

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA *IN VITRO*, INIBIÇÃO
TOPOISOMERASE, INTERAÇÃO COM BIOMACROMÓLECULAS DE
DERIVADOS INDOL-TIOSSEMICARBAZÔNICOS E ESTUDO DE DOCKING

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Fármacos e medicamentos.

Orientadora:

Profa. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima

Co-orientadora:

Profa. Dra. Sinara Mônica Vitalino de Almeida

Recife

2022

Catálogo na fonte: Bibliotecária:
Elaine Freitas, CRB4:1790

J15a	<p>Jacob, Iris Trindade Tenório Avaliação da atividade antiproliferativa <i>in vitro</i>, inibição topoisomerase, interação com biomacromoléculas de derivados indol- tiossemicarbazônicos e estudo de docking/ Iris Trindade Tenório Jacob. – 2022. 108 f. : il.</p> <p>Orientadora: Maria do Carmo Alves de Lima. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2022. Inclui referências e apêndices.</p> <p>1. DNA. 2. albuminas. 3. Espectroscopia. 4. Topoisomerase. 5. Antiproliferativo. I. Lima, Maria do Carmo Alves de (orientadora). II. Título.</p>	
617.6	CDD (23.ed.)	UFPE (CCS 2022 - 268)

IRIS TRINDADE TENÓRIO JACOB

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA *IN VITRO*, INIBIÇÃO
TOPOISOMERASE, INTERAÇÃO COM BIOMACROMÓLECULAS DE
DERIVADOS INDOL-TIOSSEMICARBAZÔNICOS E ESTUDO DE DOCKING**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Fármacos e medicamentos.

Aprovada em: 18/02/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Maria do Carmo Alves de Lima (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Cristiane Moutinho Lagos de Melo (Examinadora interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior (Examinador externo)
Universidade Estadual da Paraíba

Prof. Dr. Rafael Souto de Azevedo (Examinador externo)
Universidade de Pernambuco

Prof. Dr. Rômulo Carlos Dantas da Cruz (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Recife

2022

Aos meus pais Eliane Trindade e Edmond Tenório.

As minhas tias Samira (in memoriam) e Soraya.

E ao meu irmão Edmond Trindade por zelarem sempre por mim.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, por estar sempre ao meu lado e por todos os amigos que me cercam, pelos professores colocados em minha vida e ainda, pelas inúmeras oportunidades que já tive até aqui. E a minha Nossa Senhora da Conceição e Nossa Senhora Aparecida por intercederem por mim a Deus, me cobrirem com seu manto protetor de mãe e não deixarem que nada de mal me acontecesse.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Maria do Carmo Alves de Lima, por todos os ensinamentos, momentos de descontração e carinho.

À Prof.^a. Sinara Mônica Vitalino de Almeida, pela co-orientação, auxiliando sempre que possível, e por estar sempre disposta a ajudar nos momentos de maiores dúvidas e angústias.

Aos professores Luiz Alves e Fábio Brayner que me acolheu de braços abertos no laboratório e até aqui tem me ajudado, compartilhando seu conhecimento e suas experiências.

Aos meus queridos amigos Emanuel, Amélia, Keriolaine, Aurenice e Denise, que tornaram essa jornada mais prazerosa.

À minha amiga Paula Roberta por estar sempre ao meu lado, nos momentos de alegria e tristeza. E mesmo em seu silêncio e discrição me acolhe e me entende sem pedir explicação.

Aos amigos do Laboratório de Química e Inovação Terapêutica, entre eles: Pedro, Keriolaine, Cleberon, Thamires, Paulo, Iranildo, Cristiane e Fernanda por participarem no meu dia a dia de trabalho e pelos momentos de aprendizagem e brincadeiras durante tanto tempo de convívio.

Aos meus familiares pelo incentivo diário, em especial minha mãe, Eliane, que sempre acreditou em mim, por todas as promessas feitas, por seu amor tão sublime e incondicional. Ao meu pai Edmond, por ser meu amigo, por todos os dias que partilhou comigo e por ser um verdadeiro pai. E ao meu irmão, Edmond Trindade, por todos os momentos vividos, por todos os problemas suportados e pelos dias felizes compartilhados.

Ao CNPq, CAPES e FACEPE pelo apoio financeiro que possibilitou a execução deste trabalho.

E por fim, à todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a finalização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos

RESUMO

O câncer é uma doença complexa e multifatorial caracterizada pelo crescimento celular descontrolado e configura-se como uma das principais causas de morte no mundo. Classificam-se em tumores hematológicos e sólidos, onde os hematológicos são compreendidos pela leucemia, linfomas Hodgkin e não-Hodgkin e acometem homens e mulheres em todo o globo. Entre os tumores sólidos, o câncer de próstata é a segundo tipo mais prevalente nos homens, enquanto que nas mulheres, o câncer de mama é o tipo mais comumente diagnosticado e a principal razão de morte, principalmente quando da ocorrência do câncer de mama inflamatório. O que reforça a existência de uma relação funcional entre inflamação e o câncer. Dentre as estratégias disponíveis para o tratamento do câncer, a quimioterapia continua sendo a abordagem terapêutica mais estabelecida e utilizada atualmente. Porém a toxicidade e resistência aos fármacos disponíveis é uma barreira para a resolubilidade desse conjunto de doenças, fazendo-se necessário a pesquisa e o desenvolvimento de novos tratamentos mais eficazes e confiáveis contra o câncer. Algumas análises, como o estudo de ligação à proteína sérica humana (HSA), e aos alvos biológicos: DNA e a topoisomerase II-alfa (topo), viabilizam o processo de descoberta de novos agentes terapêuticos. Nesta perspectiva, este trabalho propôs a avaliação antiproliferativo e de seus possíveis mecanismos de ação de vinte compostos indólicos-tiossemicarbazonas com atividade anti-inflamatória previamente descrita. Os compostos LT foram analisados quanto à capacidade de ligação a HSA e ao DNA, e teste de ligação competitiva através das técnicas espectroscópicas de absorção e fluorescência. No estudo antiproliferativo, foi utilizada a técnica de MTT com as linhagens tumorais DU-145, Jurkat, MCF-7 e T-47D e de macrófagos J774A.1. O ensaio de migração, foi realizada através do teste de ranhura. A eletroforese em gel de agarose foi empregada para análise da inibição da enzima topo II α . Na absorção com HSA, a maior constante de ligação foi $3,70 \times 10^6$, referente ao LT89 (alil/ 7-CH₃) e na fluorescência, todos os compostos com exceção do LT76 e LT87, foram capazes de ocasionar a supressão fluorescente com a maior constante de Stern-Volmer para o LT88 (alil/ pirrol[2,3-b]piridina) $3,55 \times 10^4$. Na interação por absorção com o DNA, foram observados efeitos hipercrômico e hipocrômico, tendo o LT88 a maior constante de ligação (K_b) $1,05 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. No ensaio com as sondas fluorescentes laranja de acridina (AO) e 4'-6-diamina-2'-fenilindol (DAPI), foi possível identificar que o modo de ligação ao DNA dos compostos LT é preferencialmente por intercalação entre os pares de bases. No ensaio antiproliferativo com a DU-145 e a Jurkat os compostos LT76, LT77 e LT87 se destacaram. Já com a MCF-7 e T-47D, o menor IC₅₀ foi do LT81 (1-naftil/4-NO₂) em ambas as linhagens com valor de $0,74 \pm 0,12$ e $0,68 \pm 0,10$ respectivamente, seguido dos compostos LT76 e LT87.

No ensaio de migração com a MCF-7, os três compostos mencionados anteriormente são capazes de inibir o processo de invasão celular com destaque para o LT76 que o fez em ambas as concentrações do teste (0,5 e 1,0 μM). Enquanto que na T-47D o processo de inibição ocorre principalmente por ação dos compostos LT76 e LT87. Assim como o controle positivo amsacrina, os compostos LT76, LT81 e LT87 foram capazes de inibir a ação enzimática da topo II-alfa. Associados a esses resultados, outros estudos se tornam necessários para consolidar o mecanismo de ação tumoral desses compostos.

Palavras-chave: DNA; albumina; espectroscopia; topoisomerase; antiproliferativo.

ABSTRACT

Cancer is a complex and multifactorial disease characterized by uncontrolled cell growth and is one of the main causes of death in the world. They are classified into hematological and solid tumors, where hematological tumors are comprised of leukemia, Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas, and affect men and women across the globe. Among solid tumors, prostate cancer is the second most prevalent type in men, while in women, breast cancer is the most commonly diagnosed type and the main reason for death, especially when inflammatory breast cancer occurs. What reinforces the existence of a functional relationship between inflammation and cancer. Among the available strategies for the treatment of cancer, chemotherapy remains the most established and currently used therapeutic approach. However, the toxicity and resistance to available drugs is a barrier to the resolution of this set of diseases, making it necessary to research and develop new, more effective and reliable treatments against cancer. Some analyses, such as the study of binding to human serum protein (HSA), and to biological targets: DNA and topoisomerase II-alpha (top), enable the process of discovering new therapeutic agents. In this perspective, this work proposed the antitumor evaluation and its possible mechanisms of action of twenty indole-thiosemicarbazone compounds with anti-inflammatory activity previously described. LT compounds were analyzed for binding ability to HSA and DNA, and competitive binding assay by absorption and fluorescence spectroscopic techniques. In the antiproliferative study, the MTT technique was used with the DU-145, Jurkat, MCF-7 and T-47D tumor lines and J774A.1 macrophages. The migration test was carried out through the groove test. Agarose gel electrophoresis was used to analyze the inhibition of topoisomerase II α enzyme. In absorption with HSA, the highest binding constant was 3.70×10^6 , referring to LT89 (allyl/7-CH₃) and in fluorescence, all compounds except LT76 and LT87 were able to cause fluorescent suppression with the highest Stern-Volmer constant for LT88 (allyl/pyrrole[2,3-b]pyridine) 3.55×10^4 . In the interaction by absorption with DNA, hyperchromic and hypochromic effects were observed, with LT88 having the highest constant of link (K_b) 1.05×10^6 M⁻¹. In the assay with acridine orange (AO) and 4'-6-diamine-2'-phenylindole (DAPI) fluorescent probes, it was possible to identify that the DNA binding mode of LT compounds is preferentially by intercalation between base pairs. In the antiproliferative assay with DU-145 and Jurkat, the compounds LT76, LT77 and LT87 stood out. With MCF-7 and T-47D, the lowest IC₅₀ was for LT81 (1-naphthyl/4-NO₂) in both strains with a value of 0.74 ± 0.12 and 0.68 ± 0.10 respectively, followed by the compounds LT76 and LT87. In the migration assay with MCF-7, the three compounds mentioned above are able to inhibit the process of cell

invasion, especially LT76, which did so at both test concentrations (0.5 and 1.0 μM). While in T-47D the inhibition process occurs mainly through the action of the compounds LT76 and LT87. As well as the positive control amsacrine, the compounds LT76, LT81 and LT87 were able to inhibit the enzymatic action of topo II-alpha. Associated with these results, other studies are necessary to consolidate the tumor mechanism of action of these compounds.

Keywords: DNA; albumin; spectroscopy; topoisomerase; antiproliferative.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estimativa de incidências de novos casos de cânceres no mundo até 2040.....	19
Figura 2 – Números estimado de morte a nível mundial dos principais tipos de cânceres	20
Figura 3 – Hallmarks do câncer.....	21
Figura 4 – Representação esquemática dos modos de interação com o DNA	27
Figura 5 – Diferença estrutural da HSA e BSA.	28
Figura 6 – Estrutura química da Camptotecina	30
Figura 7 – Estruturas químicas do etoposídeo (esquerda) e teníposídeo (direita)	31
Figura 8 – Estrutura química do indol	34
Figura 9 – Alcalóides indólicos com diferentes propriedades farmacológicas	35
Figura 10 – Estrutura química dos alcalóides antitumorais Mitomicina C e Jerantinine A.	36
Figura 11 – Estrutura química dos Inibidores da Topo I e II	37
Figura 12 – Derivado indol-tiazolidinona.	37
Esquema 1 - Representação da tiossemicabazona e seus bioisómeros e suas aplicações farmacológicas.....	38
Esquema 2 - Formação das tiossemicarbazidas a partir de isotiocianatos na presença de hidrazina.	39
Figura 13 – Derivados tiossemicarbazônicos com ação antitumoral.....	40
Figura 14 - Efeito dos derivados de LT e <i>m</i> - Amsa na inibição da topoisomerase II α humana	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados de absorção UV-Vis de derivados indol-tiossemicarbazona na ausência e presença de albumina sérica humana (HSA)	47
Tabela 2 – Absorção UV-vis dos compostos LT na presença e ausência de ssDNA	50
Tabela 3 - Dados de emissão fluorescente de complexos AO-ssDNA e DAPI-ssDNA na ausência e na presença de compostos de LT.....	53
Tabela 4 - Resultados de IC50, CC50 e IS dos derivados LT frente a DU-145 e Jurkat	56
Tabela 5 - Resultados de IC50, CC50 e IS dos derivados LT frente a MCF-7 e T-47D	58
Tabela 6 - Dados inibição da invasão com MCF-7 e T-47D	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A559** – Linhagem tumoral de câncer de pulmão
- ADT** – Terapia de castração androgênica (do inglês *Androgen Deprivation Therapy*)
- AR** – Receptor de andrógeno
- BRCA1** – Gene 1 do câncer de mama (do inglês *Breast Cancer Gene 1*)
- BRCA2** – Gene 2 do câncer de mama (do inglês *Breast Cancer Gene 2*)
- BSA** – Albumina do soro bovino (do inglês *Bovine Serum Albumin*)
- CM** – Câncer de mama
- CMI** – Câncer de mama inflamatório
- DAPI** – 4',6'-diamino-2-fenil-indol
- DC** – Dicroísmo circular
- DCV** – Doenças cardiovasculares
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- DU-145** - Linhagem tumoral de câncer de próstata
- EDBC** – Câncer de mama dependente de estrogênio
- HCT-116** – Linhagem tumoral de câncer de cólon
- HEMOPE** – Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco
- HER-2** – Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2
- HSA** – Albumina do soro humano (do inglês *Human Serum Albumin*)
- HT-29** - Linhagem tumoral de câncer de cólon
- IC50** – Inibição em 50% das células (do inglês *Inhibitory Concentration*)
- IGF** - Fator de crescimento semelhante à insulina
- INCA** – Instituto Nacional de Câncer
- IS** – Índice de Seletividade
- Jurkat** - Linhagem tumoral de leucemia
- Kb** – Constante de ligação
- kDa** – Quilodalton (do inglês *Kilodalton*)
- Ki-67** – Marcador de Proliferação Nuclear
- Ksv** – Constante de Stern-Volmer

LLA- Leucemia linfoblástica aguda

m-AMSA – Derivado de acridina Amsacrina

MCF-7 – Linhagem celular de adenocarcinoma de mama

MDA-MB-231 – Linhagem celular de carcinoma de mamário

MEC – Matriz extracelular

Multitarget – Multialvo

PDGFR – Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas

RE – Receptor de Estrogênio

RNOS – Espécie reativa de nitrogênio

ROS – Espécie reativa de oxigênio

RP – Receptor de Progesterona

RPMI – Do inglês *Roswell Park Memorial Institute*

RTK – Receptor tirosina quinase

ssDNA – DNA de espermatozoides de salmão (do inglês *salmon sperm DNA*)

T-47D – Linhagem celular de carcinoma mamário

TGF- β 1 – Fator de transformação do crescimento beta 1

TNF- α - Fator de necrose tumoral α

Topo – Enzima Topoisomerase

TSC - Tiossemicarbazonas

Tris - Tetrametilhidroxiaminometano

Trp – Aminoácido triptofano

UV-Vis – Ultravioleta-Visível

US-FDA – Administração de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos

VEGFR - Receptor do fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
3.1	CÂNCER	19
3.1.1	<i>Câncer de próstata</i>	21
3.1.2	<i>Leucemia</i>	22
3.1.3	<i>Câncer de mama</i>	23
3.1.4	<i>Células inflamatórias e o microambiente tumoral do câncer</i>	24
3.2	ALVOS TERAPÊUTICOS DO CÂNCER	26
3.2.1	DNA	26
3.2.1.1	Investigação de interações ligante-DNA	27
3.2.1.2	Investigação de interações ligante-Albumina	28
3.2.2	<i>Topoisomerase</i>	29
3.3	A QUÍMICA MEDICINAL DO PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS	31
3.3.1	<i>Estratégias e ferramentas para o planejamento de fármacos</i>	32
3.4	QUÍMICA DO INDOL	33
3.4.1	<i>Indol e câncer</i>	34
3.4.1.1	Derivados naturais	34
3.4.1.2	Derivados sintéticos	36
3.5	QUÍMICA DAS TIOSSEMICARBAZONAS	37
3.5.1	<i>Tiossemicarbazonas e o câncer</i>	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1	PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE ssDNA E ALBUMINA	41
4.1.1	<i>Espectroscopia de absorção UV-visível e fluorescência</i>	41
4.1.2	<i>Espectroscopia de fluorescência com sondas fluorescentes</i>	42
4.2	ATIVIDADE CITOTÓXICA IN VITRO	42
4.2.1	<i>Citotoxicidade em macrófagos</i>	42
4.2.2	<i>Citotoxicidade em células tumorais humana</i>	43
4.3	ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR	43

4.4	ENSAIO DE INIBIÇÃO DA TOPOISOMERASE II α HUMANA	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1	ESTUDOS DE INTERAÇÃO COM HSA	45
5.2	ESTUDOS DE INTERAÇÃO COM ssDNA	48
5.2.1	<i>Ensaio de ligação competitiva com laranja de acridina (AO) e DAPI por emissão fluorescente</i>	50
5.3	ENSAIO CITOTÓXICO IN VITRO FRENTE A LINHAGEM J774A.1	54
5.4	ENSAIO CITOTÓXICO IN VITRO FRENTE AS LINHAGENS TUMORAIS HUMANAS DU-145 E JUKART E SEU ÍNDICE DE SELETIVIDADE	54
5.5	ENSAIO CITOTÓXICO IN VITRO FRENTE AS LINHAGENS TUMORAIS HUMANAS MCF-7 E T-47D	57
5.6	ENSAIO DE3 MIGRAÇÃO CELULAR	60
5.7	ENSAIO DE INIBIÇÃO DA TOPOISONMERASE II α	61
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
7	PERSPECTIVAS	64
	REFERÊNCIAS	
	APÊNDICE A - ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV-VIS E EMISSÃO DA HSA E ssDNA COM OS DERIVADOS LT	
	APÊNDICE B – ESPECTROS DE EMISSÃO DA HSA E ssDNA COM OS DERIVADOS LT	
	APÊNDICE C – ESPECTROS DE EMISSÃO DO ssDNA COM AS SONDAS FLUORESCENTES E OS DERIVADOS LT	
	APÊNDICE D – FOTOS DA MIGRAÇÃO CELULAR	
	APÊNCIDE E – ARTIGO E PATENTE	
	APÊNDICE F – PUBLICAÇÕES PARALELAS	

1 INTRODUÇÃO

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, precedida apenas pelas doenças cardiovasculares, sendo responsável por mais de 7,6 milhões de óbitos por ano (RUSSO e SUNDARAMURTHI, 2019). Apesar de acometer pessoas de diferentes classes sociais de forma semelhante, são nos países de baixo e médio desenvolvimento que encontramos a liderança na lista de casos confirmados precedidos de mortes prematuras (TORRE et al., 2015; FERLAY et al., 2012).

Dentre as várias formas de terapia voltadas para o tratamento do câncer como a: radioterapia, cirurgia oncológica, hormonioterapia, dentre outras, a quimioterapia ainda é a mais utilizada (VIDEIRA, REIS & BRITO, 2014). Os principais antitumorais utilizados produzem seus efeitos atuando sobre o DNA, interferindo na sua replicação, transcrição e inibição da expressão gênica, o que consequentemente afeta a proliferação celular (ALI & BHATTACHARYA, 2014; DOBBELSTEIN, MOLL, 2014). Outros fármacos ainda atuam inibindo as enzimas topoisomerase, elas estão envolvidas na regulação topológica do DNA durante o processo de desenvolvimento celular, garantindo a manutenção e integridade genômica (IACOPETTA et al., 2017; WANG 2002).

Apesar dos grandes avanços no tratamento do câncer, a toxicidade e resistência aos fármacos disponíveis constitui uma das principais barreiras para a garantia de um tratamento seguro e eficaz com diminuição dos efeitos colaterais (BRANDÃO et al., 2010). Nesse contexto, a busca por novos fármacos antineoplásicos é contínua e necessária. Uma ferramenta utilizada para a identificação de substâncias biologicamente ativas é a Química Medicinal.

A Química Medicinal constitui uma ferramenta importante na descoberta e desenvolvimento de novas moléculas bioativas que possam aumentar ou melhorar a atividade desejada e minimizar ou eliminar as propriedades farmacológicas indesejáveis. Essa ciência multidisciplinar auxilia no entendimento das razões moleculares da ação dos fármacos, seu metabolismo e a determinação da relação estrutura química atividade biológica (BARREIRO & FRAGA, 2008).

O conhecimento prévio dos mecanismos bioquímicos envolvidos no processo fisiológico ou patológico, são importantes para direcionar os grupos ou porções ativas que constituirão os novos candidatos a fármacos no processo de desenvolvimento, a fim de conduzir ao potencial terapêutico desejado (DHIMAN et al., 2019).

Neste contexto, tiossemicarbazonas e o heterociclo indol apresentam-se como núcleos importantes para a resposta antitumoral, tendo vários relatos na literatura que sustentam a importância e a efetividade dessas porções em estudos citotóxicos, de intercalação com o DNA e inibição da topoisomerase (LAFAYETTE et al, 2017; ZHANG et al., 2016).

Nesta perspectiva, o presente trabalho propôs avaliar a capacidade de interação dos derivados LT com a molécula de DNA, a fim de compreender a maneira pelos quais os compostos teste podem interferir nos processos de replicação celular. Bem como sua interação com a proteína albumina sérica humana (HSA) importante para o auxílio da chegada de fármaco ao seu alvo biológico. Além de traçar o perfil antiproliferativo em linhagens celulares de próstata, leucemia e mama, e seu potencial inibidor de invasão celular e enzimático frente à topoisomerase II α .

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade de interação com o DNA e albumina humana (HSA), bem como avaliar sua ação antiproliferativa em linhagens tumorais de câncer humano.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Analisar a interação com o DNA e HSA dos derivados por meio da espectroscopia de absorção UV-visível e fluorescência;
- ✓ Analisar as interações com as sondas fluorescentes DAPI e laranja de acridina;
- ✓ Realizar ensaio de citotoxicidade em macrófagos J774-A1.;
- ✓ Realizar ensaio antiproliferativo em células tumorais humanas DU-145, Jurkat, MCF-7 e T-47D;
- ✓ Realizar ensaio de migração celular com as linhagens MCF-7 e T-47D;
- ✓ Realizar ensaio de inibição da enzima topoisomerase II α ;
- ✓ Realizar estudo de Docking molecular.

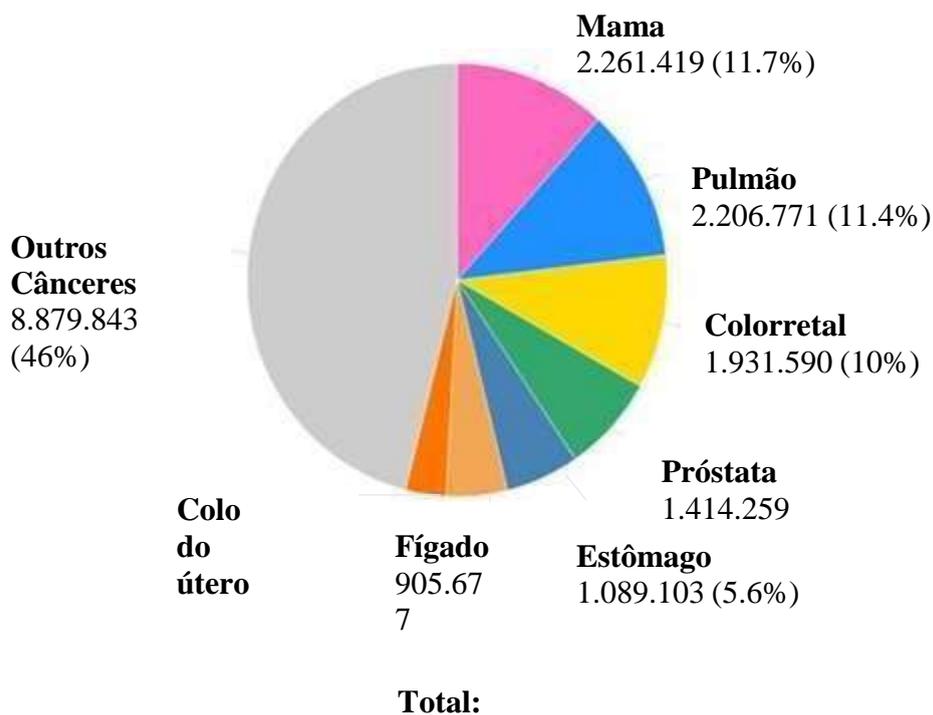
3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CÂNCER

O câncer é um complexo de doenças multifatorial, que ameaça a vida e pode aparecer nos diferentes tecidos e em qualquer parte do corpo (CORREIA et al., 2021; JEMAL et al., 2011). A nível mundial, é um dos principais contribuintes para a mortalidade, sendo precedida apenas pelas doenças cardiovasculares (DCV) (SUBIA et al., 2021; SABNIS e BIVONA, 2019).

Tendo como base os dados de 2020, a agência internacional para pesquisa em câncer (IARC), publicou no início de 2021 um relatório com a estimativa de incidência e mortalidade por câncer em todo mundo e as projeções para 2040. De acordo com o estudo haverá uma incidência de aproximadamente 19 milhões de novos casos de câncer, com 10 milhões de mortes por ano (Figura 1) (AGÊNCIA INTERNACIONAL PARA PESQUISA EM CÂNCER, 2022).

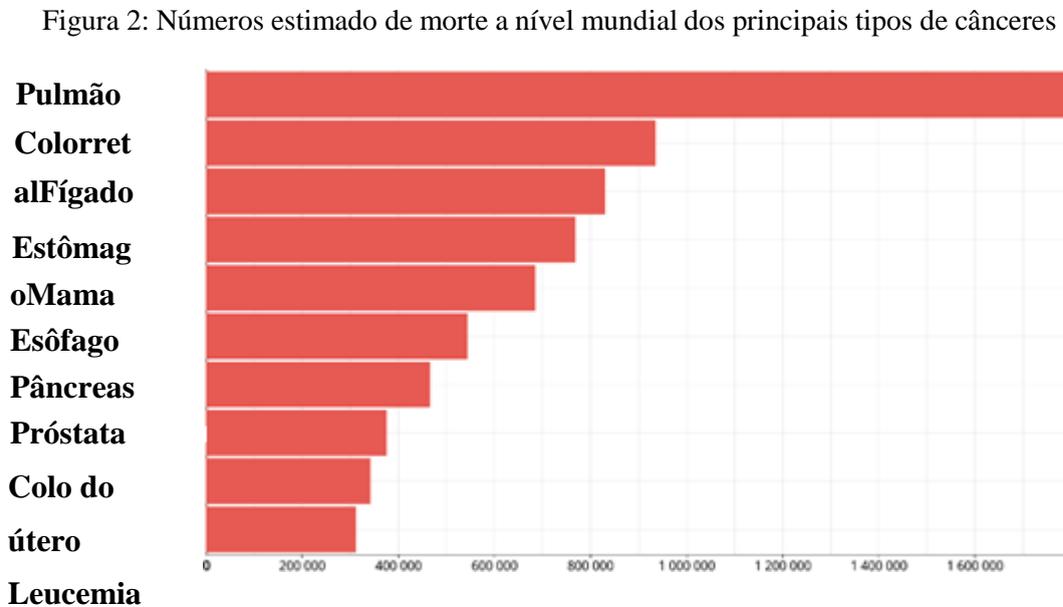
Figura 1: Estimativa de incidências de novos casos de cânceres no mundo até 2040.



Fonte: Adaptado de IARC 2022

Os principais tipos de cânceres estão relacionados com seus índices de mortalidade, estando presentes na lista, câncer de pulmão (1,76 milhão mortes/ano), colorretal (953 mil

mortes/ano), fígado (830 mil mortes/ano), estômago (783 mil mortes/ano), mama (684 mil mortes/ano) e próstata (374 mil mortes/ano) (Figura 2) (IARC 2022; OMS 2022).



Fonte: Adaptado de IARC 2021

O surgimento do tumor pode ser compreendido como a disfunção das redes de transdução de sinal (STNs) que regulam as comunicações moleculares e os processos celulares (CHEN et al., 2018) além da associação aos fatores extrínsecos como: expansão populacional e aquisição de novos hábitos cotidianos relacionados ao tabagismo, consumo de bebidas alcólicas, má alimentação, sedentarismo e exposição a fatores de risco como a radiação (TORRE et al., 2015; FERLAY et al., 2012).

Caracterizado pelo crescimento descontrolado e disseminação celular, o câncer possui capacidade de se desprender do tumor de origem, entrar na corrente sanguínea ou sistema linfático e formar neoplasias malignas secundárias em outros locais do organismo num processo conhecido como disseminação metastática (DAS et al., 2019).

A tumorigênese e o desenvolvimento do tumor dependem de uma série de capacidades biológicas adquiridas durante os estágios de progressão dos tumores humanos, que variam de acordo com cada tipo de câncer (MOSES et al., 2018). Em meados dos anos 2000, Hanahan e Weinberg sugeriram alguns pontos para o estudo funcional do câncer estabelecendo os “*hallmarks*” – traduzido como as marcas do câncer ou capacidades.

Foram identificadas dez capacidades essenciais que as células transformadas são capazes de driblar para manter sua maquinaria em pleno funcionamento, estando relacionadas com a indução da angiogênese, ativação da invasão e metástase, resistência à morte celular,

imortalidade replicativa, inibição dos fatores de crescimento e ativação da sinalização proliferativa, instabilidade genômica, capaz de gerar mutações aleatórias; a inflamação, que alimenta e acelera a tumorigênese; a epigenética e a reprogramação do metabolismo energético, responsável por impedir a destruição imune em anormalidades genéticas na iniciação da progressão do tumor (Figura 3) (HANAHAN & WEINBERG, 2011; MENYHÁRT et al., 2016).

Figura 3: Hallmarks do câncer.



Fonte: Adaptado de HANAHAN & WEINBERG, 2011

3.1.1 Câncer de próstata

A próstata é uma glândula muscular presente nos homens, formada por células musculares lisas, fibroblastos, células nervosas e células imunes em uma matriz extracelular colágena com proteoglicanos e outras proteínas da matriz que estão em contato constante entre si e com a via de sinalização receptor de andrógeno (AR) (SAFARULLA et al., 2021; LEVESQUE & NELSON 2018). Após o câncer de pulmão, o câncer de próstata é o segundo câncer masculino mais comum em todo o mundo (WANG et al., 2022), sendo responsável por 1.414.259 novos casos em 2020 (IARC 2022; OMS 2022). A agressividade da doença está no desenvolvimento lento do crescimento do tumor, que durante o estágio inicial pode ser assintomática dificultando o diagnóstico e favorecendo a rápida disseminação metastática que se dá nos ossos, pulmão e cérebro (SHAKEEL & MANOGARAN 2020). Já no estágio

avançado, a sintomatologia inclui dor ao urinar, sangue na urina e no sêmen, dor nos ossos, edema, perda de peso entre outros (HAROON et al., 2022).

Apesar de regular a diferenciação celular e atuar de forma antiproliferativa na próstata sadia, os andrógenos e receptores de andrógeno, tornam-se alterados na tumorigênese e passam a compor o eixo de sinalização pelas quais essas células promovem a formação e invasividade do tumor (KAMADA et al., 2020; CHATURVEDI & DEHM 2019). As principais vias biológicas sob controle do AR incluem proliferação e sobrevivência de células cancerígenas, resposta a danos no DNA e secreção de proteases como PSA e TMPRSS2 (SCHIEWER & KNUDSEN 2021). A terapia de privação androgênica (ADT) é um método de tratamento eficaz e continua sendo atualmente, a terapia padrão para o tratamento do câncer de próstata metastático. Um dos medicamentos padrões para o tratamento é o paclitaxel, porém já vem apresentando resistência e conseqüentemente falhas ao tratamento (LEI et al., 2020; LI et al., 2022). Assim é necessário encontrar formas de aumentar a sensibilidade do câncer de próstata à quimioterapia.

3.1.2 Leucemia

A leucemia é um dos tipos de câncer que afeta as células do sangue, resultante de uma proliferação irregular clonal de células progenitoras hematopoiéticas (LUBEGA et al., 2020; GAO et al., 2017). Dois tipos de leucócitos podem se tornar cancerosos: células mielóides, que causam a leucemia mielóide e os linfóides, que são responsáveis pela leucemia linfoblástica (ABHISHEK et al., 2022). E podem ser classificados em quatro amplos subtipos: linfoblástico agudo (LLA), mielóide agudo (LMA), linfocítico crônico (LLC) e mielóide crônico (LMC) (DAVIS et al., 2014). A leucemia aguda, tanto mielóide quanto linfóide, vem com morbidades e mortalidades significativas. Nas crianças, a leucemia linfoblástica aguda (LLA), ocorre com maior frequência e, apesar de curável na maioria das vezes através da quimioterapia prolongada, nos últimos anos tornou-se uma das principais causas de mortes em crianças e adolescentes (DECKER et al., 2020).

As leucemias agudas de origem linfóide B (LLA-B) ocorrem num percentual de probabilidade de 80 – 85% em comparação com a derivação de células T (LLA-T) que ocorre em cerca de 10 – 15% (MERCADO et al., 2020). Onde o prognóstico dos pacientes com LLA-T é mais agressivo do que os com LLA-B, devido ao risco aumentado de recidiva extramedular envolvendo o sistema nervoso central (TEACHEY & PUI 2019). O diagnóstico se dá através da punção lombar com análise do líquido cefalorraquidiano (LCR) e o tratamento padrão é

baseado em três etapas visando bilhões de células em proliferação contínua, com uso contínuo de VCAP (vincristina, ciclofosfamida, doxorrubicina, prednisolona), AMP (doxorrubicina, ranimustina, prednisolona) e VECP (vindesina, etoposido, carboplatina, prednisolona) (INABA & PUI 2021; BAZARBACHI et al., 2011). Embora a LLA seja responsiva à quimioterapia, a leucemogênese está associada a vários fatores biológicos como alterações cromossômicas do tipo aneuploidia e rearranjo, que acabam por causar falhas ao tratamento (COLLINS-UNDERWOOD & MULLIGHAN 2011), causando reações tóxicas e efeitos colaterais graves, tornando necessária a pesquisa e o desenvolvimento de novos agentes eficazes e especificamente direcionados para a quimioterapia da leucemia.

3.1.3 Câncer de mama

Um dos tipos de câncer mais prevalentes em mulheres em todo o mundo, o câncer de mama (CM), é caracterizado pelo controle hormonal de seu crescimento (PENG et al., 2022). O desenvolvimento do CM, como qualquer outra neoplasia, é um processo complexo com heterogeneidades moleculares e morfológicas que acaba por auxiliar a progressão do tumor, metástase e dificultar a ação de fármacos (GODONE et al., 2018; VENEMA et al., 2019; WANG et al., 2021). O aumento do conhecimento molecular e genético, permite classificar o câncer em pelo menos cinco subtipos moleculares diferentes: luminal A (ER+, PR±, HER2-, ↓Ki67), luminal B (ER+, PR± e HER2±, ↑Ki67), HER2 (ER-, PR-, HER2+), triplo negativo (ER-, PR-, HER2-) e basal (ER+, PR±, HER2-, ↓Ki67). Esses subtipos reagem de formas distintas ao prognóstico e a resposta ao tratamento (LIU et al., 2021; WANG et al., 2019; ROULOT et al., 2016).

Apesar da alta incidência, os pacientes afetados com o câncer de mama têm melhor sobrevida, quando comparados aos cânceres mais fatais, provavelmente pelo fato de o tecido mamário não ser um órgão necessário para a sobrevivência humana (QIU et al., 2018; FENG et al., 2018). A retirada da mama pelo processo de mastectomia e a quimioterapia melhoram muito e prolongam a vida dos pacientes, além de novos procedimentos cirúrgicos menos invasivos que têm sido aplicados para minimizar o impacto psicológico pós-tratamento (MUNIR et al., 2018; WANG et al., 2020).

No entanto, a eficiência da prevenção e do tratamento está diretamente ligada a identificação e compreensão do mecanismo de desenvolvimento e patogênese do câncer de mama, isso inclui idade e estilo de vida do paciente como por exemplo: ganho de peso e obesidade, fatores reprodutivos como menarca e menopausa, dependência de álcool ou tabaco,

predisposição genética como as mutações dos genes BRCA1 ou BRCA2, exposição à radiação, densidade mamária, hiperlipidemia ou uso de hormonioterapia, estágio e subtipo do câncer, status do receptor hormonal (LEWIN et al., 2019; CORREIA et al., 2021).

A fisiologia da mama humana é constituída por parênquima e elementos do estroma, onde o parênquima consiste em lobos e ductos com os espaços preenchidos por tecido adiposo e músculos peitorais que sustentam o tecido mamário localizado sob a mama. E o tecido estromal é formado por tecido adiposo e outros tecidos conjuntivos, que fornecem um ambiente favorável para o desenvolvimento do parênquima mamário. O câncer de mama pode se desenvolver em áreas distintas da mama, como os ductos, os lóbulos ou o tecido intermediário, tendo a sua tipologia determinada pelas células específicas afetadas, levando em consideração a origem celular envolvida. Os cânceres de mama se dividem em dois tipos: carcinomas e sarcomas, sendo os carcinomas os mais decorrentes, estes ainda podem ser classificados quanto ao componente de origem, podendo ser: lobular ou ductal, *in situ* e invasivo (FENG et al., 2018).

Vários medicamentos foram aprovados pelo US-FDA para o tratamento de neoplasias mamárias, mas o surgimento frequente de resistências leva à necessidade da busca por novos fármacos capazes de superar essa problemática (AHMED et al.; 2019).

3.1.4 Células inflamatórias e o microambiente tumoral no câncer

Em 1863, Rudolph Virchow levantou a hipótese de uma relação funcional entre inflamação e o câncer (VIRCHOW 1989). E nas últimas décadas, vários estudos tem comprovado o papel desempenhado pelo processo inflamatório na promoção do câncer (COUSSENS & WERB, 2002), visto que muitos cânceres surgem de locais de infecção, irritação crônica e inflamação (FABBRI et al., 2020).

Sabe-se que existem três principais mecanismos pelos quais as infecções podem causar câncer e eles estão relacionados com o início e a promoção da carcinogênese. O primeiro mecanismo, relaciona-se com a inflamação crônica proveniente da persistência de um agente infeccioso dentro do hospedeiro que tende a elevar os níveis de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS e RNOS respectivamente). Essas substâncias tem o potencial de danificar o DNA, proteínas e membranas celulares, além de modular a atividade enzimática e a expressão gênica, favorecendo a carcinogênese (KUPER et al., 2001).

Em segundo lugar, os agentes infecciosos podem inserir oncogenes ativos no genoma do hospedeiro inibindo a supressão do tumor ou estimulando a mitose o que resulta num

aumento no número de células em divisão sujeitas a danos ao DNA e promovendo o crescimento de células malignas. E em terceiro lugar os agentes infecciosos induzem a imunossupressão, e esse comprometimento da imunidade para o câncer resulta num quadro mais agressivo da doença (KUPER et al., 2001). Percentualmente, a inflamação crônica é responsável por cerca de 20% de todos os cânceres humano e a inflamação induzida por infecção está envolvida na patogênese de 15% a 20% dos tumores humanos.

Em resposta à lesão tecidual, durante o processo inflamatório, uma rede de sinalização celular e química se inicia afim de preparar o local para os processos reparativos, como cicatrização e regeneração do tecido afetado (CHEN et al., 2018). Isso envolve ativação e migração coordenada de diversas células do sistema imune para o local do dano, além da liberação de citocinas e quimiocinas, que proporcionam e regulam o nicho para reconstituição do microambiente normal (COUSSENS & WERB 2002).

As citocinas e quimiocinas que persistem no local da inflamação são importantes precursoras no desenvolvimento de doenças crônicas como doença de Crohn, artrite reumatóide, diabetes e o câncer (ERKOC et al., 2021). Associado à presença das citocinas pró-inflamatória TNF- α (fator de necrose tumoral α) e TGF- β 1 (fator de transformação do crescimento beta 1) que regulam positiva e negativamente os processos de inflamação e reparo, o ganho de peso e a obesidade resultam no aumento dos níveis circulantes de insulina e de IGF (fator de crescimento semelhante à insulina) que são responsáveis por estimular o crescimento das células epiteliais da mama induzindo a transformação neoplásica, principalmente nos cânceres de mama dependente de estrogênio (EDBC) (MADEDDU et al., 2014; DELORT et al.; 2015). O câncer de mama inflamatório (CMI), apesar da pouca ocorrência, cerca de 1% a 5% dos casos, é um dos tipos mais agressivos de câncer de mama, o que sugere fortemente que a inflamação pode estar ligada a esse tipo de neoplasia (FENG et al., 2018).

O microambiente tumoral pode ser definido por quatro principais fatores: 1-fatores bioquímicos (substâncias solúveis), 2- Tipos de células (imunes e fibroblastos), 3- fatores mecânicos, como fluxo de fluido intersticial e 4- Matriz extracelular (MEC). Esses fatores são responsáveis de maneira direta ou indiretamente, pela manutenção do tumor, induzindo a proliferação celular, recrutando células inflamatórias, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio levando a danos oxidativos ao DNA e reduzindo a capacidade de reparo do mesmo, bem como aumentando a demanda energética e a geração de resíduos (COUSSENS & WERB, 2002).

Dentre esses fatores é possível destacar a matriz extracelular (MEC), que juntamente com células do estroma (endoteliais, imunes, fibroblastos e adipócitos) regulam o desenvolvimento e mantêm a homeostase tecidual local, refletindo o estado fisiológico do tecido mamário (MAMMOTO & INGBER, 2010). No entanto, os tumores promovem uma modificação pós-traducionais das proteínas da MEC e alteram sua organização, histopatologia e comportamento, favorecendo a construção de um nicho tumoral distinto que leva os tumores a um fenótipo mais agressivo (PICKUP et al., 2014; MANDA et al., 2015).

Desde o início do tumor até a metástase, a MEC se adapta para reforçar a progressão da doença através da promoção dos hallmarks (WEIGELT et al., 2014; SUBIA et al., 2021). As moléculas da MEC se ligam aos receptores da superfície celular ativando as vias de sinalização intracelular. Essa sinalização modula a ação de enzimas sendo capaz de controlar o crescimento autossuficiente do tumor e limitando a indução da apoptose através da enzima p53 (PYLAYEVA et al., 2009). No entanto, a subversão dos processos de morte e/ou reparo celular é observada em tecidos cronicamente inflamados, resultando na replicação do DNA e na proliferação de células que perderam a regulação para o crescimento celular normal. Esse descontrole celular está relacionado com o fato de a inflamação crônica ser decorrente da persistência dos fatores iniciadores ou da falha dos mecanismos necessários para resolver a resposta inflamatória. O mesmo não é observado na inflamação aguda, uma vez que essa é autolimitada, tendo um equilíbrio entre a produção de citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias (COUSSENS & WERB 2002).

O conhecimento e avaliação da fisiologia do microambiente tumoral revelaram uma série de alvos moleculares prospectivos para intervenção terapêutica seletiva de agentes anticancerígenos, como a topoisomerase II α e o DNA que são alvos que estão diretamente relacionados com a atividade biológica (SAYED et al., 2015).

3.2 ALVOS TERAPÊUTICOS DO CÂNCER

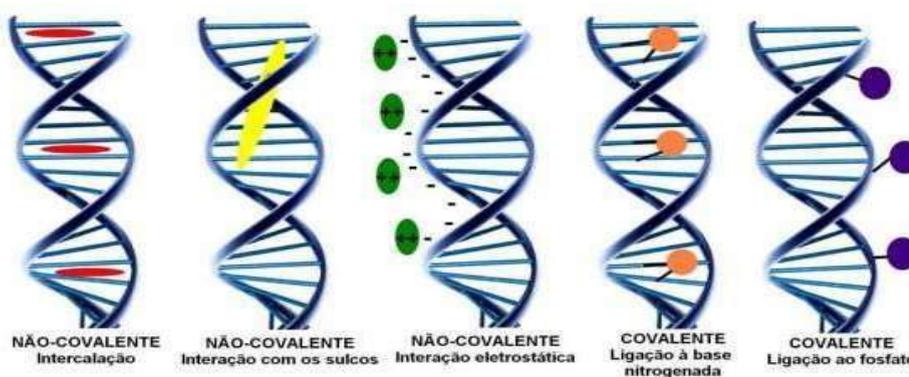
3.2.1 DNA

Um dos alvos mais promissores para a terapia do câncer é o DNA, tendo em vista que este tem papel fundamental em vários mecanismos de divisão e multiplicação celular (RIBEIRO et al., 2019). Devido ao papel que desempenha em vários processos biológicos, o DNA é tido como um alvo para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos, moléculas que se ligam ao DNA podem causar danos a estrutura primária da dupla hélice, favorecendo a introdução de novas ligações químicas, ou adutos volumosos que não se

encaixam na dupla fita padrão e conseqüentemente, essas lesões causam a quebra da fita de DNA, mutações e rearranjos cromossômicos (VODICKA et al., 2019).

O estudo da interação entre os quimioterápicos e o DNA é fundamental para entender e estabelecer o desenvolvimento de fármacos mais seletivos. As moléculas podem interagir com o DNA de formas variadas, podendo ser por atrações eletrostáticas, interações com o sulco principal do DNA, interações com o sulco menor do DNA, intercalação de pares de bases através do sulco principal do DNA, intercalação de pares de bases através do sulco menor de DNA. Além desses tipos, moléculas com duas porções intercalativas ligadas por um espaçador adequado produzem a chamada bis-intercalação (Figura 4) (STREKOWSKI & WILSON, 2007; KURUVILLA et al., 2005).

Figura 4: Representação esquemática dos modos de interação com o DNA.



Fonte: BARRA & NETO, 2015.

3.2.1.1 Investigação de interações ligante-DNA

A avaliação do modo de interação entre o fármaco e o DNA, auxiliam na proposição de agentes anticâncer por meio da elucidação de seus múltiplos mecanismos (SIRAJUDDIN et al., 2013; MAJI et al., 2014). A realização desse estudo pode ser realizada por meio de técnicas espectroscópicas de absorção, fluorescência e dicroísmo circular (DC) além da análise hidrodinâmica, a viscosidade (AHAMD et al., 2017).

Diferentes modos de ação podem ter efeitos distintos na estrutura de dupla hélice do DNA e levar a diversos efeitos fisiológicos (MARKO 2015). A técnica espectroscópica de absorção UV-vis pode ser empregada para estudar a formação do complexo composto-DNA sendo possível obter a constante de ligação (K_b), uma medida quantitativa da interação (REHMAN et al., 2015). Constantes de ligação para intercaladores típicos estão no intervalo de 10^4 a 10^6 M^{-1} e são significativamente menores do que constantes de ligação para agentes

ligantes em sulcos de DNA que variam de 10^5 a 10^9 M^{-1} (JANGIR et al., 2012; THAMILARASAN et al., 2016). Já a espectroscopia de fluorescência é capaz de inferir o tipo de interação por meio do cálculo da constante de Stern-Volmer (K_{sv}) onde observa-se o aumento ou diminuição da intensidade da fluorescência (GENG et al., 2013; BI et al., 2012).

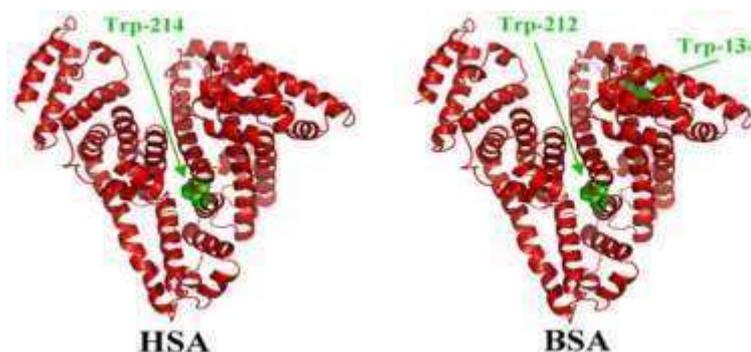
As técnicas de dicroísmo circular e viscosidade avaliam possíveis alterações estruturais capaz de explicar o porquê de determinada forma de interação fármaco-DNA, corroborando com os resultados obtidos nas espectroscopias de UV-vis e fluorescência (KASHANIAN & DOLATABADI, 2010).

3.2.1.2 Investigação de interações ligante-Albumina

As albuminas séricas são os principais constituintes protéicos solúveis do sistema circulatório e incluem 50 – 60% da quantidade total de proteínas plasmáticas (JALALI et al., 2014). A propriedade mais importante desse grupo de proteínas é a capacidade de ligar-se a uma variedade de substâncias endógenas e exógenas e realizar o seu transporte. O mecanismo de interação entre fármacos e a albumina é crucial para a determinação da farmacodinâmica e farmacocinética das substâncias no organismo (KHAN et al., 2012).

A albumina sérica bovina (BSA) é uma das mais extensivamente estudadas desse grupo de proteínas, principalmente devido à sua homologia estrutural de 76% com a albumina sérica humana (HSA) (SAMARI et al., 2012). Diferenciando-se pela presença de um triptofano (Trp-214) no subdomínio IIA na HSA, enquanto a BSA possui duas porções de triptofano (Trp-134 e Trp-212) localizadas nos subdomínios IB e IIA, respectivamente (Figura 5) (BELATIK et al. 2012).

Figura 5: Diferença estrutural da HSA e BSA.



Fonte: MOREIRA et al., 2014

As interações medicamentosas no nível de ligação à albumina são responsáveis por fornecer informações sobre a característica estrutural que determina a eficácia terapêutica, o volume de distribuição aparente da substância, sua taxa de eliminação e a fixação de limites de dose (LONG et al., 2018).

3.2.2 *Topoisomerase*

As topoisomerases foram estabelecidas como alvos moleculares para o desenvolvimento de agentes anticâncer, desde a sua descoberta em 1971 por J. C. Wang (KADAYAT et al., 2015). As topoisomerases são enzimas nucleares que transitoriamente quebram uma ou duas cadeias de DNA e permitem resolver vários problemas topológicos do DNA associados à replicação, transcrição, recombinação e outros processos celulares vitais (ISLAM et al., 2017).

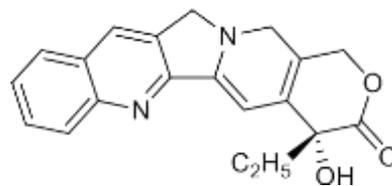
Elas classificam-se em topoisomerase I (Topo I) e topoisomerase II (Topo II), apresentando o mesmo mecanismo catalítico, sendo diferenciadas quanto ao seu mecanismo de ação, fazendo quebras de fita simples ou dupla, respectivamente (SHERER & SNAPE, 2015). No ser humano, existem isômeros de dois tipos de topoisomerase: a topoisomerase II α e topoisomerase II β (HUANG et al., 2013). A topo II α é uma enzima dependente do ciclo celular que é superexpressa em células em proliferação no final da fase S, com pico de concentração entre as fases G2 e M, sendo essencial para a conclusão da mitose, já a topoisomerase II β está presente em todas as células, sendo indispensável ao desenvolvimento celular normal, mas não é essencial para a proliferação celular (TIWARI et al., 2012).

Ambas as classes de topoisomerases foram pesquisadas como alvos terapêuticos para o tratamento do câncer, elas são expressas em diferentes níveis nos variados tipos celulares. A Topo I é reconhecida como um dos mais promissores alvos para descoberta de fármacos anticâncer por sua superexpressão em células cancerígenas (CHEN et al., 2016). Ela está presente nas linhagens celulares de câncer de colo, enquanto as topoisomerases II são mais frequentes em linhagens celulares de câncer de mama e ovário (HOLDEN et al., 1990).

O conhecimento da estrutura e importância das topoisomerases são essenciais para o desenvolvimento de agentes antitumorais mais potentes. Os inibidores de topo são utilizados na quimioterapia anticâncer, por saber que esses fármacos são capazes de formar um complexo ternário fármaco-enzima-DNA, resultando em danos irreversíveis ao DNA e destruição das células cancerígenas (DRWAL et al., 2011).

Os inibidores de Topo I podem ser de dois tipos: supressores da Topo I - que impedem o relaxamento do DNA, ou venenos topoisomerases - que estabilizam o complexo covalente intermediário, mantendo as quebras do DNA, promovendo a estagnação do ciclo celular e consequentemente levando a apoptose. Medicamentos como a Camptotecina e seus derivados já estão em uso clínico, porém, enfrentam algumas limitações como efeitos colaterais, principalmente leucopenia o que limita a dose e a eficácia dos mesmos (Figura 6) (ZHANG et al., 2016).

Figura 6: Estrutura química da Camptotecina.

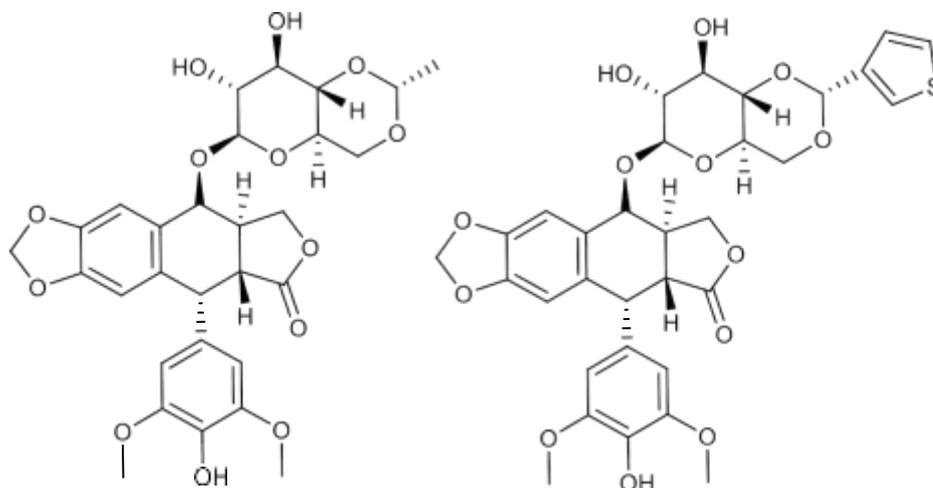


Camptotecina

Fonte: Autor (2022).

Os inibidores Topo II induzem o bloqueio pré-mitótico no final da fase S ou no início da fase G2, inibindo a função dessa enzima e consequente reparação das duas fitas de DNA que foram previamente quebradas (UESAKA et al., 2007). Fármacos como o etoposídeo e o teniposídeo foram introduzidos no tratamento clínico e tem uma participação muito importante no tratamento quimioterápico do câncer (HANDE 2008). O etoposídeo comumente causa supressão de medula óssea, náusea, vômitos e alopecia e em doses muito altas pode causar hepatotoxicidade, febre e ardor. Reações de hipersensibilidade, incluindo alterações motoras nos sistemas pulmonar e gastrointestinal. Enquanto o teniposídeo apresenta reações de hipersensibilidade, e nefrotoxicidade (Figura 7) (BRANDÃO et al., 2010).

Figura 7: Estruturas químicas do etoposídeo (esquerda) e teníposídeo (direita).



Fonte: Autor (2022).

3.3 A QUÍMICA MEDICINAL NO PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS

A Química Medicinal caracteriza-se por ser uma ciência multidisciplinar apoiada pelas ciências biológicas, química computacional, farmacologia entre outras e utiliza os conhecimentos e ferramentas de cada área para estudar as possibilidades de invenção, descoberta, desenho, identificação e preparação de fármacos (GUIDO, ANDRICOPULO & OLIVA, 2010). O principal objetivo é interpretar as razões moleculares da ação dos fármacos, seu metabolismo e a determinação da relação estrutura química atividade biológica (BARREIRO & FRAGA, 2008).

A identificação de compostos bioativos e de suas propriedades físico-químicas, são essenciais para o planejamento de fármacos, por possibilitar modificações estruturais no composto protótipo para adequação de suas propriedades biológicas afim de conduzi-las ao potencial terapêutico desejado, aumentar a seletividade em determinados receptores ou enzimas, reduzir os efeitos adversos e até mesmo otimizar a farmacocinética (NEPALI et al., 2014). O conhecimento das estruturas de alvos moleculares ou de complexos do tipo ligante-receptor, também é uma estratégia de planejamento que auxilia no desenvolvimento de um novo fármaco (GUIDO, ANDRICOPULO & OLIVA, 2010).

Vale salientar que a presença de um núcleo ou grupo farmacofórico inserido em um composto planejado não determinará efetivamente sua atividade farmacológica, uma vez que

as características intrínsecas das moléculas poderão ser influenciadas e é resultante do meio em que a molécula se insere. Porém conhecer os grupos químicos presentes num fármaco se torna importante por eles serem capazes de conduzir a manifestação de uma determinada ação biológica em razão de sua reatividade química e/ou disposição espacial, bem como modular a intensidade da ação biológica decorrente de seus efeitos característicos que exercem (GUIDO & ANDRICOPULO, 2008).

Os fármacos em geral desempenham sua ação inibindo uma enzima ou bloqueando receptores, mas para que isso aconteça é necessário que haja uma interação entre o receptor e o ligante. Diante disso, conhecer bem o alvo terapêutico que se quer modular auxilia na aplicação de estratégias de modificações moleculares para desenho de ligantes do alvo desejado (GUIDO et al., 2010). São estratégias clássicas de modificação molecular: o bioisosterismo, hibridação molecular, simplificação molecular, química computacional e combinatória, entre outras (LIMA, 2007).

A modificação molecular representa uma estratégia útil na busca de novos compostos biologicamente ativos. Este processo é capaz de melhorar as propriedades farmacocinética e farmacodinâmica (SERAFIM et al., 2014). Um dos processos de modificação molecular mais utilizado é o bioisosterismo, uma estratégia baseada nos átomos ou grupos de átomos com o mesmo número de elétrons de valência (LIMA & BARREIRO, 2005). O bioisosterismo pode ser do tipo: Clássico ou Não Clássico. Segundo a definição de Burguer, 1970, átomos ou subunidades moleculares ou grupos funcionais da mesma valência e anéis equivalentes são considerados bioisosteros clássicos, enquanto os não clássicos estão voltados para a ciclização, retroisosterismo e grupos funcionais (BURGUER, 1970). Baseado no bioisosterismo não clássico as moléculas deste presente trabalho foram planejadas.

3.3.1 Estratégias e ferramentas para o planejamento de fármacos

O surgimento das metodologias de triagem de alto rendimento (HTS) contribuiu para revolucionar todo o processo de descoberta de fármacos, tornando a identificação de novos candidatos mais eficientes (MURRAY & BLUNDELL 2010). Entre os métodos potenciais de descoberta de medicamentos os modelos FBDD (Design de medicamentos baseado em fragmentos) e o SBDD (Design de medicamentos baseado em estruturas) se apresentam como ferramentas essenciais para fornecer informações sobre as interações proteína-ligante, e assim eleger um composto líder (HAJDUK et al., 2007). Definido como aquele com maior

probabilidade de apresentar atividade terapêutica e possibilidade para servir como molde para a construção de novos análogos (WANG et al., 2021), um composto líder pode ser obtido através de análises extensas das relações estrutura-atividade e propriedades físico-químicas a fim de que o agente seja útil quando administrado em pacientes reais (SCHAFFHAUSEN 2012).

A capacidade de identificar pequenas moléculas que interagem com um alvo biológico é um passo fundamental na descoberta de medicamentos. A abordagem do tipo FBDD, se tornou mais robusta e rápida para triagem de muitos candidatos clínicos (HALL et al., 2014). Usando essa técnica, os hits ou compostos líder como são chamados, são identificados e geralmente obedecem a “Regra dos Três”, onde fragmentos de baixo peso molecular se ligam com eficiência aos ligantes devido à sua baixa complexidade (CONGREVE et al., 2003; MURRAY & REES 2009) sendo possível gerar uma nova classe de compostos partindo de um scaffold. Baseado no bioisosterismo não clássico e no processo FBDD as moléculas deste presente trabalho foram planejadas, com a finalidade de ligar-se mais especificamente ao DNA e topoisomerase, resultando em uma ação antiproliferativa eficaz.

3.4 QUÍMICA DO INDOL

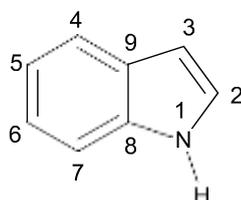
O núcleo indol é um heterociclo presente em diversos compostos naturais e sintéticos (NOREEN et al., 2017). Além de serem comercializados, uma variedade de rotas de síntese para formação do anel indol é reportada na literatura, o que possibilita aos pesquisadores escolher a melhor via de obtenção, resultando em melhores rendimentos e menor tempo de reação (JOULE et al., 2010; GORE et al., 2012).

Devido a sua versatilidade em obtenção e diversidade em atividades biológicas, esse núcleo caracteriza-se como uma estrutura privilegiada no desenho e desenvolvimento de novos fármacos (OLIVEIRA et al., 2017; ZHANG et al., 2016). A presença do indol em hormônios vegetais, alcalóides e o reconhecimento da importância do aminoácido essencial triptofano como constituinte de muitas proteínas e precursor biossintético do neurotransmissor serotonina, despertou o interesse em estudos mais aprofundados sobre a química do indol (LAFAYETTE et al., 2017; ALVES et al., 2009).

Quimicamente, o indol é formado pela fusão do benzeno ao anel pirrol, dando origem a um sistema aromático bicíclico planar com dez elétrons pi (Figura 8) (SRAVANTHI et al.,

2016). A eletrofilia e nucleofilia desse núcleo favorecem a síntese de vários derivados indólicos, levando a formação dos compostos através de adição nucleofílica e cicloadição. Essas possibilidades de sínteses contribuem para a obtenção de diversos derivados indólicos (BANDINI 2013; QUEIROZ et al., 2008).

Figura 8: Estrutura do 1*H*-benzo[b] pirrole.



Fonte: Autor (2022).

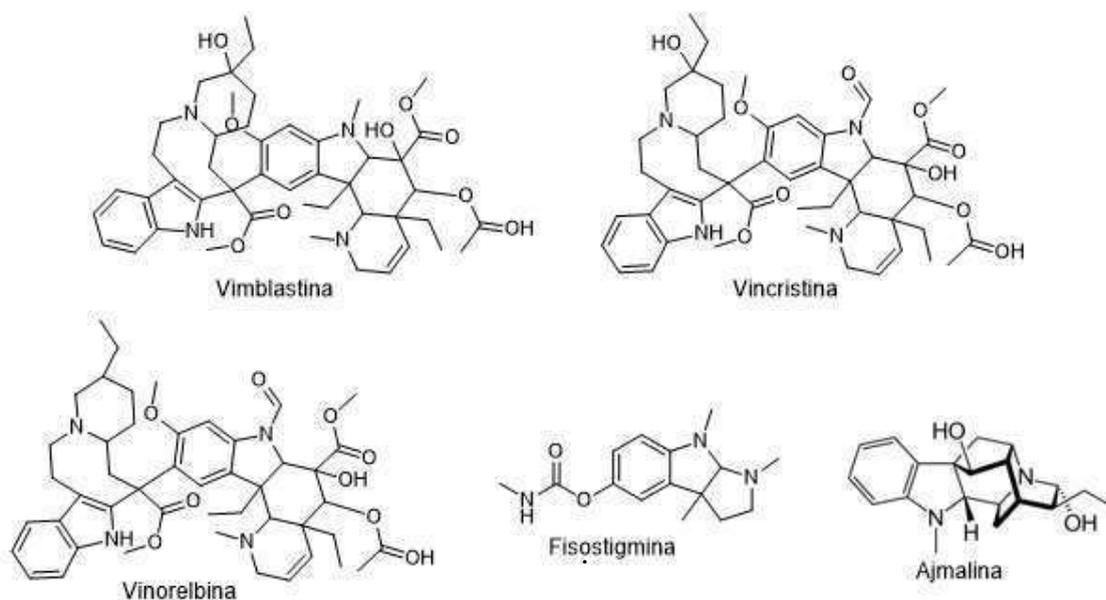
O potencial farmacológico e médico tem feito desse heterociclo um importante farmacóforo, estando presente em fármacos e protótipos a fármacos com atividades biológicas diversas como: anticancerígena (SAHA et al., 2017; SINGH et al., 2010), antibacterianas e antimicrobianas (NIKHILA et al., 2015), anti-inflamatórias (SINGH et al., 2017) e antimaláricas e citotóxicas (ABDELBASSET et al., 2018) e antituberculose (YAMUNA et al., 2012).

3.4.1 Indol e Câncer

3.4.1.1 Derivados Naturais

O 1*H*-benzo [b] pirrole é amplamente distribuído em produtos naturais como alcalóides, plantas, animais, produtos microbianos e hormônios (KAUSHIK et al., 2013). Alguns alcalóides indólicos de ocorrência natural ganharam aprovação do FDA, e estão disponíveis na clínica para o tratamento de diversas doenças como vincristina, vinblastina, vinorelbina para atividade antitumoral, ajmalina para atividade antiarrítmica e fisostigmina para glaucoma e doença de Alzheimer (Figura 9) (CHADHA et al., 2017).

Figura 9: Alcalóides indólicos com diferentes propriedades farmacológicas.

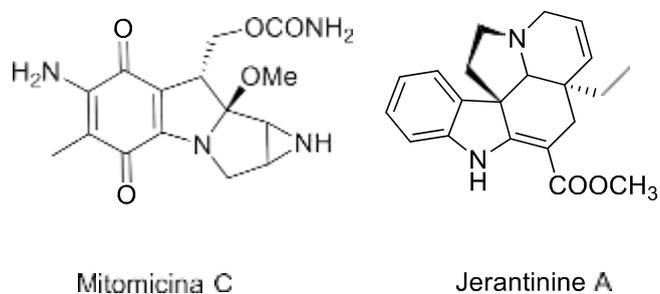


Fonte: Autor (2022).

Os agentes antimitóticos Vincristina e Vinorelbina (Figura 7) têm sido amplamente empregados no tratamento de vários tipos de câncer, incluindo doença de Hodgkin, linfoma não-Hodgkin, sarcoma de Kaposi, de mama e cânceres testiculares (ALMAGRO et al., 2015). Esses compostos são derivados da *Catharantus roseus* (*Vinca rósea*), são medicamentos citotóxicos específicos de ciclo e agem inibindo a polimerização da tubulina em células que se encontram em divisão (TAKIMOTO et al., 2009).

Outro exemplo de alcalóides indólicos anticancerígenos é a Mitomicina C e a Jenantine A. O primeiro contém um núcleo indol oxidado, e sofre ativação biorredutiva *in vivo* para formar ligações cruzadas inter e intra-cadeias com o DNA (YUTKIN et al., 2012). Já a Jerantine A, isolado da *Tabernaemontana corymbosa*, possui atividade citotóxica contra células de carcinoma nasofaríngeo resistentes à vincristina, câncer de mama (MDA-468, MCF-7), câncer de cólon (HCT-116, HT-29) e câncer de pulmão (A559) (Figura 10) (LIM et al., 2008).

Figura 10: Estrutura química dos alcalóides antitumorais Mitomicina C e Jerantine A.



Fonte: Autor (2022)

Estudos do mecanismo de ação identificaram que a Jerantine A promove a inibição da polimerização da tubulina, além de inibir de forma dose-dependente a ciclina B1 envolvida na transição G2/M (RAJA et al., 2014).

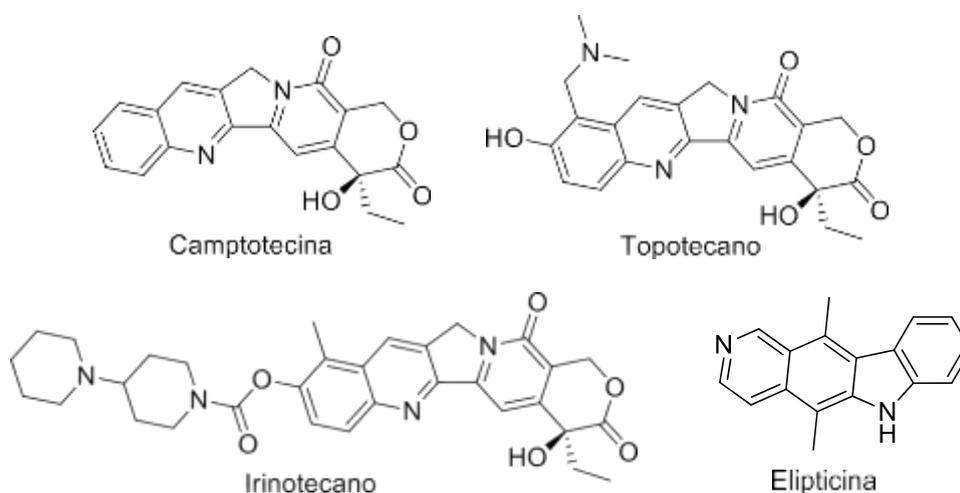
3.4.1.2 Derivados Sintéticos

O núcleo indol é precursor para a síntese de muitos produtos farmacêuticos, estando presente em mais de 200 compostos que atualmente estão em ensaios clínicos ou já estão disponíveis no comércio para atender aos pacientes (SHAMIM et al., 2019). Como exemplos, temos os medicamentos sunitinibe e o osimertinibe, que são utilizados no tratamento do carcinoma de células renais, do tumor estromal gastrointestinal (CHADA et al., 2017).

Esses compostos inibem a tirosina quinase (RTK), receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) e o receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR), interrompendo assim o estímulo na formação de novos vasos sanguíneos e consequentemente a chegada de oxigênio e nutrientes essenciais para o crescimento e proliferação do tumor (CHADA et al., 2017).

Outros alvos importantes para os indóis anticancerígenos são as histonas desacetilases (HDACs), sirtuínas, PIM quinases, receptores σ e DNA topoisomerase, sendo este último um dos alvos mais estudados na atualidade (DADASHPOUR et al., 2018). Compostos como a camptotecina e seus análogos, o topotecan, irinotecano e o belotecano, são conhecidos como venenos da Topo I (POMMIER 2006), enquanto que a elipticina possui o mecanismo de ação baseado principalmente na intercalação do DNA e/ou inibição da Topo II. A elipticina se liga a Topo II e estabiliza o complexo DNA-Topo II na sua forma desprotonada, a inibição da Topo II está associada com quebras no DNA induzidas por este fármaco (Figura 11) (CANALS et al., 2005)

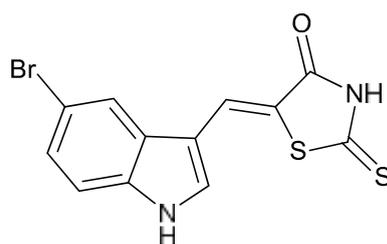
Figura 11: Estrutura química dos Inibidores da Topo I e II.



Fonte: Autor (2022).

Em estudo recente Lafayette et al. (2017) descreveram a atividade citotóxica de uma série de derivados indol-tiazolidinona frente a linhagens humana de adenocarcinoma mamário (MCF-7), carcinoma ductal de mama (T47D), leucemia aguda promielócito (HL60) e leucemia mielóide crônica (K562). Dentre os compostos testados, o derivado (LQIT/5b) apresentou atividade promissora frente a todas as linhagens testadas, se destacando nas linhagens de mama com valores de IC₅₀ de 11.72 para T-47D e de 3.65 para MCF-7 (Figura 12) (LAFAYETTE et al., 2017).

Figura 12: Derivado indol-tiazolidinona.



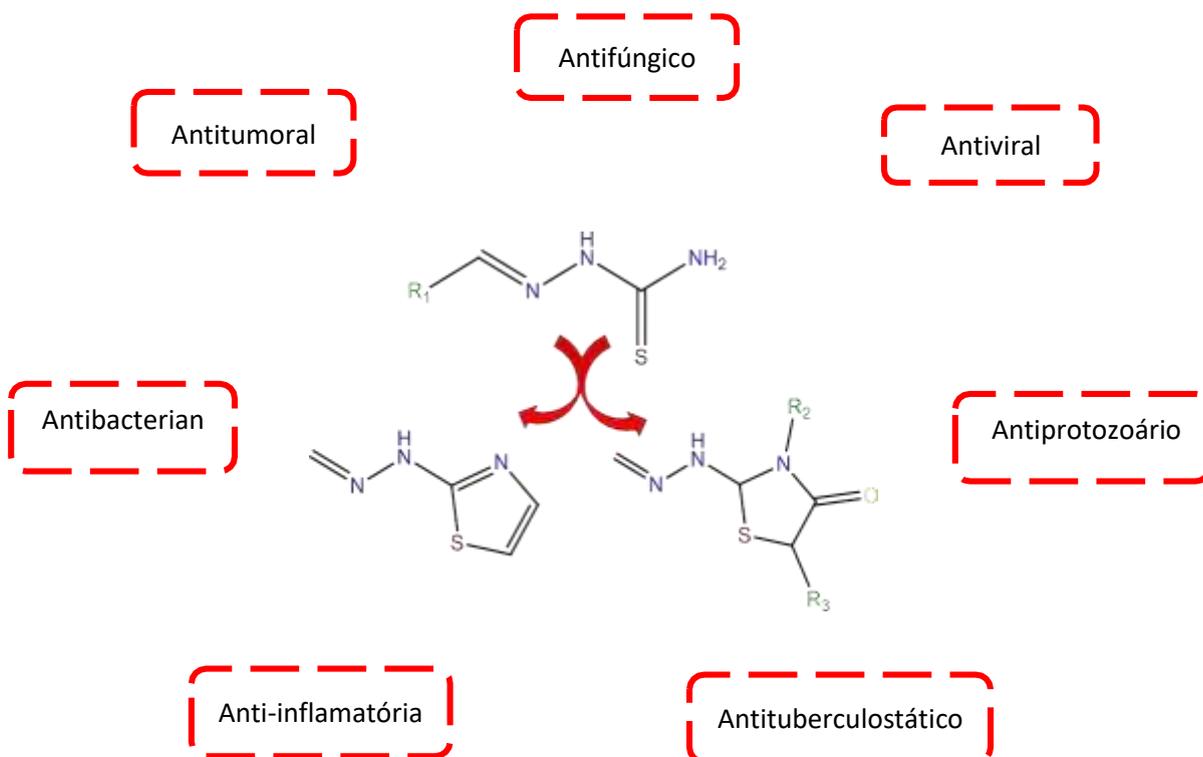
Fonte: Autor (2022).

3.5 QUÍMICA DAS TIOSSEMICARBAZONAS

As tiossemicarbazonas (TSC) constituem um importante grupo de derivados de imina cujas propriedades químicas e biológicas foram extensivamente estudadas em Química

Medicinal (ZHAO et al., 2017). As TSCs juntamente com seus bioisómeros tiazol e tiazolidinona possuem um perfil farmacológico notável, incluindo ações antifúngicas, antivirais, antitumoral entre outras (Esquema 1) (SIQUEIRA et al., 2019).

Esquema 1: Representação da tiossemicarbazonas e seus bioisómeros e suas aplicações farmacológicas.



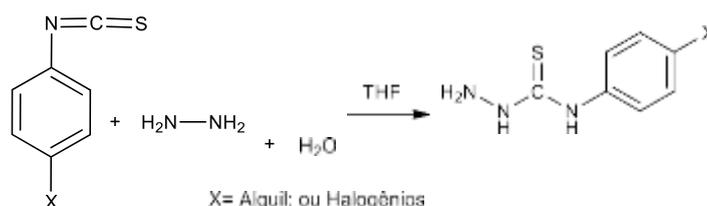
Fonte: Adaptado de SIQUEIRA et al., 2022.

E esses “scaffolds” (estrutura base) tornaram-se interessantes por sua síntese química ser acessível com baixos custos, apresentam boa reatividade e bons rendimentos sendo capazes de gerar uma série de análogos colaborando com a descoberta de novos candidatos a fármacos (SCARIM et al., 2019).

As TSC podem ser obtidas sinteticamente por duas principais vias: direta, que ocorre através da reação quimiosseletiva de aldeídos e/ou cetonas, ou indireta, através da preparação prévia das tiossemicarbazidas (TENÓRIO et al., 2005). As tiossemicarbazidas por sua vez, podem ser obtidas comercialmente, ou sinteticamente por reações de condensação entre hidrato de hidrazina e ácido tiocarbamoilglicólico, ditiocarbamatos, dissulfeto de carbono ou ainda isotiocianatos. A utilização dos isotiosianatos é mais comuns e normalmente as reações são

rápidas e apresentam bons rendimentos variando de 70- 90% (Esquema 2) (OLIVEIRA et al., 2015).

Esquema 2: Formação das tiossemicarbazidas a partir de isotiocianatos na presença de hidrazina.



Fonte: Autor (2022).

3.5.1 Tiossemicarbazonas e o Câncer

O estudo das TSCs tem se intensificado nos últimos anos devido a sua facilidade de serem encontradas em produtos naturais e sintéticos, além de sua extensa aplicação biológica, em especial a ação antitumoral. Como exemplo, temos a Triapina®, (3-aminopiridina-2-carboxaldeído-tiossemicarbazona), que se apresenta como o primeiro derivado tiossemicarbazônico com atividade anti-leucêmica, estando atualmente em ensaios clínicos de fase II como um medicamento antineoplásico (SU et al., 2018).

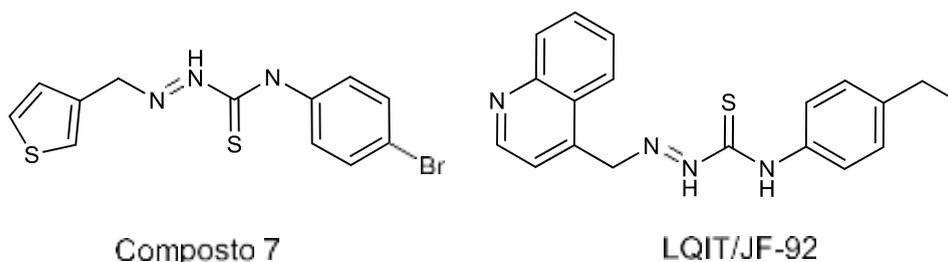
Apesar de já se apresentar em fase avançada de avaliação, os ensaios clínicos usando a Triapine® geralmente apresentam efeitos colaterais notáveis observados após a sua administração, levando a formação de metemoglobina e hipóxia. Esses problemas indicam a necessidade do desenvolvimento de outras TSCs mais ativa e seletiva com potente atividade antitumoral (SERDA et al., 2014; KUNOS et al., 2013).

A ação antitumoral também é observada em outros derivados da tiossemicarbazona que se encontra como parte constituinte de moléculas sintetizadas pelo nosso grupo de pesquisa. Em 2015, Oliveira et al., propuseram a síntese de derivados de 2-tiofeno-tiossemicarbazona e os testaram *in vitro* em um painel de nove linhagens tumorais humana: U251 (glioma); UACC-62 (células ovarianas multiresistentes); MCF-7 (mama); NCI-ADR/RES (Adenocarcinoma seroso ovariano de alto grau); 786-0 (adenocarcinoma de células renais); NCI-H460 (adenocarcinoma pulmonar não pequeno); PC-3 (próstata); HT-29 (adenocarcinoma colorretal); K-562 (leucemia). O composto mais promissor foi ativo contra todas as linhagens

celulares, exceto a leucemia (K-562), com valores de GI₅₀ (concentração necessária para inibir em 50% o crescimento celular) variando de 0,74 a 79,4 μM , esses dados foram necessários para escolher esse composto para estudos posteriores contra a linhagem celular 786-0 de tumores renais humanos, onde a exposição do composto às células após 24 horas de tratamento promoveu a letalidade de 50% das células a uma concentração de 91,8 μM (OLIVEIRA et al., 2015).

Já em 2019, Ribeiro et al., (2019) descreveram a ação de doze novos derivados de 4-quinolina-tiossemicarbazona frente a duas linhagens tumorais humana, MCF-7 e T-47D ambas linhagens de câncer de mama. O melhor composto apresentou um valor de IC₅₀ para a linhagem MCF-7 de 0,82 μM , fator determinante para conduzi-lo a teste mais específicos como a inibição da enzima topoisomerase II α , no qual, no teste de eletroforese foi capaz de observar a expressão da banda referente ao DNA enovelado (Figura 13) (RIBEIRO et al.; 2019).

Figura 13: Derivados tiossemicarbazônicos com ação antiproliferativo.



Fonte: Autor (2022)

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE ssDNA E ALBUMINA

No preparo da solução contendo ssDNA (DNA de esperma de salmão), foi utilizado tampão Tris-HCL (50M, pH 8,0). A solução de ssDNA em tampão Tris-HCL foi deixada durante 24 horas, à geladeira em temperatura de 8°C. Após este período, a solução foi sonicada durante 30 minutos e sua concentração determinada utilizando o coeficiente de extinção molar 6600 M⁻¹ cm⁻¹ a 260 nm (WOLFE et al., 1987). A pureza do DNA foi determinada através da análise do valor da relação de absorbância em 260/280 nm.

A solução de albumina foi preparada a partir da pesagem da mesma e solubilização em tampão Tris-HCl (0,1M, pH 7,4 – 7,6) a uma concentração de 1 mM.

4.1.1 Espectroscopia de absorção UV-visível e fluorescência

Os compostos foram dissolvidos em DMSO numa concentração de 1 mM (solução estoque) e as soluções para teste preparadas por diluição em tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 7,4 - 7,6) nas seguintes concentrações 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 µM. Em concentrações otimizadas (5-40 µM), os compostos foram expostos à albumina (20 µM). O sistema foi agitado e deixado à temperatura ambiente durante 10 minutos.

Os derivados, em concentração fixa de 20 µM, também foram expostos às concentrações crescentes de ssDNA (0-100 µM), e deixados à temperatura ambiente por 10 minutos. As medições das soluções de HSA-compostos e ssDNA-compostos foram realizadas em uma cubeta de quartzo retangular com um comprimento do percurso de 1cm.

A constante de ligação intrínseca (K_b) foi obtida através da equação de McGee e Von Hippel (1974):

$$[LT] / (\epsilon_a - \epsilon_f) = [LTs] / (\epsilon_b - \epsilon_f) + 1 / K_b (\epsilon_b - \epsilon_f)$$

$$[DNA] / (\epsilon_a - \epsilon_f) = [DNA] / (\epsilon_b - \epsilon_f) + 1 / K_b (\epsilon_b - \epsilon_f)$$

Onde, E_a, E_b e E_f são os coeficientes de extinção aparente, ligado e livre, respectivamente. Os gráficos da [LT]/(E_a - E_f) versus [LT] e [DNA]/(E_a - E_f) versus [DNA] foram utilizados para obtenção dos K_bs a partir da razão entre a inclinação e o intercepto. Os dados de ligação foram obtidos utilizando o software SigmaPlot 10.0.

Na fluorescência, os espectros de emissão da proteína foram obtidos entre 290 e 380 nm, utilizando 283 nm de comprimento de excitação da HSA e bandas de excitação e emissão de 5 e 2,5 nm, respectivamente. As medições também foram realizadas em cubeta de quartzo retangular e a equação para calcular a constante de Stern-Volmer (K_{sv}), foi a formulada por Lakowicz, 2006:

$$F_0 / F = 1 + K_{sv}[Q]$$

onde, F_0 e F são as intensidades de fluorescência da HSA no estado estacionário na ausência e na presença dos compostos **LT**, K_{sv} é a constante de Stern-Volmer, e $[Q]$ é a concentração de inibidor. Todos os gráficos foram construídos com o software SigmaPlot 10.0.

4.1.2 Espectroscopia de fluorescência com sondas fluorescentes

As emissões fluorescentes da laranja de acridina e DAPI foram medidas na ausência e na presença de ssDNA, a uma concentração de 3 μM de laranja de acridina e 30 μM de ssDNA e 3 μM de DAPI e 30 μM de ssDNA, após 10 min de incubação a 25 °C. As medidas foram realizadas em cubeta retangular de quartzo com trajeto de 1 cm e espectrofluorômetro JASCO FP-6300 (Tóquio, Japão). Os espectros de fluorescência do complexo AO ou AO-ssDNA foram obtidos por excitação a 526 nm e varredura da emissão de 500 a 600 nm. Soluções contendo AO-ssDNA foram analisadas na presença de várias concentrações de derivados (5, 10, 15, 20, 25 e 30 μM) em tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 8,0). Por outro lado, os espectros de fluorescência do complexo DAPI ou DAPI-ssDNA foram obtidos por excitação a 364 nm e varredura da emissão de 400 a 600 nm. Então, soluções contendo DAPI-ssDNA foram analisadas na presença de várias concentrações de derivados (5, 10, 15, 20, 25 e 30 μM) nas mesmas condições. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. As soluções foram homogeneizadas e deixadas para estabilizar por 10 min no tampão e, posteriormente, submetidas à análise de fluorescência. O comportamento de supressão de emissão foi analisado usando a equação 5 de Stern-Volmer (K_{sv}) (LAKOWICZ, 2006).

4.2 ATIVIDADE CITOTÓXICA *IN VITRO*

4.2.1 Citotoxicidade em Macrófagos

Macrófagos murino da linhagem J774A.1 foram incubados em placa de 96 poços (1×10^6 células/poço, em 100 μ L) em meio RPMI 1640 (Gibco®), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB-Gibco®) e solução de penicilina: estreptomicina (1000 UI/mL:1000 μ g/mL, 1%), e mantidos por 24h em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Como controle positivo foi utilizado a Amsacrina. Os compostos foram solubilizados em DMSO e diluídos em meio RPMI 1640 e foram testados na concentração de 50 μ M, em triplicata. Após adição dos compostos, as placas foram incubadas em estufa com 5 % de CO₂ à 37 °C por 72 horas. Passado o tempo, no dia da leitura foi adicionado 20 μ L/poço de MTT e incubado por 3h. A leitura no espectrofotômetro foi realizada a 590 nm.

4.2.2 Citotoxicidade em células tumorais humana

As células da linhagem MCF-7 (1×10^4 células/poço, em 100 μ L), T-47D (2×10^4 células/poço, em 100 μ L), DU-145 (1×10^4 células/poço, em 100 μ L) e Jurkat (1×10^5 células/poço, em 100 μ L) em meio RPMI 1640 (Gibco®), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB-Gibco®) e solução de penicilina: estreptomicina (1000 UI/mL:1000 μ g/mL, 1%), e mantidas por 24h em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Como controle positivo foi utilizado a Doxorubicina, Amsacrina e Asulacrina. Os compostos foram solubilizados em DMSO e diluídos em meio RPMI 1640 e foram testados na concentração de 50 μ M, em triplicata. Essa concentração foi escolhida como ponto de corte para os compostos que fossem capazes de inibir o crescimento de 50% da população celular. Os compostos selecionados foram testados nas concentrações de 25; 12.5; 6.25 e 3.125 μ M. Após adição dos compostos, as placas foram incubadas em estufa com 5 % de CO₂ à 37 °C por 72 horas. Passado o tempo, no dia da leitura foi adicionado 20 μ L/poço de MTT e incubado por 3h. A leitura no espectrofotômetro foi realizada a 590 nm. Os valores de IC₅₀ foram calculados utilizando leituras obtidas em três experimentos independentes.

4.3 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR

O ensaio de migração celular foi realizado com a finalidade de avaliar o potencial invasivo de tecidos vizinhos e se espalhar por todo o corpo e formar lesões metastáticas em locais distantes, conforme descrito por (LIANG et al.; 2007; ALMEIDA et al.; 2019; PIJUAN et al.; 2019) com poucas modificações. As linhagens celulares MCF-7 e T47D foram lavadas 2x usando tampão PBS para remover quaisquer detritos ou células destacadas e tripsinizadas usando solução de Tripsina-ETDA 0,25% por 2 min. Posteriormente, as células foram ressuspensas em meio RPMI suplementado com 5% de FBS, e a quantidade de 20×10^4 de cada

célula foi transferida para uma placa de 24 poços e incubada em diferentes tempos 0h, 24h e 48h a 37°C e 5% de CO₂. Após 24h a ranhura das células foi realizada com ponta estéril. A maior fenda foi medida em µm. O meio RPMI foi removido e as células destacadas foram lavadas suavemente usando solução de PBS. As linhagens MCF-7 e T-47D foram incubados com Amsacrina (*m*-Amsa) como controle positivo, e os compostos LT-76, LT-81, LT-87 em uma concentração de 1mM e 0,5mM.

A coloração do MCF-7 e T-47D foi realizada usando 0,2% de violeta de cristal em um poço de uma placa de 24 poços por 20 min em temperatura ambiente sob agitação lenta. A solução de violeta de cristal foi removida suavemente para evitar a remoção de células MCF-7, e as células coradas foram lavadas suavemente 2x usando água destilada para remover o excesso de solução de coloração. A placa de 24 poços foi seca à temperatura ambiente. A obtenção das imagens foi realizada em microscópio Motic Panthera tec MAC acoplado a uma câmera com lente 4x. O % de invasão foi calculado segundo Almeida et al. (2019). Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

$$\% \text{invasão} = [A(0) - A(t)] \times 100$$

Onde a área no tempo zero (0) e a área após o tempo de incubação (t) foram utilizadas para calcular a porcentagem de fechamento da ranhura.

4.4 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA TOPOISOMERASE II α HUMANA

Para avaliar a capacidade de inibição da enzima topoisomerase pelos compostos LT, foram utilizados 100 ng de DNA do plasmídeo pUC19 e duas unidades de topoisomerase II α humana recombinante em tampão de relaxamento (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 120 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0,5 mM ATP e 0,5 mM ditiotreitol) (ALMEIDA et al. 2015; ALMEIDA et al. 2016). Os derivados LT foram utilizados na concentração de 10 µM e incubados por 45 min, a 37°C. O mesmo procedimento foi utilizado para o controle positivo *m*-AMSA. A eletroforese em gel de agarose (0,8%) foi aplicada e o brometo de etídio utilizado para corar o gel e facilitar a visualização das bandas sob luz UV. Para análise qualitativa dessas bandas (DNA superenovelado e relaxado) foi utilizado o software de processamento de imagem (Adobe Photoshop CS4 11.0x2007, San Jose, CA, EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTUDOS DE INTERAÇÃO COM HSA

A investigação das interações de ligação entre os compostos biologicamente ativos e a HSA são importantes para determinar a disponibilidade do composto no organismo, dado que uma das principais funções das albuminas séricas é o transporte de ativos (GURUSAMY et al., 2021; CHATTERJEE et al., 2012). A fim de avaliar as mudanças estruturais em HSA provocadas pela adição dos compostos indol-tiossemicarbazonas LT70 – LT89 e determinar sua constante de ligação (K_b) e de extinção fluorescente (K_{sv}) os espectros de absorção e fluorescência foram medidos.

Os espectros de UV-vis da HSA, mostram um pico fraco de absorbância em 279 nm originado da transição $\pi - \pi^*$ correspondente aos resíduos de aminoácidos aromáticos triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe) (BASAK et al., 2021; WARSI et al., 2021). Após a adição dos derivados em concentrações crescentes (0-20 μM) foi possível observar um aumento gradual na intensidade de absorção num efeito conhecido como hipercromismo indicando a formação de um complexo entre a HSA e os compostos teste. Isso ocorre porque os resíduos dos aminoácidos aromáticos, que originalmente residem em uma cavidade hidrofóbica da proteína, são expostos ao meio permitindo que ocorra uma interação não covalente entre os compostos e a HSA (RIBEIRO et al., 2021; ZANGAR & WANI 2021; AGRAWAL et al., 2019).

A avaliação entre estrutura química e interação dos derivados com a biomacromolécula mostrou uma grande diversidade de resultados devido às variações química dos substituintes que foram utilizados para construção dos compostos LT. Porém alguns compostos se destacam por produzir efeitos singulares em relação aos demais, como no caso do composto LT72, LT74, LT83, LT87 e LT89 que promoveram o efeito hipsocrômico com uma variação de $\Delta\lambda = 1$ a 3 nm, sendo o LT72 substituído em *N*-1 pelo fenil e em *N*-4 por benzo[g], o responsável pelo maior desvio, esse comportamento indica mudanças na polaridade em torno do resíduo Trp. (HAN et al., 2012). Os outros compostos não provocaram desvios ou foram capazes de provocar o efeito do tipo batocrômico, com destaque para o LT85 que provocou o maior desvio do pico máximo de emissão $\Delta\lambda = 5$ nm. Além disso o composto LT88 foi responsável pelo maior efeito hipercrômico com valor percentual de 75,65%. Considerando os valores de K_b (Tabela 1) que revelam a intensidade da afinidade de HSA para um determinado ligante, a magnitude de ligação dos derivados LT foi de 10^5 e estão dispostas em ordem crescente: LT79<LT76<LT70<LT71<LT85<LT86<LT88<LT80<LT84<LT73<LT82<LT87<LT75<LT

83<LT78<LT77<LT72<LT81<LT74<LT89. Uma exceção é vista para o derivado LT89 que apresenta um valor de kb de $3,70 \times 10^6$.

Associado aos dados obtidos na absorção, a espectroscopia de fluorescência é uma técnica qualitativa utilizada para verificar o modo de ligação entre HSA e os compostos teste, uma vez que estes são capazes de alterar a fluorescência intrínseca das biomoléculas devido a mudanças em seus microambientes (PARVEEN et al., 2021; BARMA et al., 2022). Essa avaliação do modo de ligação é um importante parâmetro, para controlar a resposta farmacológica dos fármacos e definir o desenho das formas farmacêuticas (RAJA et al., 2012). O estudo de ligação é frequentemente realizado usando a metodologia de supressão fluorescente (KUMAR et al., 2019), que pode ocorrer de forma dinâmica ou estática (BAGHERI & FATEMI 2018) de acordo com a dependência da interação entre biomacromolécula e dos compostos em diferentes temperaturas, ou pela detecção do tempo de vida de fluorescência (ZHAO et al., 2017). Em geral a forma dinâmica ocorre em altas temperaturas pois permite a difusão e colisão de maneira mais rápida entre as moléculas e conseqüentemente eleva a constante de extinção molar. Por outro lado, o oposto pode ser observado para a extinção do tipo estática (LI & YANG, 2015), como no perfil observado para a maioria dos compostos LT.

Tabela 1: Dados de absorção UV-Vis de derivados indol-tiossemicarbazona na ausência e presença de albumina sérica humana (HSA).

Composto	ABSORÇÃO						FLUORESCÊNCIA							
	λ_{max} livre (nm) ^a	λ_{max} ligado (nm) ^a	$\Delta\lambda$ (nm)	Hiperc. (%) ^b	Kb M ⁻¹ c	R ² d	λ_{ma} x livre (nm) a	λ_{max} ligado (nm) a	$\Delta\lambda$ (nm)	Bandas (nm) Exc_Emi	Hiperc. (%) ^b	Hipocr. (%) ^b	Ksv M ⁻¹ c	R ² d
LT-70	279	280	1	19,61	1,51 x 10 ⁵	0,9993	338	329	9	5_2,5	-	40,86	2,28 x 10 ⁴	0,9900
LT-71	279	279	-	42,56	1,64 x 10 ⁵	0,9976	338	338	-	5_2,5	-	44,53	0,92 x 10 ⁴	0,9936
LT-72	279	275	4	56,61	4,81 x 10 ⁵	0,9997	338	338	-	5_2,5	-	34,08	1,92 x 10 ⁴	0,9972
LT-73	279	283	4	50,03	3,13 x 10 ⁵	0,9974	338	341	3	5_2,5	-	32,22	1,21 x 10 ⁴	0,9937
LT-74	279	278	1	57,62	5,49 x 10 ⁵	0,9988	338	338	-	5_2,5	-	89,96	3,43 x 10 ⁴	0,9935
LT-75	279	279	-	33,12	3,69 x 10 ⁵	0,9999	338	338	-	5_2,5	-	77,39	3,35 x 10 ⁴	0,9938
LT-76	279	279	-	45,68	1,21 x 10 ⁵	0,9847	338	335	3	5_2,5	15,47	-	0,76 x 10 ⁴	0,9931
LT-77	279	280	1	37,06	4,66 x 10 ⁵	0,9990	338	330	8	5_2,5	-	29,80	2,10 x 10 ⁴	0,9901
LT-78	279	280	1	37,18	4,08 x 10 ⁵	0,9998	338	330	8	5_2,5	-	68,28	2,20 x 10 ⁴	0,9944
LT-79	279	279	-	42,00	1,00 x 10 ⁵	0,9995	338	329	9	5_2,5	-	98,53	1,09 x 10 ⁴	0,9908
LT-80	279	282	3	46,48	2,95 x 10 ⁵	0,9966	338	338	-	5_2,5	-	45,69	1,73 x 10 ⁴	0,9926
LT-81	279	280	1	49,02	5,37 X 10 ⁵	0,9996	338	329	9	5_2,5	-	76,50	1,02 x 10 ⁴	0,9901
LT-82	279	280	1	35,10	3,14 x 10 ⁵	0,9952	338	329	9	5_2,5	-	96,21	1,75 x 10 ⁴	0,9930
LT-83	279	278	1	55,70	4,07 x 10 ⁵	0,9993	338	329	9	5_2,5	-	110,77	2,37 x 10 ⁴	0,9914
LT-84	279	279	-	56,73	2,97 x 10 ⁵	0,9973	338	330	8	5_2,5	-	55,83	2,02 x 10 ⁴	0,9941
LT-85	279	284	5	34,78	1,82 x 10 ⁵	0,9957	338	329	9	5_2,5	-	43,01	2,18 x 10 ⁴	0,9923
LT-86	279	283	4	36,98	2,02 x 10 ⁵	0,9959	338	339	1	5_2,5	-	19,99	0,87 x 10 ⁴	0,9843
LT-87	279	278	1	37,55	3,15 x 10 ⁵	0,9998	338	338	-	5_2,5	0,14	-	1,17 x 10 ⁴	0,9958
LT-88	279	282	3	75,65	2,52 x 10 ⁵	0,9930	338	359	21	5_2,5	-	100,62	3,55 x 10 ⁴	0,9929
LT-89	279	278	1	60,37	3,70 x 10 ⁶	0,9999	338	368	30	5_2,5	-	94,75	2,34 x 10 ⁴	0,9922

^aDados referentes à absorbância dos compostos na presença e ausência de diferentes concentrações da HSA (2-40 μM).

^bHipercromismo e hipocromismo resultante da formação de um complexo entre HSA e derivados de LTs em comparação com compostos livres.

^cConstante de ligação (Kb) obtida com base na absorbância dos compostos na presença de diferentes concentrações do ssDNA (10-100 μM).

^dCoefficiente de correlação.

Durante a titulação dos compostos LT70 – LT89 com HSA, foi possível observar algumas alterações na intensidade máxima de fluorescência em 338 nm. Com a adição dos compostos, com exceção do LT76 e LT87, ocorreu uma diminuição da fluorescência, sugerindo que o sítio de ligação dos compostos LT ocorra próximo ao resíduo de triptofano-214 localizado no subdomínio IIA da HSA (HUANG et al., 2016). Além de que a extinção pode ser uma consequência de uma variedade de interações moleculares como transferência de energia ou extinção por colisão e reações do estado excitado e/ou fundamental (KUMAR et al., 2019; YASREBI et al., 2019). Por outro lado, os compostos LT76 e LT87 promoveram um aumento na emissão da fluorescência, refletindo que a adição desses compostos promove um microambiente menos polar em torno do triptofano e que nesse caso possivelmente a emissão fluorescente seja atribuída ao resíduo de tirosina (ARJMAND et al., 2010).

Os percentuais de hipocromismo ficaram entre 29,80 e 110,77%, com o maior percentual para o LT83. Todos os valores da constante de supressão fluorescente (K_{sv}) da HSA pelos derivados LT foram na magnitude de 10^4 , na seguinte ordem crescente: LT86<LT71<LT81<LT79<LT73<LT80<LT82<LT72<LT84<LT77<LT85<LT78<LT70<LT89<LT83<LT75<LT74<88. E valores de hipercromismo de 0,14 para o LT87 e de 15,47 para o LT76. Os dados de extinção fluorescente foram tratados usando a conhecida equação de Stern-Volmer (HU et al., 2010) e estão dispostas na Tabela 1.

5.2 ESTUDOS DE INTERAÇÃO COM ssDNA

A espectroscopia de absorção pelo UV-vis é uma técnica amplamente utilizada para determinar a constante de ligação intrínseca (K_b) obtida pela formação do complexo entre macromoléculas e drogas e que podem ser monitoradas pelas mudanças nos espectros de absorção (DUSTKAMI & TORSHIZI 2017; CHAURASIA et al., 2019). Essa técnica permite identificar a compatibilidade com o sistema biológico e as formas pela qual um composto pode se ligar ao DNA, sendo elas a substituição por pares de bases, interações não covalentes, como eletrostática e intercalação ou ainda ligação aos sulcos (AMEEN et al., 2022).

As moléculas ao interagirem com o DNA, promovem alterações na distribuição eletrônica e nos níveis de energia das moléculas que são UV-vis ativas (NIMAL et al., 2020). Com isso mudanças na absorbância e na posição das bandas são esperadas, sendo possível prever o modo de ligação entre moléculas e o DNA, salientando que quanto maior for o efeito hipercrômico ou hipsocrômico maior é a interação entre um composto e o DNA (DEHNA YEBI

et al., 2021; YANG et al., 2017). Os compostos LT70 – LT89 quando expostos a concentrações crescentes de ssDNA (Tabela 2) foi observado, para a maioria deles, um aumento na absorvância acompanhado de desvio do pico máximo para a região do vermelho, no efeito conhecido como batocrômico. Tendo o derivado LT83 exibido o maior efeito hipercrômico com 60,79% e o LT84 o maior desvio batocrômico com variação de $\Delta\lambda = 06$ nm. Para outros compostos como o LT70, LT72, LT77, LT79, LT86 e LT87, houve um desvio hipocrômico, onde o LT77 apresentou a maior variação de $\Delta\lambda = 3$ nm. Esse tipo de comportamento é típico de interações não covalentes entre os compostos e o DNA, que é capaz de promover danos na dupla hélice e quebras da estrutura secundária do DNA (SHI et al., 2017; DORRAJI & JALALI, 2015).

Mudanças hipocrômicas foram observadas nos espectros dos compostos LT71, LT75, LT78, LT85 e LT88 associado ao desvio batocrômico, resultante da interação de empilhamento π - π entre os anéis aromáticos dos compostos e os pares de base do DNA. Esse comportamento geralmente está associado a agentes intercalantes, bem como indicativo de ligação eletrostática devido a estabilidade do complexo com o DNA (KHAJEH et al., 2018; QAIS & AHMAD 2018). Para esse conjunto de moléculas o LT71 apresentou o maior percentual de hipocromismo com 51,33% e o maior desvio batocrômico com variação de $\Delta\lambda = 04$ nm. Os resultados de todos os compostos podem ser verificados na tabela 2. Levando em consideração os valores de K_b (Tabela 2), que revela a intensidade da afinidade do ssDNA para um determinado ligante, a ordem crescente foi a seguinte: $LT75 \leq LT79 < LT71 < LT76 < LT74 < LT83 < LT87 < LT82 < LT85 < LT84 < LT81 < LT78 < LT89 < LT70 < LT73 < LT86 < LT72 < LT80 < LT77 < LT88$. Portanto, o derivado LT88 apresentou a maior constante de afinidade com o ssDNA em relação aos demais, com valor de $1,05 \times 10^6$ M⁻¹.

Tabela 2: Absorção UV-vis dos compostos LT na presença e ausência de ssDNA.

Compostos	$\lambda_{\text{máx livre}}$ (nm) ^a	$\lambda_{\text{máx ligado}}$ (nm) ^a	$\Delta\lambda$ (nm) ^a	Hiper(%) b	Hipo(%) ^b	Kb (M ⁻¹) ^c	R ^{2d}
LT-70	313	312	01	10,03	-	4.39 x 10 ⁵	0,9939
LT-71	308	312	04	-	51,33	6.10 x 10 ⁴	0,9928
LT-72	323	322	01	20,33	-	4.62 x 10 ⁵	0,9904
LT-73	323	324	01	28,81	-	4.56 x 10 ⁵	0,9929
LT-74	335	336	01	20,52	-	8.12 x 10 ⁴	0,9950
LT-75	345	346	01	-	21,63	6.04 x 10 ⁴	0,9924
LT-76	480	482	02	14,00	-	6.49 x 10 ⁴	0,9904
LT-77	336	333	03	38,65	-	9.89 x 10 ⁵	0,9973
LT-78	334	334	-	9,87	-	2.32 x 10 ⁵	0,9939
LT-79	344	343	01	43,45	-	6.04 x 10 ⁴	0,9923
LT-80	328	328	-	12,61	-	7.65 x 10 ⁶	0,9981
LT-81	309	311	02	49,98	-	2.04 x 10 ⁵	0,9944
LT-82	328	331	03	23,78	-	1.30 x 10 ⁵	0,9928
LT-83	323	325	02	60,79	-	1.02 x 10 ⁵	0,9922
LT-84	339	345	06	40,39	-	1.62 x 10 ⁵	0,9962
LT-85	337	337	-	-	31,21	1.45 x 10 ⁵	0,9934
LT-86	320	319	01	36,04	-	4.73 x 10 ⁵	0,9906
LT-87	321	320	01	14,77	-	1.10 x 10 ⁵	0,9940
LT-88	313	314	01	-	15,62	1.05 x 10 ⁶	0,9927
LT-89	331	331	-	11,54	-	3.65 x 10 ⁵	0,9926

^aDados referentes à absorvância dos compostos na presença e ausência de diferentes concentrações do ssDNA (10-100 μM).

^bHipercromismo e hipocromismo resultante da formação de um complexo entre ssDNA e 20 μM de derivados de LTs em comparação com compostos livres.

^cConstante de ligação (Kb) obtida com base na absorvância dos compostos na presença de diferentes concentrações do ssDNA (10-100 μM).

^dCoefficiente de correlação.

5.2.1 Ensaio de ligação competitiva com Laranja de acridina (AO) e DAPI por emissão fluorescente

Para obter mais evidências sobre o modo de ligação dos compostos LT ao ssDNA, foi realizado experimentos com sondas fluorescentes com modos de ligação bem conhecidos, como a laranja de acridina (AO) e 4'-6-diamina-2'-fenilindol (DAPI). Essas sondas exibem maior fluorescência quando ligadas à hélice de DNA do que em contato com moléculas de solvente (AFRIN et al., 2017), por isso a dedução do modo de ligação dos compostos é possível. A molécula deve ser capaz de deslocar competitivamente a sonda ligada ao DNA, ocupando assim o seu lugar e conseqüentemente promovendo alterações na intensidade de fluorescência que pode ser medida (CHAKRABORTY et al., 2019).

A laranja de acridina é um tipo de corante catiônico, muito utilizado como sonda fluorescente e que se liga ao DNA de forma intercalativa (XIONG et al., 2014; ZHANG et al., 2012). Devido à sua geometria aromática planar, a AO pode se inserir entre dois pares de bases adjacentes em uma hélice de DNA (LIU & SADLER 2011) resultando na emissão da fluorescência entre o complexo AO-DNA. Em geral, a intensidade de emissão fluorescente do complexo AO-DNA é muitas vezes maior do que AO livre. No teste de competição, as moléculas provocam o deslocamento da sonda, e com isso é esperado uma diminuição da intensidade de fluorescência do sistema AO-DNA (TIAN et al., 2017).

Em consonância com o descrito na literatura (REHMAN et al., 2015; LONG et al., 2014), no ensaio de competitividade, os derivados indol-tiossemicarbazonas (LT70 – LT89), foram capazes de reduzir a intensidade da emissão fluorescente do complexo AO-DNA gradativamente com o aumento da concentração dos compostos. Indicando que os compostos LT podem ter se inserido entre os pares de bases do ssDNA e substituído o AO no complexo AO-DNA. Também é possível observar que não houve mudança significativa na posição do pico revelando que o microambiente de AO-DNA permaneceu inalterado após a adição dos compostos LT. As constantes de intercalação dos compostos estão entre o intervalo de 10^3 a 10^5 M^{-1} como disposto em ordem crescente: LT71<LT73<LT85<LT84<LT77<LT83<LT75<LT78<LT74<LT86<LT88<LT79<LT70<LT87<LT82<LT81<LT89<LT76<LT72<LT80. Estando de acordo com o enunciado por (ALMEIDA et al., 2017), em que descreve o intervalo compreendido entre 10^4 a 10^6 M^{-1} como o das constantes de ligação para intercaladores típicos. Todos os resultados estão dispostos na Tabela 3.

Semelhante ao AO, foi realizado o ensaio de competição com o DAPI, uma sonda ligante do sulco menor, que se liga nas regiões ricas em A-T do DNA de dupla fita (YANG et al., 2020; LIU et al., 2015). A titulação de DAPI com concentração crescente de complexo mostra, na maioria dos compostos, uma extinção da intensidade de emissão de DAPI ligada a ssDNA a 470 nm. O que sugere que os compostos LT também são capazes de ligar-se ao sulco menor do ssDNA. Comparando os valores de K_{sv} (Tabela 3) obtidos para AO-DNA e DAPI-DNA, podemos inferir que existe uma variação significativa nos valores das constantes de extinção, principalmente na presença dos compostos LT. Esta variação pode ser atribuída a uma preferência pela interação do tipo intercalativa do que pela ligação ao sulco menor e esses dados estão de acordo com aqueles obtidos por UV-vis. E posteriormente poderá ser comprovado por cálculos de docking molecular.

Diferentemente dos outros compostos da série LT, os derivados LT70, LT87 e LT88 não foram capazes de diminuir a intensidade de emissão fluorescente, levando a conclusão que o modo de ligação desses compostos não se faz pelo sulco menor do DNA. A fraca ligação dos compostos LT ao complexo DAPI-DNA são comprovadas pelas constantes de ligação se encontram na magnitude de 10^3 e 10^5 M^{-1} , muito diferente do que é relatado na literatura em que a magnitude fica em torno de $10^5 - 10^9 \text{ M}^{-1}$ (ALMEIDA et al., 2017; IHMELS & OTTO 2005). Os valores de K_{sv} encontram-se em ordem crescente: LT88<LT87<LT89<LT86<LT84<LT71<LT74<LT70<LT77<LT81<LT78<LT76<LT75<LT85<LT80<LT82<LT72<LT73<LT83<LT79.

Tabela 3: Dados de emissão fluorescente de complexos AO-ssDNA e DAPI-ssDNA na ausência e na presença de compostos de LT.

FLUORESCÊNCIA											
Composto	AO					DAPI					
	λ^{max} livre (nm) ^a	λ^{max} ligado (nm) ^a	Hipocr. (%) ^b	Ksv M ⁻¹	R ²	λ^{max} livre (nm)	λ^{max} ligado (nm) ^a	Hipercr. (%) ^b	Hipocr. (%) ^b	Ksv M ⁻¹	R ²
LT-70	528	527	86,20	5,96 x 10 ⁴	0,9922	470	471	16,93	-	1,92 x 10 ⁴	0,9916
LT-71	528	526	4,67	7,80 x 10 ³	0,9912	470	474	-	9,63	1,79 x 10 ⁴	0,9838
LT-72	528	530	154,60	1,28 x 10 ⁵	0,9925	470	475	-	61,68	4,52 x 10 ⁴	0,9903
LT-73	528	527	1,66	7,90 x 10 ³	0,9923	470	473	-	98,53	6,26 x 10 ⁴	0,9899
LT-74	528	527	76,02	3,47 x 10 ⁴	0,9970	470	476	-	26,17	1,81 x 10 ⁴	0,9956
LT-75	528	525	100,00	3,08 x 10 ⁵	0,9917	470	474	-	68,40	2,80 x 10 ⁴	0,9860
LT-76	528	526	224,04	9,50 x 10 ⁴	0,9945	470	473	-	20,12	2,77 x 10 ⁴	0,9921
LT-77	528	526	30,80	2,57 x 10 ⁴	0,9863	470	470	-	57,05	2,03 x 10 ⁴	0,9939
LT-78	528	528	71,02	3,30 x 10 ⁴	0,9960	470	473	-	57,34	2,67 x 10 ⁴	0,9911
LT-79	528	526	100,00	4,92 x 10 ⁴	0,9908	470	471	-	138,93	9,68 x 10 ⁴	0,9901
LT-80	528	527	239,39	1,69 x 10 ⁵	0,9897	470	479	-	62,60	3,46 x 10 ⁴	0,9832
LT-81	528	528	113,28	7,86 X 10 ⁴	0,9902	470	478	-	50,27	2,25 x 10 ⁴	0,9908
LT-82	528	527	123,68	7,29 x 10 ⁴	0,9876	470	483	-	100,00	4,27 x 10 ⁴	0,9903
LT-83	528	527	9,67	3,01 x 10 ⁴	0,9867	470	474	-	179,66	9,01 x 10 ⁴	0,9932
LT-84	528	527	52,60	1,46 x 10 ⁴	0,9940	470	479	-	15,18	1,78 x 10 ⁴	0,9916
LT-85	528	528	21,85	1,33 x 10 ⁴	0,9960	470	467	-	48,02	2,88 x 10 ⁴	0,9901
LT-86	528	527	54,29	3,82 x 10 ⁴	0,9890	470	475	-	16,14	1,15 x 10 ⁴	0,9921
LT-87	528	527	107,93	6,14 x 10 ⁴	0,9903	470	472	3,61	-	5,20 x 10 ³	0,9940
LT-88	528	527	56,68	4,39 x 10 ⁴	0,9907	470	479	3,82	-	3,90 x 10 ³	0,9935
LT-89	528	527	135,43	8,30 x 10 ⁴	0,9925	470	474	-	9,20	7,70 x 10 ³	0,9971

^aDados referentes ao perfil emissivo do complexo AO-ssDNA e DAPI-ssDNA em diferentes concentrações dos compostos teste (3-30 μ M).

^bHipercromismo e hipocromismo resultante da formação de um complexo entre HSA e derivados de LTs em comparação com compostos livres.

^cStern- constante de supressão de Volmer (Ksv) obtida com base em dados de fluorescência com ssDNA.

^dCoefficiente de correlação.

5.3 ENSAIO CITOTÓXICO *IN VITRO* FRENTE A LINHAGEM J774A.1

Todos os compostos sintetizados (LT70 ao LT89) foram avaliados *in vitro* quanto a sua citotoxicidade. O teste realizado em macrófagos J774 revelou que os compostos apresentaram resultados citotóxicos distintos, sendo menos citotóxicos que a *m*-Amsa que obteve valor de CC50 3.11| 2.86. Os compostos da série apresentam uma variação citotóxica de 7.0±0.6 a > 75 µM, onde é possível destacar os compostos LT73, LT75, LT77, LT80, LT82, LT83, LT85, LT86 e LT88, que apresentaram CC50 maior do que 75 µM, sugerindo que esses compostos têm baixa toxicidade em células normais.

Os demais compostos apresentam uma citotoxicidade variando entre 38.7±3.9 a 60|4.3µM, indicando uma citotoxicidade mediana. Dentre os compostos o LT78 apresentou CC50 de 7.0 ± 0.6 µM, sendo este o composto mais tóxico da série, ainda assim, este é duas vezes menos citotóxico que o fármaco padrão. Aparentemente essa elevada citotoxicidade pode ser atribuída a presença do *p*-Cl no fenil, uma vez que seu análogo o LT73 não apresenta substituição no fenil e obteve uma CC50 de 79.4 3.0. Os resultados de todos os compostos são apresentados na(Tabela 4).

5.4 ENSAIO CITOTÓXICO *IN VITRO* FRENTE AS LINHAGENS TUMORAIS HUMANAS DU-145 E JUKART E SEU ÍNDICE DE SELETIVIDADE

Os efeitos citotóxicos provocados pelos derivados indol-tiossemicarbazonas (LT70-LT89) no tratamento das células tumorais humanas de câncer de próstata (DU-145) e leucemia (Jurkat), em sua maioria, foi inferior ao observado após o tratamento com os compostos padrão *m*-Amsa, Dox e Asul. No entanto os compostos LT76, LT77 e LT87 atuaram citotoxicamente de forma semelhante para ambas as linhagens.

Na DU-145, os compostos apresentam valor de IC50 variando de 0.94±0.05 µM a 1.72±0.50 µM, onde os derivados que se apresentaram como os mais ativos da série para essa linhagem são o LT77 (0.94±0.05) e LT87 (0.94±0.12) que diferem entre si apenas pela substituição em *N*-1 da tiossemicarbazona que ocorre pelo *p*-Cl-fenil e pelo alil respectivamente. Pelo o que se observa, a substituição em *N*-4 da tiossemicarbazona de caráter hidrofóbico do substituinte benzo [g], parece contribuir com as respostas citotóxicas, uma vez que os compostos LT72 (1.13±0.12) e LT82 (1.62±0.04), também apresentaram bons desempenhos. No entanto, ao manter o benzo [g] e inserir os grupos hidrofóbicos fenil (LT72)

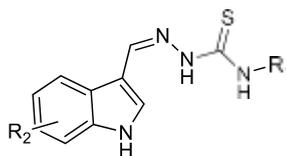
e 1-naftil (LT82) na posição *N*-1 da tiossemicarbazona não se observa melhora da resposta citotóxica.

Já a inclusão de grupos retiradores de elétrons ao mesmo tempo nas posições *N*-1 e *N*-4 da tiossemicarbazona, como ocorre no LT76 em que ele é substituído por *p*-Cl-fenil e 4-NO₂ favorecem a atividade citotóxica tendo o composto citado uma IC₅₀ de 0.98±0.10 μM. No entanto essa mesma contribuição não é observada quando da ocorrência da substituição em apenas uma porção da molécula como pode ser conferido na Tabela 4.

Para a linhagem leucêmica Jurkat, os derivados LT70 - LT89 apresentaram valores inibitórios significativos, tendo vários compostos como o LT76, LT77, LT78, LT80, LT86, LT87 e LT89 apresentado valor de IC₅₀ menor ou semelhante estatisticamente aos fármacos padrões. Os compostos (LT76 - LT79) substituídos em *N*-1 da tiossemicarbazona pelo *p*-Cl-fenil, com seu efeito eletrônico -I e +M, sendo considerado um fraco retirador de elétrons, conferiu a esse conjunto de moléculas valores de IC₅₀ variando entre 1.18±0.08 μM a 1.64±0.06 μM. Tendo destaque os compostos LT76 com IC₅₀ de 1.23±0.32 μM, e o LT77 com IC₅₀ de 1.18±0.08 μM que foram menores que os valores de IC₅₀ dos padrões *m*-Amsa com 1.41±0.11 μM e Asul com 1.33±0.08 μM. O *p*-Cl-fenil, parece ter sido o responsável pelo efeito citotóxico favorável dos compostos, uma vez que seus análogos estruturais (LT70 – LT74) quando substituídos na mesma posição pelo fenil apresentam valores de IC₅₀ superior ao observado nos compostos LT76 – LT79.

Assim como o observado na linhagem anterior, a presença de grupos hidrofóbicos em *N*-1 da tiossemicarbazona (fenil/1-naftil) não conduziram a uma melhora na resposta biológica. No entanto o conjunto de moléculas LT85 – LT89 que possuem o alil, grupo hidrofóbico com sistema π linear, obtiveram resultados de IC₅₀ variando entre 0.84±0.09 μM a 1.56±0.06 μM. Com destaque para o derivado LT87 que em ambas as porções da molécula é substituído com grupos hidrofóbicos e ainda assim, é o composto mais ativo da série tendo valor de IC₅₀ igual a 0.84±0.09 μM sendo menor que os valores apresentados pelos compostos padrão *m*-Amsa (1.41±0.11 μM) e Asul (1.33±0.08 μM) e semelhante estatisticamente com a Dox que apresenta IC₅₀ de 0.74±0.03 μM.

Tabela 4: Resultados de IC50, CC50 e IS dos derivados LT frente a DU-145 e Jurkat



Composto	R1	R2	J774	DU-145	IS	Jukart	IS
			CC50 μ M	IC50 μ M		IC50 μ M	
70	fenil	5-CN	64.7 \pm 5.1	1.12 \pm 0.20	57.77	ND	ND
71	fenil	4-NO2	37.9 \pm 0.9	1.01 \pm 0.05	37.52	1.63 \pm 0.04	23.23
72	fenil	benzo[g]	34.9 \pm 1.9	1.13 \pm 0.12	30.88	1.75 \pm 0.40	19.94
73	fenil	pirrol[2,3-b]piridin	79.4 \pm 3.0	1.36 \pm 0.05	58.38	1.56 \pm 0.06	50.89
74	fenil	7-CH3	32.9 \pm 2.5	1.43 \pm 0.07	23.00	1.52 \pm 0.28	21.64
75	<i>p</i> -cloro-fenil	5-CN	>75	1.34 \pm 0.04	55.97	1.44 \pm 0.83	52.08
76	<i>p</i> -cloro-fenil	4-NO2	24.5 \pm 1.3	0.98 \pm 0.10	25.00	1.23 \pm 0.32	19.91
77	<i>p</i> -cloro-fenil	benzo[g]	>75	0.94 \pm 0.05	79.78	1.18 \pm 0.08	63.55
78	<i>p</i> -cloro-fenil	pirrol[2,3-b]piridin	7.0 \pm 0.6	1.52 \pm 0.05	4.60	1.37 \pm 0.10	5.10
79	<i>p</i> -cloro-fenil	7-CH3	30.0 \pm 2.6	1.46 \pm 0.12	20.54	1.64 \pm 0.06	18.29
80	1-naftil	5-CN	>75	1.36 \pm 0.07	55.14	1.36 \pm 0.07	55.14
81	1-naftil	4-NO2	21.8 \pm 1.8	1.51 \pm 0.06	14.43	1.53 \pm 0.02	14.24
82	1-naftil	benzo[g]	>75	1.62 \pm 0.04	46.29	1.48 \pm 0.24	50.67
83	1-naftil	pirrol[2,3-b]piridin	>75	1.60 \pm 0.04	46.87	1.49 \pm 0.11	50.33
84	1-naftil	7-CH3	38.7 \pm 3.9	1.65 \pm 0.02	23.45	1.60 \pm 0.56	24.18
85	alil	5-CN	>75	1.07 \pm 0.06	70.09	1.48 \pm 0.42	50.67
86	alil	4-NO2	>75	1.41 \pm 0.08	53.19	1.26 \pm 0.07	59.52
87	alil	benzo[g]	18.7 \pm 5.0	0.94 \pm 0.12	19.89	0.84 \pm 0.09	22.26
88	alil	pirrol[2,3-b]piridin	>75	1.72 \pm 0.50	62.50	1.56 \pm 0.06	48.07
89	alil	7-CH3	60 \pm 4.3	1.60 \pm 0.04	37.50	1.36 \pm 0.23	44.11
Doxo	-	-	-	1.12 \pm 0.06	-	0.74 \pm 0.03	-
<i>m</i> -Amsa	-	-	3.11 \pm 2,8	0.80 \pm 0.03	3.88	1.41 \pm 0.11	2.20
Asul	-	-	-	0.66 \pm 0.20	-	1.33 \pm 0.08	-

IC50 – concentração que inibe 50% do crescimento celular

CC50 – concentração capaz de causar a perda da viabilidade em 50% dos

macrófagos IS (Índice de seletividade) – CC50 Macrófagos/IC50 DU-145 e Jurkat

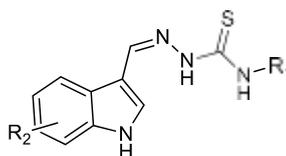
5.5 ENSAIO CITOTÓXICO *IN VITRO* FRENTE AS LINHAGENS MCF-7 E T-47D

Na investigação da atividade antiproliferativa em células de câncer de mama humano MCF-7 e T-47D foi possível verificar que todos os compostos se comportam de maneira similar aos fármacos padrões utilizados, *m*-Amsa, Dox e Asul em ambas as linhagens. Para a MCF-7 foi possível verificar que ao fim do tratamento, as células mostraram-se mais sensíveis aos compostos LT76, LT81, LT84, LT86, LT87 e LT88 apresentando valor de IC₅₀ correspondente a 0.93 ± 0.31 , 0.74 ± 0.12 , 0.80 ± 0.03 , 0.82 ± 0.14 , 0.83 ± 0.46 e 0.92 ± 0.13 μM respectivamente, sendo menores que os padrões *m*-Amsa, Asul e Dox que obtiveram valores de 1.14 ± 0.09 , 1.11 ± 0.86 e 1.18 ± 0.06 μM nessa ordem.

Essas diferenças na resposta biológica, estão possivelmente associadas às modificações dos grupos substituintes, realizadas na estrutura química das moléculas. A inserção do *p*-NO₂-indol, um grupo fortemente retirador de elétrons com efeito -I e -M nos compostos LT71, LT76, LT81 e LT86, aparentemente garante a efetividade da ação biológica, que apresenta pequenas alterações na resposta ao variar os grupos hidrofóbicos substituídos em *N*-4 da tiossemicarbazona por fenil, *p*-Cl-fenil, 1-naftil e alil. Os compostos destacados apresentam IC₅₀ correspondente a 1.14 ± 0.22 , 0.93 ± 0.31 , 0.74 ± 0.12 e 0.82 ± 0.14 μM respectivamente, sendoo LT81 o mais ativo para essa linhagem.

As substituições em *N*-1(7-CH₃, benzo[g] e pirrol [2,3-*b*]piridina) e *N*-4 (1-naftil, alil) encontradas nos compostos LT84, LT87, e LT88 respectivamente são de caráter eletrônico doador de elétrons por +I e +M que resultou numa significativa resposta antiproliferativa. Comparando as atividades dos compostos LT81 e LT84, é possível confirmar a importância do *p*-NO₂ para obtenção de uma resposta biológica mais efetiva. Estudos anteriores mostram que a presença de átomos eletronegativos aumenta a lipofilicidade da molécula e é responsável pelo aumento da citotoxicidade no modelo MTT (HARI et al., 2008). O estudo de SAR realizado por (GUDIPATI et al., 2011) e (NAYAK et al., 2021) também comprova que os compostos com grupos retiradores de elétrons, conduzem a uma atividade notável contra as linhagens MCF-7, HeLa e HT29. Todos os compostos foram mais seletivos do que a *m*-Amsa que apresentou IS de 2.72, contudo o composto LT78 foi o menos seletivo da série com IS de 6.09 e os demais encontram-se expressos na tabela 5.

Tabela 5: Resultados de IC50, CC50 e IS dos derivados LT frente a MCF-7 e T-47D



Composto	R1	R2	J774	MCF-7	IS	T-47D	IS
			CC50 μM	IC50 μM		IC50 μM	
70	fenil	5-CN	64.7□5.1	1.30±0.06	49.77	1.41±0.05	45.89
71	fenil	4-NO2	37.9□0.9	1.14±0.22	33.25	1.13±0.48	33.54
72	fenil	benzo[g]	34.9□1.9	1.17±0.11	29.83	1.16±0.04	30.09
73	fenil	pirrol[2,3-b]piridin	79.4□3.0	1.07±0.4	74.21	0.66±0.34	120.30
74	fenil	7-CH3	32.9□2.5	1.1±0.21	29.91	1.11±0.16	29.64
75	<i>p</i> -cloro-fenil	5-CN	>75	1.4±0.66	53.57	1.39±0.91	53.96
76	<i>p</i> -cloro-fenil	4-NO2	24.5□1.3	0.93±0.31	26.34	0.95±0.36	25.79
77	<i>p</i> -cloro-fenil	benzo[g]	>75	1.43±0.90	52.45	0.81±0.05	92.59
78	<i>p</i> -cloro-fenil	pirrol[2,3-b]piridin	7.0□0.6	1.15±0.09	6.09	1.15±0.10	6.09
79	<i>p</i> -cloro-fenil	7-CH3	30.0□2.6	1.36±0.36	22.06	1.24±0.34	24.19
80	1-naftil	5-CN	>75	1.27±0.27	59.06	1.27±0.27	59.06
81	1-naftil	4-NO2	21.8□1.8	0.74±0.12	29.46	0.68±0.10	32.06
82	1-naftil	benzo[g]	>75	1.32±0.56	56.82	1.32±0.56	56.82
83	1-naftil	pirrol[2,3-b]piridin	>75	1.23±0.06	60.98	1.29±0.03	58.14
84	1-naftil	7-CH3	38.7□3.9	0.82±0.14	47.20	0.76±0.07	50.92
85	alil	5-CN	>75	1.19±0.18	63.03	1.04±0.14	72.12
86	alil	4-NO2	>75	0.83±0.46	90.36	1.61±0.98	46.58
87	alil	benzo[g]	18.7±5.0	0.80±0.03	23.38	0.74±0.03	25.27
88	alil	pirrol[2,3-b]piridin	>75	0.92±0.13	81.52	0.98±0.1	76.53
89	alil	7-CH3	60□4.3	1.09±0,2	55.05	1.09±0.25	55.05
Doxo	-	-	-	1.11±0.86	-	1.03±0.27	-
<i>m</i>-Amsa	-	-	3.11□2,8	1.14±0.09	2.72	1.25±0.38	2.48
Asul	-	-	-	1.18±0.07	-	1.26±0.43	-

IC50 – concentração que inibe 50% do crescimento celular

CC50 – concentração capaz de causar a perda da viabilidade em 50% dos

macrófagos IS (Índice de seletividade) – CC50 Macrófagos/IC50 MCF-7 e T-47D.

Um comportamento semelhante na ação farmacológica, é observado na linhagem T-47D, onde todos os compostos se assemelham aos resultados obtidos pelos fármacos controle. Com destaque para os derivados LT73, LT76, LT77, LT81, LT84, LT87 e LT88 que apresentam valor de IC₅₀ correspondente a 0.66±0.34, 0.95±0.36, 0.81±0.05, 0.68±0.10, 0.76±0.07, 0.74±0.03 e 0.98±0.1 µM respectivamente, sendo menor dos que os valores m-Amsa, Azul e Dox que obtiveram valores de 1.03±0.27, 1.25±0.38 e 1.26±0.43 µM nessa ordem.

O composto LT73 foi o mais ativo para essa linhagem, em sua estrutura há a presença do pirrol [2,3-b]piridina substituído em *N*-1 e do fenil em *N*-4 ambos com caráter hidrofóbico e efeito eletrônico doador de elétrons por +I e +M. Outros grupos químicos, como o 1-naftil, benzo[g] alil e 7-CH₃, com efeitos similares ao observado no LT73 também foram importantes para melhora na resposta antiproliferativa. Assim como observado na MCF-7, o grupo *p*-NO₂ contribuiu para a ação positiva dos compostos com destaque para o LT76 e LT81 que apresentam IC₅₀ de 0.95±0.36 e 0.68±0.10 µM, sendo este último o segundo mais ativo para esta série.

Em contrapartida, o grupo *p*-NO₂ não foi determinante para garantir melhora na resposta do LT76 em relação ao LT77 que obteve IC₅₀ igual a 0.81±0.05 µM apresentando como substituinte em *N*-1 o benzo[g], que também está presente no LT87 e juntamente com o alil substituído em *N*-4 foi responsável por uma IC₅₀ de 0.74±0.03 µM. Com exceção dos compostos LT73 e LT77, os compostos LT76, LT81, LT84, LT87 e LT88 apresentam uma dualidade de ação frente as linhagens MCF-7 e T-47D.

Assim como na MCF-7, o LT78 foi o menos seletivo com IS de 6.09, ainda assim todos os compostos foram mais seletivos do que a m-Amsa com IS de 2.48, os demais compostos encontram-se expressos na tabela 5.

Vale salientar que a formação de tumores de mama é enriquecida com constituintes inflamatórios, como células e fatores solúveis principalmente TNF-α e IL-6 que promovem ativamente o desenvolvimento e a progressão do câncer (GOLDBERG et al., 2010). Os compostos LT76, LT81 e LT87 mostraram-se ativos frente as duas linhagens tumorais e como descrito no trabalho de (JACOB et al., 2021) esses mesmos compostos se destacaram por apresentar uma atividade anti-inflamatória promissora, sendo capaz de inibir a produção das citocinas IL-2, IL-6, TNF- α e NO. Além de serem inibidores da enzima ciclo-oxigenase II (COX-2). Esses resultados se associam as evidências existentes de uma correlação entre os

mecanismos inflamatórios e a promoção da carcinogênese, bem como da ocorrência do câncer de mama inflamatório (CMI) (ROBERTSON et al., 2010). Reforçando a hipótese de (RAYBUM et al., 2009) de que fármacos anti-inflamatórios podem ser utilizados na terapia anticâncer.

Com base nesses dados os compostos LT76, LT81 e LT87 foram conduzidos a testes mais específicos a fim de comprovar sua ação antiproliferativa.

5.6 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR

A metástase de células de câncer de mama, sua invasão em vasos e veias linfáticas locais e a migração dessas células para outros órgãos distais são os principais desafios no sucesso do tratamento desse tipo de câncer (RAVASAN et al., 2021; VALASTYAN & WEINBERG 2011). Por isso o ensaio de migração celular é de suma importância para entender a capacidade de inibição dos compostos teste em inibir a migração das células cancerosas e, consequentemente a supressão da progressão do tumor (RAMADAN et al., 2021; ALMEIDA et al., 2019).

O teste de invasão com células MCF-7 mostra que os derivados testados LT76, LT81 e LT87 são capazes de reduzir o processo de invasão de maneira mais eficaz que o controle positivo a *m*-Amsa. Após 48h de incubação não foi observada diferenças estatísticas ($p < 0,2$) em nenhuma das concentrações testadas entre a *m*-Amsa e o controle não tratado que apresentou valores de $40,66 \pm 6,25$ a $1 \mu\text{M}$ e $42,64 \pm 1,58$ a $0,5 \mu\text{M}$ e $49,7 \pm 4,9$ respectivamente. Por outro lado, ao fim do tratamento, o composto LT76 em ambas as concentrações de $0,5 \mu\text{M}$ ($26,93 \pm 0,2$) e $1 \mu\text{M}$ ($25,87 \pm 1,4$) foi capaz de diminuir estatisticamente o processo de invasão, enquanto que para os compostos LT81 e LT87 apesar da diminuição visual do quantitativo de células e da inibição da invasão, apenas na concentração de $1 \mu\text{M}$, de $25,67 \pm 1,4$ (LT81) e $29,90 \pm 1,8$ (LT87), foram estatisticamente significativos (Tabela 6).

Estes resultados sugerem que essas moléculas poderiam prevenir a disseminação de células cancerosas de uma lesão primária para outro tecido, uma vez que a migração celular pode estimular a sinalização recíproca entre as células-tronco mesenquimais e as células cancerosas que promovem a metástase do câncer (KSIKSI, et al., 2022; SUHAIL et al., 2019).

Em contraste ao observado na linhagem MCF-7, no ensaio com T-47D, a *m*-Amsa é capaz de reduzir o processo de invasão a $0,5 \mu\text{M}$ enquanto que a $1 \mu\text{M}$ não apresenta diferença estatística quando comparado ao controle não tratado (Tabela 6). Em contrapartida, os

compostos teste não obtiveram o mesmo êxito de inibição para esta linhagem. O composto LT81 não mostra ser capaz de reduzir o processo de invasão a quaisquer concentrações testadas, enquanto que o LT87 tem a capacidade de redução a 1 μ M com valor de $32,51 \pm 0,5$ e $p=0,04$ assemelhando-se à redução demonstrada nas células MCF-7. No entanto, o LT76, assim como na linhagem anterior, em ambas as concentrações de 0,5 μ M ($31,67 \pm 1,1$) e 1 μ M ($51,66 \pm 5,4$) foram estatisticamente significativos para a inibição da invasão celular. Vale salientar, que a 1 μ M, o composto em questão promove uma habilitação inesperada na invasão das células T-47D, resultante de uma reconexão das células após o ensaio.

Tabela 6: Dados inibição da invasão com MCF-7 e T-47D

Composto	Concentração	Invasão (%)	
		MCF-7	T-47D
Control 48h	-	49.76 ± 4.9	41.12 ± 1.7
<i>m</i> -AMSA	1 μ M	40.66 ± 6.2	43.21 ± 1.2
<i>m</i> -AMSA	0.5 μ M	42.64 ± 1.5	31.23 ± 0.9 *
LT-76	1 μ M	25.87 ± 1.4 *	51.66 ± 5.4 *
LT-76	0.5 μ M	26.93 ± 0.2 *	31.67 ± 1.1 *
LT-81	1 μ M	25.67 ± 1.4 *	32.71 ± 1.9
LT-81	0.5 μ M	34.78 ± 3.1	44.41 ± 0.4
LT-87	1 μ M	29.90 ± 1.8 *	32.51 ± 0.5 #
LT-87	0.5 μ M	34.78 ± 3.2	41.04 ± 0.7

* $p < 0.01$, * $p < 0.02$

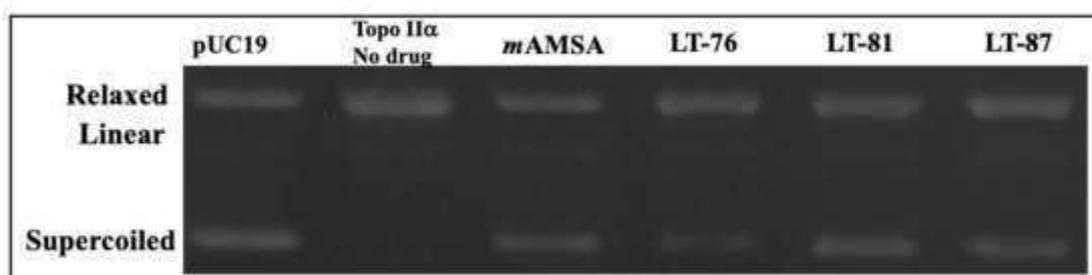
$p < 0.04$

5.7 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA TOPOISOMERASE II α

As enzimas Topoisomerases (Topo), em suas isoformas I e II, são um dos principais alvos farmacológicos dos quimioterápicos anticânceres, por apresentarem função crucial no ciclo celular e nos processos de replicação, reparo e transcrição do DNA (KAUR et al., 2020; KELES et al., 2019). A Topo II, em especial é responsável por clivar irreversivelmente as duas fitas do DNA, levando a célula à apoptose. Além disso apresenta-se superexpressa em alguns tipos de linhagens celulares, por esse motivo é um alvo relevante da ação dos fármacos anticâncer (RIBEIRO et al., 2019).

A inibição da topoisomerase II α pelos derivados LT76, LT81 e LT87 foi analisada e mostrada na Figura 14. Onde é possível observar que ambos os compostos inibiram a atividade enzimática na mesma concentração do controle positivo a *m*-Amsa. A inibição pode ser observada pelas diferenças nas conformações circulares do plasmídeo pUC19, onde a enzima topo II α é capaz de relaxar o DNA de plasmídeo na ausência dos compostos. Em contraste, a *m*-Amsa e os compostos teste causaram a inibição da enzima que resultou no aparecimento da banda correspondente ao DNA superenrolado.

Figura 14: Efeito dos derivados de LT e *m*- Amsa na inibição da topoisomerase II α humana.



Fonte: Autor (2022)

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Todos os derivados demonstraram se ligar à HSA, apresentando diferentes afinidades de ligação, de acordo com suas estruturas químicas e suas propriedades físico-químicas, a qual pode favorecer a biodisponibilidade destes compostos no meio biológico. Também foi possível confirmar o modo preferencial de ligação ao DNA dos compostos LT, que se dá por intercalação entre os pares de bases, podendo ser comprovado através da técnica de ensaio de competição com sondas fluorescentes laranja de acridina e DAPI.

Nos estudos citotóxicos com a linhagem não transformada, J774A.1, os compostos apresentaram uma variação citotóxica de 7.0 ± 0.6 a $> 75 \mu\text{M}$, na qual alguns compostos como o LT78 se apresentam como o mais citotóxico da série. No entanto, ainda assim todos os compostos foram menos citotóxicos que o fármaco padrão *m*-Amsa. Já na análise antiproliferativa os derivados apresentam efeitos promissores em todas as linhagens tumorais humanas testadas. Para as linhagens DU-145 e Jurkat os compostos LT76, LT77 e LT87 se destacaram com IC₅₀ 0.98 ± 0.10 , 0.94 ± 0.05 e $0.94 \pm 0.12 \mu\text{M}$ respectivamente. Para as linhagens de câncer de mama MCF-7 e T-47D, os derivados LT76, LT81, LT84, LT86, LT87 e LT88 apresentaram valor de IC₅₀ correspondente a 0.93 ± 0.31 , 0.74 ± 0.12 , 0.80 ± 0.03 , 0.82 ± 0.14 , 0.83 ± 0.46 e $0.92 \pm 0.13 \mu\text{M}$ respectivamente, enquanto que para a T-47D os derivados LT73, LT76, LT77, LT81, LT84, LT87 e LT88 apresentaram valor de IC₅₀ correspondente a 0.66 ± 0.34 , 0.95 ± 0.36 , 0.81 ± 0.05 , 0.68 ± 0.10 , 0.76 ± 0.07 , 0.74 ± 0.03 e $0.98 \pm 0.1 \mu\text{M}$ respectivamente. Onde observa-se uma dualidade de ação frente as linhagens para os compostos LT76, LT81, LT84, LT87 e LT88.

Os compostos LT76, LT81 e LT87 apresentam a capacidade de inibição da migração de células cancerosas do tipo MCF-7, sugerindo que essas moléculas podem evitar o desenvolvimento do processo de metástase, com destaque para o composto LT76 que foi ativo em ambas as concentrações do teste. No entanto, o mesmo não é observado para a linhagem T-47D, que apesar da atividade dos derivados LT76 e LT87, o LT81 não mostra capacidade de redução do processo de invasão a quaisquer concentrações testadas. Esses compostos apresentam ainda capacidade de inibição parcial da Topo II α , podendo considerá-lo como um inibidor interfacial e aplicá-lo em estudos mais aprofundados.

7 PERSPECTIVA

- Utilizar a técnica de Dicroísmo circular dos derivados **LT** com a HSA para verificar possíveis mudanças nas estruturas secundárias da albumina;
- Aplicar estudo *in silico* com o intuito de estudar outros possíveis alvos biológicos do câncer com estes derivados;
- Analisar o efeito antiproliferativo com as linhagens MCF10A e VERO;
- Analisar em qual etapa do ciclo celular os derivados atuam e investigar o tipo de morte celular.

REFERÊNCIAS

- ABDELBASSET, A.; FARAHAT, A.A.; ISMAIL, M.A.; KUMAR, A.; WENZLER, T.; MOHAMED, A.; Indole and Benzimidazole Bichalcophenes: Synthesis, DNA Binding and Antiparasitic Activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 143 (2018) 1590 - 1596. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.10.056
- ABHISHEK, A.; JHA, R. K.; SINHA, R.; JHA, K. Automated classification of acute leucemia on a heterogeneous dataset using machine learning and deep learning techniques. **Biomedical Signal Processing and Control**. 72 (2022) 103341. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bspc.2021.103341>
- AFRIN, S.; RAGMAN, Y.; SARWAR, T.; HUSAIN, M. A.; ALI, A. Molecular spectroscopic and thermodynamic studies on the interaction of anti-platelet drug ticlopidine with calf thymus DNA. **Spectrochimica Acta Part A: molecular and Biomolecular Spectroscopy**. 186 (2017) 66 – 75. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2017.05.073>
- AGÊNCIA INTERNACIONAL DE PESQUISA EM CÂNCER - IARC Disponível em: <<https://www.iarc.who.int/>> Acesso em: 05 jan. 2022.
- AGRAWAL, C.; THAKUR, Y.; TRIPATHI, M.; SIDDIQI, M. K. Elucidating the binding propensity of naphthyl hydroxamic acid to human serum albumin (HSA): Multi-spectroscopic and molecular modeling approach. **Journal of Molecular Structure**. 1184 (2019) 1 – 11. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.01.067>
- AHAMD, A.; AHMAD, M. Deciphering the mechanism of interaction of edifenphos with calf thymus DNA, **Spectrochim. Acta** 188 (2017) 244 - 251. DOI: 10.1016/j.saa.2017.07.014
- AHMED, E.M.; SARHAN, A.E.; EL-NAGGAR, D.H.; KHATTAB, R.R.; EL-NAGGAR, M. Towards breast cancer targeting: Synthesis of tetrahydroindolocarbazoles, antibreast cancer evaluation, uPA inhibition, molecular genetic and molecular modelling studies. **Bioorganic Chemistry**. 93 (2019) 103332. DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.103332
- ALI, A.; BHATTACHARYA, S. DNA binders in clinical trials and chemotherapy. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**. 22 (2014) 4506 – 4521. DOI: 10.1016/j.bmc.2014.05.030
- ALMEIDA, V. M.; JUNIOR, M. A. B.; NASCIMENTO, J. C.; AMORIM, L. M. F. Anticancer drug screening: standardization of in vitro wound healing assay. **Jornal Brasileiro de Patologia Medicina Laboratorial**. 55 (2019) 606 – 619. DOI: 10.5935/1676-2444.20190054
- ALMEIDA, S. M. V.; RIBEIRO, A. G.; SILVA, G. C. L.; ALVES, J. E. F.; BELTRÃO, E. I. C. DNA binding and topoisomerase inhibition: How can these mechanisms be explored to design more specific anticancer agents? **Biomedicine & Pharmacotherapy**. 96 (2017) 1538 - 1556. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.054>
- ALMAGRO, L.; FERNÁNDEZ-PÉREZ, F.; PEDREÑO, M.A. Indole Alkaloids from *Catharanthus roseus*: Bioproduction and Their Effect on Human Health. **Molecules**. 20 (2015) 2973 – 3000. DOI: 10.3390/molecules20022973

ALVES, F.R.S.; BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. From Nature to Drug Discovery: The Indole Scaffold as a 'Privileged Structure'. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, 9 (2009) 782-793. DOI: 10.2174/138955709788452649

AMEEN, F.; SIDDIQUI, S.; JAHAN, I.; NAYEEM, S. M. Studying the interaction of scopolamine with calf-thymus DNA: An in-vitro and in-silico approach and genotoxicity **Spectrochimica Acta Part a: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**.265 (2022) 120391. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120391>

ARJMAND, F.; TEWATIA, P.; AZIZ, M.; KHAN, R. Interaction studies of a novel Co(II)-based potential chemotherapeutic agente with human sérum albumin (HSA) employing biophysical techniques. **Medicinal chemistry research**. 19 (2010) 794 – 807. DOI: 10.1007/s00044-009-9231-7

BAGHERI, M.; FATEMI, M. H. Fluorescence spectroscopy, molecular docking and molecular dynamic simulation studies of HSA-Aflatoxin B1 and G1 interactions. **Journal of Luminescence**. 202 (2018) 345 – 53. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2018.05.066>.

BANDINI, M. Electrophilicity: the “dark-side” of indole chemistry. **Organic & Biomolecular Chemistry**. 11 (2013) 5206–5212. DOI: 10.1039/c3ob40735g

BARMA, A.; GHOSH, D.; KARMAKAR, P. Synthesis and characterization of a mononuclear nickel(II) complex with N,O-donor ligand: Its DNA/HSA protein binding properties and tumor suppressive function. **Journal of Molecular Structure**. 1250 (2022) 131687. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131687>.

BARRA, C.V.; NETTO, A.V.G. Interações entre complexos antitumorais e o DNA e suas ferramentas de análises: Um enfoque nos metalointercaladores. **Revista Virtual de Química**. 7 (2015) 1998 – 2016. DOI: 10.5935/1984-6835.20150118

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**. 2a ed. Porto Alegre. Artmed, 2008.

BASAK, S.; ALI, S.; MONDAL, M.; ROY, D.; DUTTA, A. Green synthesis and characterization of heterostructure MnO-FeO nanocomposites to study the effect on oxidase enzyme mimicking, HSA binding interaction and cytotoxicity. **Chemical Physics Letters**. 785 (2021) 139163 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2021.139163>

BAZARBACHI, A.; SUAREZ, F.; FIELDS, P. How I treat adult t-cell leukemia/lymphoma. **Blood**. 118 (2011). DOI: 10.1182/blood-2011-03-345702.

BELATIK, A. et al. Binding sites of retinol and retinoic acid with serum albumins. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 48 (2012) 114 - 123. DOI: 0.1016/j.ejmech.2011.12.002

BI, S.; YAN, L.; PANG, B.; WANG, Y. Investigation of three flavonoids binding to bovine serum albumin using molecular fluorescence technique. **Journal of luminescence**. 132 (2012) 132 – 140. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2011.08.014>

BRANDÃO, H.N.; DAVID, J.P.; COUTO, R.D.; NASCIMENTO, J.A.P.; DAVID, J.M. Chemistry and pharmacology of antineoplastic chemotherapeutic derivatives from plants. **Química Nova**. 33 (2010) 1359 – 1369. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000600026>

BURGUER, A. **Medicinal chemistry**. 3ed (1970) 127

CANALS, A.; PURCIOLAS, M.; AYMAMI, J.; COLL, M. Structure of ellipticine in complex with a 6-bp DNA. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**. 61 (2005) 1009. DOI: [10.2210/pdb1Z3F/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb1Z3F/pdb)

CHAKRABORTY, A.; PANDA, A. K.; GHOSH, R.; BISWAS, A. DNA minor groove binding of a well known anti-mycobacterial drug dapson: A spectroscopic, viscometric and molecular docking study. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 665 (2019) 107 – 113. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.03.001>

CHATTERJEE, T.; PAL, A.; DEY, S.; CHATTERJEE, B. K. Interaction of Virstatin with Human Serum Albumin: Spectroscopic Analysis and Molecular Modeling. **Plos One**. 7 (2012) e37468 DOI: [10.1371/journal.pone.0037468.g001](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037468.g001)

CHATURYEDI, A. P.; DEHM, S. M. Androgen Receptor Dependence. Prostate Cancer **Advances in Experimental Medicine and Biology**. 1210 (2019) 333 – 350. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-32656-2_15

CHAURASIA, M.; TOMAR, D.; CHANDRA, S. Synthesis, spectral characterization, and DNA binding studies of Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II) complexes of schiff base 2-((1H-1,2,4-triazol-3-ylimino)methyl)-5-methoxyphenol. **Journal of Molecular Structure**. 1179 (2019) 431 – 442. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.11.027>

CHADHA, N. SILAKARI, O. Indoles as therapeutics of interest in medicinal chemistry: Bird's eye view. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 134 (2017) 159- 184. DOI: [10.1016/j.ejmech.2017.04.003](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.003)

CHEN, H.; LI, C.; PENG, X.; ZHOU, Z.; WEINSTEIN, J. N. A Pan-Cancer Analysis of Enhancer Expression in Nearly 9000 Patient Samples. **Cell**. 173 (2018) 386 – 399. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.027>

CHEN, F.; ZHUANG, X.; LIN, Z.; YU, P. New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. **BMC Medicine**. (2016) 1345. DOI: [10.1186/s12916-015-0278-7](https://doi.org/10.1186/s12916-015-0278-7)

COLLINS-UNDERWOOD, J. R.; MULLIGHAN, C. G. Genetic alterations targeting lymphoid development in acute lymphoblastic leucemia. **Current Topics in Developmental Biology** (2011) 171 – 196. DOI: [10.1016/b978-0-12-380916-2.00006-1](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-380916-2.00006-1)

CONGREVE, M.; CARR, R.; MURRAY, C.; JHOTI, H. A 'Rule of Three' for fragment-based lead discovery? **Drug Discovery Today**. 8 (2003) 876 – 877. DOI: [10.1016/s1359-6446\(03\)02831-9](https://doi.org/10.1016/s1359-6446(03)02831-9)

CORREIA, A. S.; GÄRTNER, F.; VALE, N. Drug combination and repurposing for cancer therapy: the example of breast cancer. **Heliyon**. 7 (2021) e05948. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e05948>

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**. 420 (2002) 860 -867. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature01322>

DADASHPOUR, S.; EMAMI, S. Indole in the target-based design of anticancer agents: A versatile scaffold with diverse mechanisms. **European Journal Medicinal Chemistry**. 150 (2018) 9 – 29. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.02.065>

DAS, J.; CHAKRABORTY, S.; MAITI, T.K. Mechanical stress-induced autophagic response: A cancer-enabling characteristic? **Seminars in cancer biology**. (2019). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.05.017>

DECKER, C. W.; GARCIA, J.; GATCHALIAN, K.; ARCENEUX, D. Mitofusin-2 mediates doxorubicin sensitivity and acute resistance in jurkar leukemia cells. **Biochemistry and Biophysics Reports**. 24 (2020) 100824. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2020.100824>

DEHNAYEBI, M. F.; DEHGHANIAN, E.; TORSHIZI, H. M. A novel palladium (II) antitumor agents: Synthesis, characterization, DFT perspective, CT-DNA and BSA interaction studies via in-vitro and in-silico approaches. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. 249 (2021) 119215. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119215>

DAVIS, A. S.; VIERA, A. J.; MEAD, M. D. Leukemia: An overview for primary care. **American Family Physician**. 89 (2014) 731 – 738. DOI: <http://www.aafp.org/afp/2014/0501/p731-s1>

DELORT, L.; ROSSARY, A.; FARGES, M. C.; VASSON, M. P.; CHÉZET F. C. Leptin, adipocytes and breast cancer: focus on inflammation and anti-tumor Immunity. **Life Sciences**. 140 (2015) 37 - 48. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.04.012>

DHIMAN, N.; KINGSHOTT, P.; SUMER, H.; CHANDRA, S.S.; RATH, S.N. On-chip anticancer drug screening – Recent progress in microfluidic platforms to address challenges in chemotherapy. **Biosensors and Bioelectronics**. 137 (2019) 236 - 254. DOI: [10.1016/j.bios.2019.02.070](https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.02.070)

DOBBELSTEIN, M.; MOLL, Y. Targeting tumour-supportive cellular machineries in anticancer drug development. **Nature reviews Drug Discovery**. 13 (2014) 179 - 196. DOI: [10.1038/nrd4201](https://doi.org/10.1038/nrd4201)

DORRAJI, P. S.; JALALI, F. Spectral, electrochemical, and molecular docking evaluation of the interaction of the anti-hyperthyroid drug methimazole with DNA. **Canadian Journal of Chemistry**. 93 (2015) 1132 – 1139. DOI: <https://doi.org/10.1139/cjc-2014-0594>

DRWAL, M.N.; AGAMA, K.; WAKELIN, L.P.G.; POMMIER, Y.; GRIFFITH, R. Exploring DNA topoisomerase I ligand space in search of novel anticancer agents. **Plos One**. 6 (2011) 25150. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025150>

DUSCTKAMI, M.; TORSHIZI, H. M. Refolding and unfolding of CT-DNA by newly designed Pd(II) complexes. Their synthesis, characterization and antitumor effects.

International Journal of Biological Macromolecules. 99 (2017) 319 - 334. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.063>

ERKOC, P.; SCHMITT, M.; INGELFINGER, R.; BISCHOFF-KONT, I.; KOPP, L. Xenocoumacin 2 reduces protein biosynthesis and inhibits inflammatory and angiogenesis-related processes in endothelial cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy.** 140 (2021) 111765. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111765>

FABBRI, F.; SALVI, S.; BRAVACCINI, S. Know your enemy: Genetics, aging, exposomic and inflammation in the war against triple negative breast cancer. **Seminars in Cancer Biology.** Vol. 60, p. 285 - 293 (2020). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.10.015>

FENG, Y.; SPEZIA, A.; HUANG, S.; YUAN, C.; ZENG, Z. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. **Genes & Diseases.** 5 (2018) 77 – 106. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.001>

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; ERVIK, M.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C. GLOBOCAN 2012: Estimativa da Incidência do Câncer, Mortalidade e Prevalência no Mundo em 2012 - **IARC Cancer Base.** 11 (2012). ISBN 978-85-7318-389-4 (versão eletrônica)

GAO, C.; ZHANG, R. D.; LIU, S. G.; ZHAO, X. X. Low CREBBP expression is associated with adverse long-term outcomes in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. **European Journal of Haematology.** 99 (2017) 150 – 159. DOI: 10.1111/ejh.12897

GENG, S.; CUI, Y.; LIU, Q.; CUI, F.; ZHANG, G.; CHI, Y.; PENG, H. Spectroscopic and molecular modeling study on the interaction of ctDNA with 3'-deoxy-3'-azido doxorubicin. **Journal of Luminescence.** 141 (2013) 144 - 149. DOI: 10.1016/j.jlumin.2013.03.034

GODONE, R.L.N.; LEITÃO, G.M.; ARAÚJO, N.B.; CASTELLETTI, CH.M.; LIMA-FILHO, J.L.; MARTIN, D.B.G. Clinical and molecular aspects of breast cancer: Targets and therapies. **Biomedicine & pharmacotherapy.** 106 (2018) 14 – 34. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.06.066>

GOLDBERG, J. E.; SCHWERTFEGER, K.L. Proinflammatory Cytokines in Breast Cancer: Mechanisms of Action and Potential Targets for Therapeutics. **Current Drug Targets.** 11 (2010) 1133 – 1146. DOI:10.2174/138945010792006799

GORE, S.; BASKARAN, S.; KONING, B. Fischer indole synthesis in low melting mixtures. **Organic Letters.** 14 (2012) 4568 - 4571. DOI: 10.1021/ol302034r

GUDIPATI, R.; ANREDDY, R. N. R.; MANDA, S. Synthesis, characterization and anticancer activity of certain 3-{4-(5-mercapto-1,3,4-oxadiazole-2-yl)phenylimino}indolin-2-one derivatives. **Saudi Pharmaceutical Journal.** 19 (2011) 153 – 158. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2011.03.002>

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos avançados,**

São Paulo, v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-40142010000300006>

GURUSAMY, S.; KRISHNAVENI, K.; SANKARGANESH, M.; AKRISHNAN, R.; ASHA, N. Synthesis, characterization, DNA interaction, BSA/HSA binding activities of VO(IV), Cu(II) and Zn(II) Schiff base complexes and its molecular docking with biomolecules. **Journal of Molecular Liquids**. 28 (2021) 117045 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.117045>

HALL, R. J.; MORTENSON, P. N.; MURRAY, C. W. Efficient exploration of chemical space by fragment-based screening. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**. 116 (2014) 82 – 91. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2014.09.007>

HAJDUK, P. J.; GREER, J. A decade of fragment-based drug design: strategic advances and lessons learned. **Nature Reviews Drug Discovery**. 6 (2007) 211 – 219. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrd2220>

HAN, X. L.; TIAN, F. F.; GE, Y. S.; JIANG, F. L. LAI, L. Spectroscopic, structural and thermodynamic properties of chlorpyrifos bound to sérum albumin: A comparative study between BSA and HSA. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. 109 (2012) 1 – 11. DOI: [10.1016/j.jphotobiol.2011.12.010](https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2011.12.010)

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**. 144 (2011) 646 - 674. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

HANDE, K.R. Topoisomerase II inhibitors. **Update on cancer therapeutics**. 1 (2008) 3 – 15. DOI: [10.1016/j.uct.2008.02.001](https://doi.org/10.1016/j.uct.2008.02.001)

HARI, P. (2008) Introduction. In: Hari P., Kulmala L. (eds) Boreal Forest and Climate Change. **Advances in Global Change Research**, vol 34. Springer, DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8718-9_1

HAROON, M.; TAHIR, M.; NAWAZ, H.; MAJEED, M. I.; AL-SAAD, A. A. Surface-enhanced raman scattering (SERS) spectroscopy for prostate cancer diagnosis: A review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. 37 (2022) 102690. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102690>

HOLDEN, J. A.; ROLFSON, D. H.; WITTEWER, C. T. Human DNA topoisomerase II: evaluation of enzyme activity in normal and neoplastic tissues. **Biochemistry**. 29 (1990) 2127. DOI: [10.1021/bi00460a024](https://doi.org/10.1021/bi00460a024)

HU, Y. J.; YANG, Y. O.; DAI, C. M.; LIU, Y. Site-selective binding of human sérum albumin by palmatine: Spectroscopic approach. **Biomacromolecules**. 11 (2010) 106 – 112. DOI: [10.1021/bm900961e](https://doi.org/10.1021/bm900961e)

HUANG, S.; QIU, H.; XIE, J.; HUANG, C.; SU, W. Systematical investigation of in vitro molecular interaction between fluorescent carbon dots and human sérum albumin. **Royal Society of Chemistry**. 6 (2016) 44531 - 44542. DOI: [10.1039/c6ra01386d](https://doi.org/10.1039/c6ra01386d)

HUANG, Z.H.; ZHUO, S.T.; LI, C. Y.; XIE, H.T.; LI, D.; TAN, J. H., OU, T. M.; HUANG, Z. S. Design, synthesis and biological evaluation of novel mansonone E derivatives prepared via CuAAC click chemistry as topoisomerase II inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 68 (2013) 58 - 71. DOI: 10.1016/j.ejmech.2013.07.011

IACOPETTA, D. CAROCCI, A. SINICROPI, M. S. Old Drug Scaffold, New Activity: Thalidomide Correlated Compounds Exerting Different Effects on Breast Cancer Cell Growth and Progression. **ChemMedChem**. 12 (2017) 381 – 389. DOI: 10.1002/cmdc.201600629

IHMELS, H.; OTTO, D. Intercalation of Organic Dye Molecules into Double-Stranded DNA – General Principles and Recent Developments. **Topics in Current Chemistry**. 258 (2005) 161 – 204. DOI: 10.1007/b135804

INABA, H.; PUI, C. H. Advances in the diagnosis and treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Clinical Medicine**. 10 (2021) 1926. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm10091926>

ISLAM, M.S.; PARK, S.; SONG, C.; KADI, A.A. Fluorescein hydrazones: A series of novel non-intercalative topoisomerase II α catalytic inhibitors induce G1 arrest and apoptosis in breast and colon cancer cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 8870 (2016) 30732-2. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.09.004

JACOB, I.T.T.; GOMES, F. O. S.; MIRANDA, M.D.S.; ALMEIDA, S.M.V.; CRUZ-FILHO, I.J.; PEIXOTO, C.A. Anti-inflammatory activity of novel thiosemicarbazone compounds indole-based as COX inhibitors. **Pharmacological Reports**. 73 (2021) 907 - 925. DOI: <https://doi.org/10.1007/s43440-021-00221-7>

JALALI, F.; DORRAJI, P. S.; MAHDIUNI, H. Binding of the neuroleptic drug, gabapentin, to bovine serum albumin: Insights from experimental and computational studies. **Journal of Luminescence**. 148 (2014) 347 – 352. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2013.12.046>

JANGIR, D.K.; DEY, S.K.; KUNDU, S.; MEHROTRA, R. Assessment of amsacrine binding with DNA using UV–visible, circular dichroism and Raman spectroscopic techniques. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. 114 (2012) 38 – 43. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2012.05.005

JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M.M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global cancer statistics, CA: a cancer journal for clinicians. **ACS Journals**. 61 (2011) 69 - 90. DOI: 10.3322/caac.20107

JOULE J.; MILLS, K. Indole: Reactions e synthesis. In: *Heterocyclic Chemistry*. 5 (2010) 373 - 400. ISBN: 978-1-405-19365-8

KADAYAT, T.M.; PARK, C.; JUN, K.Y.; MAGAR, T.B.T. Hydroxylated 2,4-diphenyl indenopyridine derivatives as a selective non-intercalative topoisomerase II α catalytic inhibitor. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 90 (2015) 302 - 314. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.11.046

KAMADA, S.; TAKELWA, T.; IKEDA, K.; HORLE-INOUE, K. Long Non-coding RNAs Involved in metabolic alterations in breast and prostate cancers. **Frontiers in Oncology**. 10 (2020) 593200. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.593200>

KASHANIAN, S.; DOLATABADI, E.N. DNA binding studies of 2-tert-butylhydroquinone (TBHQ) food additive. **Food Chem**. 116 (2009) 743 – 747. DOI: [10.1016/j.foodchem.2009.03.027](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.027)

KAUR, M.; LOVELEEN; KUMAR, R. Inhibition of histone deacetylases, topoisomerases and epidermal growth factor receptor by metal-based anticancer agents: Design & synthetic strategies and their medicinal attributes. **Bioorganic Chemistry**. 105 (2020) 104396. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104396>

KAUSHIK, N.K.; KAUSHIK, N.; ATTRI, P.; KUMAR, N.; KIM, C.H.; VERMA, A.K.; CHOI, E.H. Biomedical Importance of Indoles. **Molecules**. 18 (2013) 6620 – 6662. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules18066620>

KELES, T.; BARUT, B.; ÖZEL, A.; BIYIKLIOGLU, Z. Synthesis of water soluble silicon phthalocyanine, naphthalocyanine bearing pyridine groups and investigation of their DNA interaction, topoisomerase inhibition, cytotoxic effects and cell cycle arrest properties. **Dyes and Pigments**. 164 (2019) 372 – 383. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.01.044>

KHAJEH, M. A.; DEGHAN, G.; DASTMALCHI, S.; SHAGHAGHI, M.; IRANSHAHI, M. Spectroscopic profiling and computational study of the binding of tschimgine: A natural monoterpene derivative, with calf thymus DNA. **Espectrochimica acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. 192 (2018) 384 – 392. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.11.042>

KHAN, G. S.; SHAH, A.; REHMAN, Z.; BARKER, D. Chemistry of DNA minor groove binding agents. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. 115 (2012) 105-118. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2012.07.003>

KSIXSI, R.; ESSID, A.; KOUKA, S.; BOUJELBONE, F.; DAOUDI, M. Synthesis and characterization of a tetra-(benzylammonium) dihydrogen decavanadate dihydrate compound inhibiting MDA-MB-231 human breast cancer cells proliferation and migration. **Journal of Molecular Structure**. 1250 (2022) 131929. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131929>

KUMAR, S.; CHIDANANDA, B.; KUMAR, V.; CHANDRA. Crystal structure, Hirshfeld analysis and HSA interactions studies of *N'*-[(E)-(5-bromothiophen-2-yl)methylidene]-3-hydroxynaphthalene-2-carbhydrazide. **Journal of Molecular Structure**. 1189 (2019) 343 – 351. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.03.070>

KUNOS, C.A.; RADIVOYEVITCH, T.; WAGONER, S.; DEBERNARDO, R. Radiochemotherapy plus 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP, NSC #663249) in advanced-stage cervical and vaginal cancers. **Gynecologic Oncology**. 130 (2013) 75 – 80. DOI: [10.1016/j.ygyno.2013.04.019](https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2013.04.019)

KUPER, H.; ADAMI, H. O.; TRICHOPOULOS, D. Infections as a major preventable cause of human cancer. **Journal of internal medicine**. 248 (2001) 171 -183. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.2000.00742.x>

KURUVILLA, E.; JOSEPH, J.; RAMAIAH, D. Novel bifunctional acridine-acridinium conjugates: synthesis and study of their chromophore-selective electron-transfer and DNA-binding properties. **J. Phys. Chem. B**. 109 (2005) 21997 - 22002. DOI: 10.1021/jp0543532

LAFAYETTE, E.A.; ALMEIDA, S.M.V.; SANTOS, R.V.C.S.; OLIVEIRA, J.F.; AMORIM, C.A.C. Synthesis of novel indole derivatives as promising DNA-binding agents and evaluation of antitumor and antitopoisomerase I activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 136 (2017) 511 - 522. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.05.012

LAKOWICZ, J. R. **Princípios de espectroscopia de fluorescência**. Springer Science & Business Media, 2013.

LEI, X.; HU, X.; ZHANG, T.; ZHANG, J. HMGB1 release promotes paclitaxel resistance in castration-resistant prostate cancer cells via activating c-Myc expression. **Cellular Signalling**. 72 (2020) 109631. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109631>

LEVESQUE, C.; NELSON, P. S. Cellular constituents of the prostate stroma: Key contributors to prostate cancer progression and therapy resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. 8 (2018) a030510. DOI: 10.1101/cshperspect.a030510

LEWIN, A.; STOREY, P.; MOCCALDI, M.; MOY, L.; KIM, S. G. Fatty acid composition in mammary adipose tissue measured by Gradientecho Spectroscopic MRI and its association with breast cancers. **European Journal of Radiology**. 116 (2019) 205 – 211. DOI: 10.1016/j.ejrad.2019.04.024

LI, Y.; CHEN, S.; ZHU, J.; ZHENG, C.; WU, M. Lovastatin enhances chemosensitivity of paclitaxel-resistant prostate cancer cells through inhibition of CYP2C8. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 589 (2022) 85 – 91. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.12.007>

LI, X.; YANG, Z. Interaction of oridonin with human serum albumin by isothermal titration calorimetry and spectroscopic techniques. **Chemico-Biological interactions**. 232 (2015) 77 – 84. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.03.012>

LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**. 2 (2007) 329 – 333. DOI: 10.1038/nprot.2007.30

LIM, K.H.; HIRAKU, O.; KOMIYAMA, K.; KAM, T.S. Jerantinines A-G, Cytotoxic Aspidosperma Alkaloids from *Tabernaemontana corymbosa*. **Journal of Natural Products**, 71 (2008) 1591-1594. DOI: 10.1021/np800435c

LIMA, L.M. Química Medicinal Moderna: desafios e contribuição brasileira. **Química Nova**. 30 (2007) 1456 – 1468.

- LIMA, L.M.; BARREIRO, E.J. Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design. **Current Medicinal Chemistry**. 12 (2005) 23 – 49. DOI: 10.2174/0929867053363540
- LIU, H.; XIE, H. Q.; ZHAO, Y.; ZHANG, W.; ZHANG, Y. DNAmethylation-mediate down-regulation of TMEM30 promotes cell migration in breast cancer. **Acta Histochemica**. 123 (2021) 151814. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2021.151814>
- LIU, B. M.; BAI, C. L.; ZHANG, J.; LIU, Y.; DONG, B. Y. In vitro study on the interaction of 4,4-dimethylcurcumin with calf thymus DNA. **Journal of Luminescence**. 166 (2015) 48 – 53. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.jlumin.2015.04.037>
- LIU, H. K.; SADLER, P. J. Metal complexes as DNA intercalators. **Accounts of Chemical Research**. 44 (2011) 349 – 359. DOI: 10.1021/ar100140e
- LONG, J.; WANG, X.; XU, D.; DING, L. Spectroscopic studies on the interaction mechanisms of safranin T with herring sperm DNA using acridine orange as a fluorescence probe. **Journal of Molecular Recognition** 27 (2014) 131 – 137. DOI: 10.1002/jmr.2341
- LONG, X.; ZENG, Y.F.; LIU, Y. LIU, Y., LI, T. Synthesis of novel genistein amino acid derivatives and investigation on their interactions with bovine serum albumin by spectroscopy and molecular docking. **RSC Adv**. 8 (2018) 31201 – 31212. DOI: <https://doi.org/10.1039/C8RA06691D>
- LUBEGA, J.; HALLMAN, M. D.; LUPO, P. J.; FU, Y. Association of population mixing and acute lymphocytic leucemia in children and Young adults. **Cancer Epidemiology**. 66 (2020) 101722. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.canep.2020.101722>
- MADEDDU, C.; GRAMIGNANO, G.; FLORIS, C.; MURENU, G.; MACCIÒ, A. Role of inflammation and oxidative stress in post-menopausal oestrogen-dependent breast cancer. **Journal of cellular and molecular medicine**. 18 (2014) 2519 – 2529. DOI: 10.1111 / jcmm.12413.
- MAJI, B.; BHATTACHARYA, S. Advances in the molecular design of potential anticancer agents via targeting of human telomeric DNA. **Journal Chemistry Soc. Sect. D**. 49 (2014) 6422 - 6438. DOI: <https://doi.org/10.1039/C4CC00611A>
- MAMMOTO, T. & INGBER, D.E. Mechanical control of tissue and organ development. **Development**. 137 (2010) 1407 – 1420. DOI: 10.1242/dev.024166
- MANDA, G.; ISVORANU, G.; COMANESCU, M.V.; MANEA, A.; DEBELEC, B. The redox biology network in cancer pathophysiology and therapeutics. **Redox Biology**. 5 (2015) 347 – 357. DOI: 10.1016/j.redox.2015.06.014
- MARKO, J.F. Biophysics of protein-DNA interactions and chromosome organization, **Physica A**. 418 (2015) 126 - 153. DOI: 10.1016/j.physa.2014.07.045
- MENYHÁRT, O.; HARAMI-PAPP, H.; SUKUMAR, S.; SCHÄFER, R.; MAGNANI, L.; DE BARRIOS, O.; GYORFFY, B. Guidelines for the selection of functional assays to evaluate

the hallmarks of cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1866 (2016) 300 – 319. DOI: 10.1016/j.bbcan.2016.10.002

MERCADO, V. S.; PEREZ, M. M.; RIO, M. J. D.; FOX, J. E. Cannabinoid CP55940 selectively induces apoptosis in jurkat cells and in ex vivo T-cell acute lymphoblastic leukemia through H₂O₂ signaling mechanism. **Leukemia Research**. 95 (2020) 106389. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2020.106389>

MOREIRA, M. B.; FRANCISCATO, D. F.; TOLEDO, K. C. F.; SOUZA, J. R. B. Investigation of the fluorescence quenching of bovine and human serum albumin by ruthenium complex. **Química Nova**. 38 (2015) 227 – 232. DOI: <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140315>

MOSES, C.; GARCIA-BLOJ, B.; HARVEY, A. R.; BLANCAFORT, P. Hallmarks of cancer: The CRISPR generation. **European Journal of Cancer**. 93 (2018) 10 -18. DOI: 10.1016/j.ejca.2018.01.002

MUNIR, M.T.; PONCE, C.; POWELL, C.A.; TARAFDAR, K.; YANAGITA, T. The contribution of cholesterol and epigenetic changes to the pathophysiology of breast cancer. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. 183 (2018) 1 – 9. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2018.05.001

MURRAY, C. W.; BLUNDELL, T. L. Structural biology in fragment-based drug design. **Current Opinion in Structural Biology**. 20 (2010) 497 – 507. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2010.04.003>

MURRAY, C. W.; REES, D. C. The rise of fragment-based drug Discovery. **Nature Chemistry**. 1 (2009) 187 – 192. DOI:10.1038/nchem.217

NAYAKA, S.; GAONKARA, S. L.; MUSAD, E. A.; DAWSAR, A. M. A. L. 1,3,4-Oxadiazole-containing hybrids as potential anticancer agents: Recent developments, mechanism of action and structure-activity relationships **Journal of Saudi Chemical Society**. 25 (2021) 101284. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2021.101284>

NEPALI, K.; SHARMA, S.; SHARMA, M.; BEDI, P.M.S. Rational approaches, design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for anticancer hybrids. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 77 (2014) 422 – 487. DOI:

NIKHILA, G. N.; DALIMBA, U.; KUMSI, M.; Facile synthesis of indole-pyrimidine hybrids and evaluation of their anticancer and antimicrobial activity. **Journal of Saudi Chemical Society**. 21 (2015) 761 – 775. DOI: 10.1016/J.JSCS.2015.09.003

NIMAL, R.; SHAH, A.; SADDIQ, M. Thermodynamic characterisation of triazol ylimino-DNA interaction by UV-Vis spectroscopy. **Journal of Photochemistry and Photobiology**. 2 (2020) 100006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jap.2020.100006>

NOREEN, T.; TAHA, M.; IMRAN, S.; CHIGURUPATI, S.; RAHIM, F. Synthesis of alpha amylase inhibitors based on privileged indole scaffold. **Bioorganic chemistry**. 72 (2017) 248 -255. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.04.010>

OLIVEIRA, J.F.; LIMA, T.S.; COSTA, D.B.V.; PEDROSA, S.C.B.J.; LAFAYETTE, E.A.; SILVA, R.M.; ALMEIDA, S.M.V.; MOURA, R.O.; RUIZ, A.L.T.G.; CARVALHO, J.E.; LIMA, M.C.A. Thiosemicarbazones and 4-thiazolidinones indole-based derivatives: Synthesis, evaluation of antiproliferative activity, cell death mechanisms and topoisomerase inhibition assay. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 136 (2017) 305 - 314. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.05.023

OLIVEIRA, J.F.; SILVA, A.L.; VENDRAMINI-COSTA, D.B.; AMORIM, C.A.C.; CAMPOS, J.F. Synthesis of thiophene-thiosemicarbazone derivatives and evaluation of their in vitro and in vivo antitumor activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 104 (2015) 148 – 156. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.09.036

OMS. Organização mundial de saúde. Câncer. Disponível em: < <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> > Acesso em: 05 jan. 2022.

PARVEEN, S.; JAFRI, S.; KHAN, H. Y.; TABASSUM, S. Elucidating the interaction of enantiomeric Cu(II) complexes with DNA, RNA and HSA: A comparative study. **Polyhedron**. 210 (2021) 115501. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.poly.2021.115501>

PENG, Y.; LI, H.; FU, Y.; GUO, S.; QU, C.; ZHANG, Y. JAM2 predicts a good prognosis and inhibits invasion and migration by suppressing EMT pathway in breast cancer. **International Immunopharmacology**. 103 (2022) 108430. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108430>

PICKUP, M.W.; MOUW, J.K.; WEAVER, V.M. The extracellular matrix modulates the hallmarks of câncer. **EMBO reports**. 15 (2014) 1243 - 1253. DOI: 10.15252/embr.201439246

PIJUAN, J.; BARCELÓ, C.; MORENO, D. F.; MALQUES, O. In vitro cell migration, invasion, and adhesion assays: From cell imaging to data analysis. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**. 7 (2019) DOI: 10.3389/fcell.2019.00107

POMMIER, Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. **Nature Reviews Cancer**. 6 (2006) 789 – 802. DOI: 10.1038/nrc1977

PYLAYEVA, Y.; GILLEN, K.M.; GERALD, W.; BEGGS, H.E.; REICHARDT, L.F.; GIANCOTTI, F.G. Ras- and PI3K-dependent breast tumorigenesis in mice and humans requires focal adhesion kinase signaling. **The Journal of Clinical Investigation**. 119 (2009) 252 – 266. DOI: 10.1172/JCI37160

QAIS, F. A.; AHMAD, I. In vitro interaction of cefotaxime with calf thymus DNA: Insights from spectroscopic, calorimetric and molecular modelling studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 149 (2018) 193 – 205. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.10.016>

QUEIROZ, M.J.R.P.; ABREU, A.S.; CARVALHO, M.S.D.; FERREIRA, P.M.T.; NAZARETH, N.; NASCIMENTO, M.S.J. Synthesis of new heteroaryl and heteroannulated indoles from dehydrophenylalanines: Antitumor evaluation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 16 (2008) 5584 – 5589. DOI: 10.1016/j.bmc.2008.04.004

RAJA, D. S.; BHUVANESH, N. S. P.; NATARAJAN, K. DNA binding, protein interaction, radical scavenging and cytotoxic activity of 2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carbaldehyde(2'-hydroxybenzoyl)hydrazone and its Cu(II) complexes: A structure activity relationship study. **Inorganica Chimica Acta**. 385 (2012) 81 – 83. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ica.2011.12.038>

RAJA, V.J.; LIM, K.H.; LEONG, C.O.; KAM, T.S.; BRADSHAW, T.D. Novel antitumour indole alkaloid, Jerantinine A, evokes potente G2/M cell cycle arrest targeting microtubules. **Invest New Drugs**. 32 (2014) 838 – 850. DOI:10.1007/s10637-014-01261

RAMADA, M.; ELSHAIER, T. A.M. M.; ALY, A. A.; ABDEL-AZIZ, M. Development of 2'-aminospiro[pyrano[3,2-c]quinoline]-3-carbonitrile derivatives as non-ATP competitive Src kinase inhibition that suppress breast cancer cell migration and proliferation. **Bioorganic Chemistry**. 11 (2021) 105344. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioor.2021.105344>

RAVASAN, S. M.; MADADI, E.; MOHAMMADI, A.; MANSOORI, B.; AMINI, M. Yarrowia lipolytica L-asparaginase inhibits the growth and migration of lung (A549) and breast (MCF7) cancer cells. **International Journal of Biological Macromolecules**. 170 (2021) 406 – 414. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.141>

REHMAN, S. U.; SARWAR, T.; ISHQI, H. M.; HUSAIN, M. A.; HASAN, Z. Deciphering the interactions between chlorambucil and calf thymus DNA: a multi-spectroscopic and molecular docking study. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 566 (2015) 7 – 14. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2014.12.013>

RIBEIRO, A. G.; ALVES, J. E. F.; SOARES, J. C. S.; SANTOS, K. L. JACOB, I. T. T. Albumin roles in developing anticancer compounds. **Medicinal Chemistry Research**. 30 (2021) 1469 - 1495. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00044-021-02748-z>

RIBEIRO, A. G.; ALMEIDA, S. M. V.; OLIVEIRA, J. F.; SOUZA, T. R. C. L.; SANTOS, K. L. Novel 4-quinoline-thiosemicarbazone derivatives: Synthesis, antiproliferative activity, in vitro and in silico biomacromolecule interaction studies and topoisomerase inhibition. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 182 (2019) 111592. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111592>

ROULOT, A.; HÉQUET, D.; GUINEBRETIÈRE, J.M.; LEREBOURS, F. Hétérogénéité tumorale des cancers du sein. **Tumoral heterogeneity of breast cancer**.74 (2016) 653 – 660. DOI: 10.1684/abc.2016.1192

RUSSO, M.M.; SUNDARAMURTHI, T. An Overview of Cancer Pain: Epidemiology and Pathophysiology. **Seminars in Oncology Nursing**. 35 (2019) 223 – 228. DOI: 10.1016/j.soncn.2019.04.002.

SABNIS, A.J.; BIVONA, T.G. Principles of Resistance to Targeted Cancer Therapy: Lessons from Basic and Translational Cancer Biology. **Trends in Molecular Medicine**. 25 (2019) 185 - 197. DOI: 10.1016/j.molmed.2018.12.009

SAFARULLA, S.; KHILLAR, P. S.; KINI, S.; JAISWAL, A. K. Tissue engineered scaffolds as 3D models for prostate cancer metastasis to bone. **Metrials Today Communications**. 28 (2021) 102641. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2021.102641>

- SAHA, S.; RAJ, V.; SINGH, A.K.; Indole-fused azepines and analogues as anticancer lead molecules: Privileged findings and future directions. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 142 (2017) 244 - 265. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.07.042
- SAMARI, F. et al. Affinity of Two Novel Five-Coordinated Anticancer Pt (II) Complexes to Human and Bovine Serum Albumins : A Spectroscopic Approach. **Inorganic Chemistry**. 51 (2012) 3454 – 3464. DOI: <https://doi.org/10.1021/ic202141g>
- SAYED, M.T.E.; AHMED, K.M.; MAHMOUD, K.; HILGEROTH, A Synthesis, evaluation and cytostatic structure-activity relationships of new bis-indolylmethanes and their corresponding tetrahydroindolocarbazoles. **European Journal of Medicinal Chemistry** 90 (2015) 845- 859. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.12.008
- SCARIM, C.B.; JORNADA, D.H.; MACHADO, M.G.M.; FERREIRA, C.M.R.; SANTOS, J.L. Thiazole, thio and semicarbazone erivatives against tropical infective diseases: Chagasdisease, human African trypanosomiasis (HAT), leishimaniases and malaria. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 162 (2019) 378 – 395. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.11.013
- SCHAFFHAUSEN, J. Advances in structure-based drug design. **Trends in Pharmacological Sciences**. 33 (2012). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.03.011>
- SCHIEWER, M. J.; KNUDSEN, K. E. Basic science and molecular genetics of prostate cancer aggressiveness. **Urologic Clinics of North America**. 48 (2021) 339 – 347. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2021.04.004>
- SERAFIM, R.A.M.; CONÇALVES, J.E.; SOUZA, F.P.; LOUREIRO, A.P.M.; STORPITIS, S. Design, synthesis and biological evaluation of derivatives of N-acylhydrazone bioisoster hybrids and furoxan groups with potential and selective anti-Trypanosoma cruzi activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 82 (2014) 418 – 425. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.05.077
- SERDA, M. KALINOWSKI, D. S.; RASKO, N. Exploring the Anti-Cancer Activity of Novel Thiosemicarbazones Generated through the Combination of Retro-Fragments: Dissection of Critical Structure-Activity Relationships. **Plos One**. 9 (2014) e110291. DOI: 10.1371/journal.pone.0110291
- SHAKEEL, P. M.; MANOGARAN, G. Prostate cancer classification from prostate biomedical data using ant rough set algorithm with radial trained extreme learning neural network. **Health and Technology**. 10 (2020) 157 – 165. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12553-018-0279-6>
- SHAMIM, F.; KANWAL; KHAN, F.A.; TAHA, M.; KHAN, K.M.; ARSHIA Synthesis and in vitro anti-proliferative capabilities of steroidal thiazole and indole derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**. (2019). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2019.05.001>
- SHI, J. H.; LOU, Y. Y.; ZHOU, K. L.; PAN, D. Q. Probing the behavior of calf thymus DNA upon binding to a carboxamide fungicide boscalid: insights from spectroscopic and molecular docking approaches. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**. 06 (2017) 1 – 8. DOI: 10.1080/07391102.2017.1365012

SHERER, C.; SNAPE, T. J. Heterocyclic scaffolds as promising anticancer agents against tumours of the central nervous system: Exploring the scope of indole and carbazole derivatives. **European journal of medicinal chemistry**. 97 (2015) 552 – 560. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.11.007>

SINGH, A.; SUKHMEET, K.A.; ANURADHA, S.B.; GURCHARAN, K. B.; BHATTI, R.; TNF-a and IL-6 inhibitors: Conjugates of N-substituted indole and aminophenylmorpholin-3-one as anti-inflammatory agents Palwinder. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 140 (2017) 92 - 103. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.09.003

SINGH, P.; KAUR, M.; HOLZER, W. Synthesis and evaluation of indole, pyrazole, chromone and pyrimidine based conjugates for tumor growth inhibitory activities e Development of highly efficacious cytotoxic agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 45 (2010) 4968 – 4982. DOI: 10.1016/j.ejmech.2010.08.004

SIQUEIRA, L. R. P.; GOMES, P. A. T. M.; FERREIRA, L. P. L.; RÊGO, M. J. B. M.; LEITE, A. C. L. Multi-target compounds acting in cancer progression: Focus on thiosemicarbazone, thiazole and thiazolidinone analogues. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 170 (2019) 237 – 260. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.03.024

SIRAJUDDIN, M.; ALI, S.; BADSHAH, A. Drug DNA interactions and their study by UV e Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry, **J. Photochem. Photobiol B**. 124 (2013) 1 -19. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.03.013>

SRAVANTHI, T.V.; MANJU, S.L. Indoles – A promising scaffold for drug development. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. 91 (2016) 1 – 10. DOI: 10.1016/j.ejps.2016.05.025.

STREKOWSKI, L.; WILSON, B. Noncovalent interactions with DNA: An overview. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**. 623 (2007) 3 -13. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2007.03.008

SU, W.; LI, Y.; XIAO, J.; ZHANG, Y.; LI, P. Synthesis, structure and antiproliferative activity of dinuclear ruthenium arene complexes with differently coordinated thiosemicarbazones. **Appl Organometal Chem**. 32 (2018) 4420. DOI: <https://doi.org/10.1002/aoc.4420>

SUBIA, B.; DAHIVA, U.R.; MISHRA, S.; AYACHE, J.; CASQUILLAS, G. V. Breast tumor-on-chip models: From disease modeling to personalized drug screening. **Journal of controlled release**. 331 (2021) 103 - 120. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.12.057>

SUHAIL, Y.; CAIN, M. P.; VANAJA, K.; KURYWCHAK, P. A. Systems biology of cancer metastasis. **Cell Systems**. 9 (2019) 109 – 127. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cells.2019.07.003>

QIU, Z.; XIAO, J.; ZHENG, S.; HUANGA, W.; DUA, T. Associations between functional polychlorinated biphenyls in adipose tissues and prognostic biomarkers of breast cancer patients. **Environmental Research**. 185 (2020) 109441. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109441>

TAKIMOTO, C.H.; CALVO, E. Principles of Oncologic Pharmacotherapy. **Cancer Network Home of the Journal Oncology**. 33 (2009) 1 – 4.

TEACHEY, D.; PUI, C. H. Comparative features and outcomes between paediatric t-cell and B-cell acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet**. 20 (2019) e145 – e154. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30031-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30031-2)

TIWARI, V.K.; BURGER, L.; NIKOLETOPOULOU, V.; DEOGRACIAS, R.; THAKURELA, S.; WIRBELAUER, C.; KAUT, J.; TERRANOVA, R.; HOERNER, L.; MIELKE C.; BOEGE, F.; MURR, R.; PETERS, A.H.; BARDE, Y.A.; SCHUBELER, D. Target genes of Topoisomerase IIbeta regulate neuronal survival and are defined by their chromatin state. **Proc. Natl Acad Sci U.S.A.** 109 (2012) 934 - 943. DOI: 10.1073/pnas.1119798109

TENÓRIO, R.P.; GÓES, A.J.S.; DE LIMA, J.G.; DE FARIA, A.R. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. **Química Nova**. 28 (2005) 1030 – 1037.

THAMILARASAN, V. et al. Synthesis, interactions, molecular structure, biological properties and molecular docking studies on Mn, Co, Zn complexes containing acetylacetone and pyridine ligands with DNA duplex. **Journal of Photochemistry and Photobiology**. 160 (2016) 110 – 120. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2016.03.018

TIAN, Z.; WANG, Z.; HAN, X.; WANG, N.; WANG, R. Study on the interaction between cannabiniol and DNA using acridine orange as a fluorescence probe. **Journal of Molecular Recognition**. 31 (2017) e2682. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmr.2682>

TORRE, L.A; BRAY, R.L.; SIEGEL, J.; FERLAY, J.; LORTET-TIEULENT, J.; JERNAL, A. Global cancer statistics. **Cancer J. Clin.** 65 (2015) 87 - 108. DOI: 10.3322/caac.21262.

UESAKA, T.; SHONO, T.; KUGA, D.; SUZUKI, S.O.; NIRO, H.; MIYAMOTO, K. Enhanced expression of DNA topoisomerase II genes in human medulloblastoma and its possible association with etoposide sensitivity. **Journal of neurooncol.** 84 (2007) 119 – 129. DOI: 10.1007/s11060-007-9360-0.

VALSTYAN, S.; WEINBERG, R. A. Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms. **Cell**. 147 (2011) 275 – 292. DOI: 10.1016/j.cell.2011.09.024

VENEMA, C.M.; BENSE, R.D.; STEENBRUGGEN, T.G.; NIENHUIS, H.H.; QIU, S.Q. Consideration of breast cancer subtype in androgen receptor targeting. **Pharmacology & Therapeutics**. 200 (2019) 135 – 147. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2019.05.005

VIDEIRA, M.; REIS, R.L.; BRITO, M.A. Deconstructing breast cancer cell biology and the mechanisms of multidrug resistance. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**. 1846 (2014) 312 - 325. DOI: 10.1016/j.bbcan.2014.07.011.

VIRCHOW, R. As Based upon Physiological and Pathological Histology. **Nutrition Reviews**. 47 (1989) 23 -25. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1989.tb02747.x>

VODICKA, P.; VONDEKOVA, S.; OPPATOVA, A.; VODICKOVA, L. DNA damage and repair measured by comet assay in cancer patients. **Mutat Res Gen Tox En.** 843 (2019) 95 – 110. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2019.05.009

WANG, G.; LI, R.; PARSEH, B.; DU, G. Prospects and challenges of anticancer agents' delivery via chitosan-based drug carriers to combat breast cancer: a review. **Carbohydrate Polymers**. 268 (2021) 118192. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118192>

WANG, X.; WANG, N.; ZHONG, L.; WANG, S.; ZHENG, Y. Prognostic value of depression and anxiety on breast cancer recurrence and mortality: a systematic review and meta-analysis of 282,203 patients. **Molecular Psychiatry**. 25 (2021) 3186 – 3197. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41380-020-00865-6>

WANG, Z. Z.; SHI, X. X.; HUANG, G. Y.; HAO, G. F. Fragment-based drug design facilitates selective kinase inhibitor Discovery. **Trends in Pharmacological Sciences**. 42 (2021) 551 – 565. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2021.04.001>

WANG, P.; DU, Y.; WANG, J. Identification of breast cancer subtypes sensitive to HCQ-induced autophagy inhibition. **Pathology - Research and Practice**. 215 (2019) 152609. DOI: [10.1016/j.prp.2019.152609](https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.152609)

WANG, X.; SUN, B.; WEI, L.; JIAN, X. Cholesterol and saturated fatty acids synergistically promote the malignant progression of prostate cancer. **Neoplasia**. 24 (2022) 86 – 97. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neo.2021.11.004>

WANG, J. C. Cellular roles of dna topoisomerases: a molecular perspective. **Nature Reviews - Molecular Cell Biology**. 3 (2002) 431 - 442. DOI: [10.1038/nrm831](https://doi.org/10.1038/nrm831)

WARSI, M. S.; HABIB, S.; TALHA, M.; MIR, A. R. Characterization of human serum albumin modified by hair dye component, 4-chloro-1,2-phenylenediamine: Role in protein aggregation, redox biology and cytotoxicity. **Journal of Molecular Liquids**. 331 (2021) 115731 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115731>

WEIGELT, B.; GHAJAR, C.M.; BISSELL, M.J. The need for complex 3D culture models to unravel novel pathways and identify accurate biomarkers in breast cancer. **Adv Drug Deliv Rev**. 0 (2014) 42 – 51. DOI: [10.1016/j.addr.2014.01.001](https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.01.001).

XIONG, X.; HUANG, J.; WANG, X. DNA binding studies of hematoxylin-Dy(III) complex by spectrometry using acridine Orange as a probe. **Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids**. 33 (2014) 730 – 745. DOI: [10.1080/15257770.2014.931589](https://doi.org/10.1080/15257770.2014.931589)

YAMUNA, E.; KUMAR, R.A.; ZELLER, M.; PRASAD, K.J.R. Synthesis, antimicrobial, antimycobacterial and structureactivity relationship of substituted pyrazolo-, isoxazolo-, pyrimido- and mercaptopyrimidocyclohepta [b]indoles. **European Journal of Medicinal Chemistry** 47 (2012) 228 – 238. DOI: [10.1016/j.ejmech.2011.10.046](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.10.046)

YANG, P.; ZHANG, L. L.; WANG, Z. Z.; ZHANG, D. D.; LIU, Y. M. Nickel complexes of aroylhydrazone ligand: Synthesis, Crystal structure and DNA binding properties. **Journal of Inorganic Biochemistry**. 203 (2020) 110919. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110919>

YANG, H.; TANG, P.; TANG, B.; HUANG, Y.; HE, J. Studies of DNA-binding properties of lafutidine as adjuvante anticancer agente to calf thymus DNA using multi-spectroscopic

approaches, NMR relaxation data, molecular docking and dynamical simulation. **International Journal of Biological Macromolecules**. 99 (2017) 79 – 87. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.062>

YASREBI, S. A.; TAKJOO, R.; RIAZI, G. H. HSA-interaction studies of uranyl complexes of alkyl substituted isothiosemicarbazone. **Journal of Molecular Structure**. 1193 (2019) 53 – 61. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.04.126>

YUTKIN, V.; CHIN, J. Apaziquone as an intravesical therapeutic agent for urothelial non-muscle-invasive bladder cancer. **Expert Opin. Investig. Drugs**. 21 (2012) 251 – 260. DOI: [10.1517/13543784.2012.646081](https://doi.org/10.1517/13543784.2012.646081)

ZANGAR, S.; WANI, T. A. Exploring the binding mechanism and adverse toxic effects of persistent organic pollutant (dicofol) to human serum albumin: A biophysical, biochemical and computational approach. **Chemico-Biological Interactions**. 350 (2021) 109707 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109707>

ZHAO, P.; GAO, G.; ZHANG, L.; CAI, Q.; LU, N. Drug-protein binding mechanism of juglone for early pharmacokinetic profiling: Insights from ultrafiltration, multi-spectroscopic and molecular docking methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 141 (2017) 262 – 269. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2017.03.036>

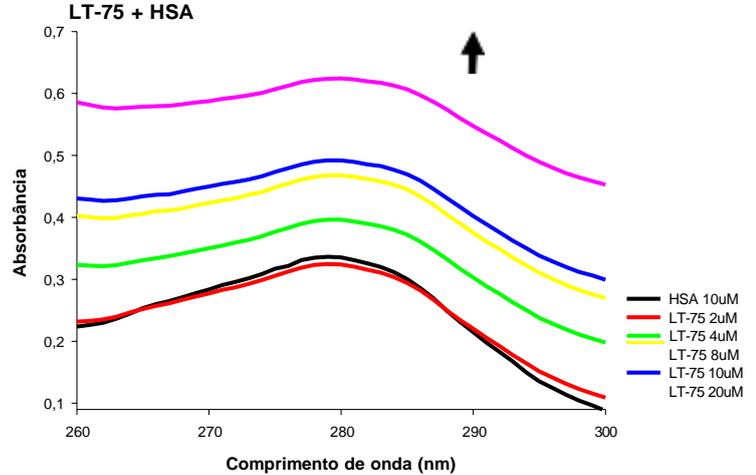
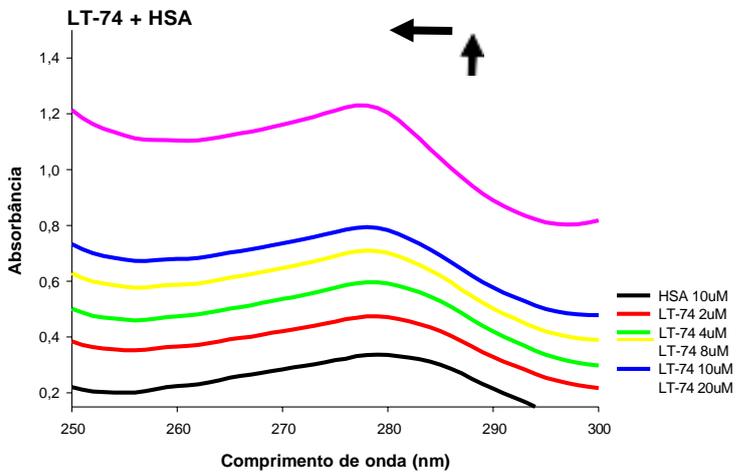
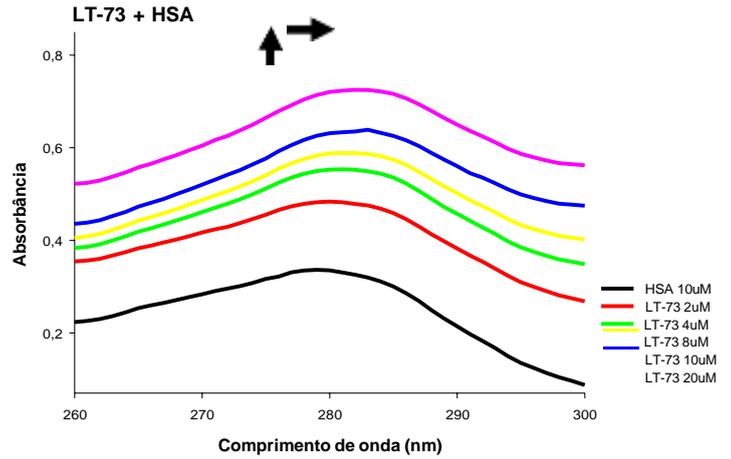
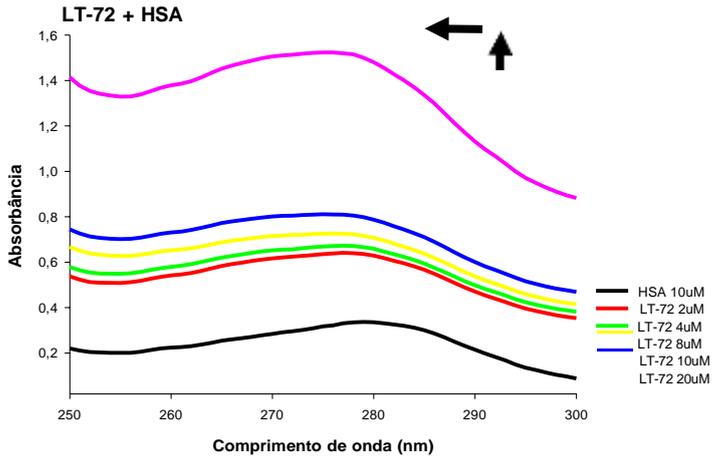
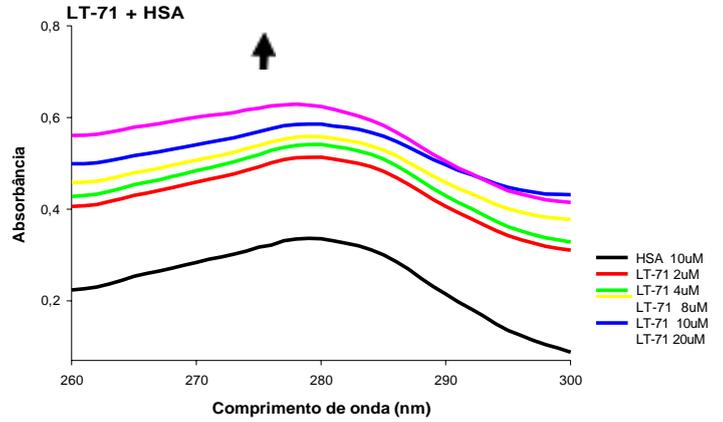
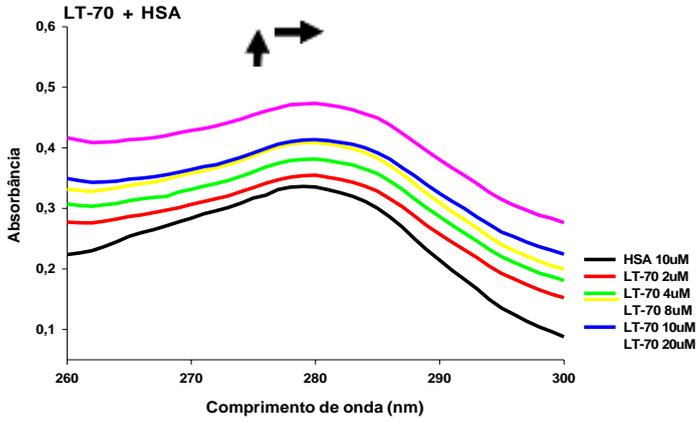
ZHAO, Y.; GUO, C.; WANG, L.; WANG, S.; LI, X. A novel fluorinated thiosemicarbazone derivative- 2-(3,4-difluorobenzylidene) hydrazinecarbothioamide induces apoptosis in human A549 lung cancer cells via ROS-mediated mitochondria-dependent pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 491 (2017) 65 – 71. DOI: [10.1016/j.bbrc.2017.07.042](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.07.042)

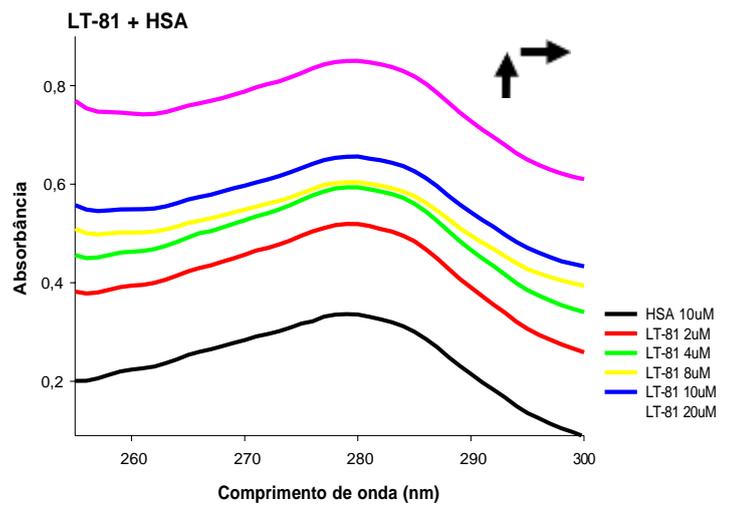
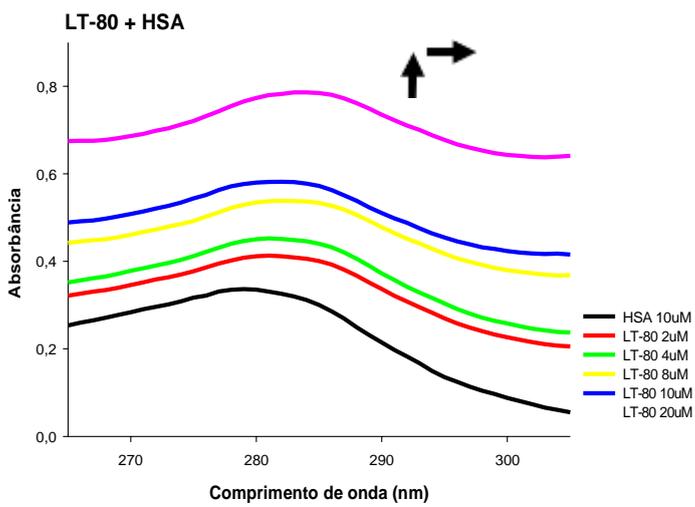
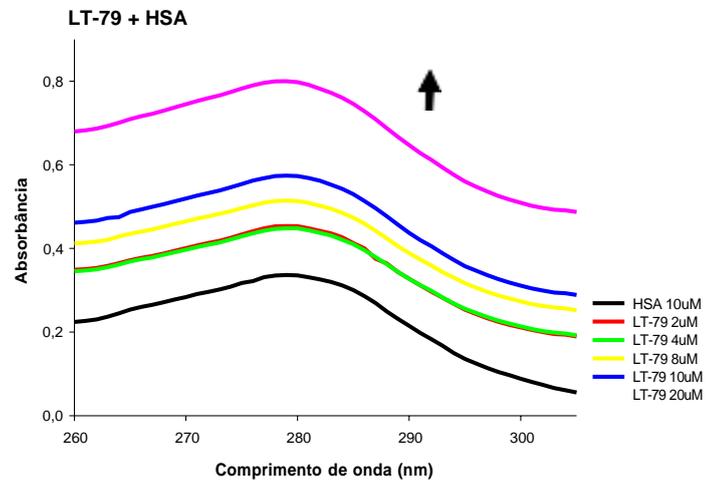
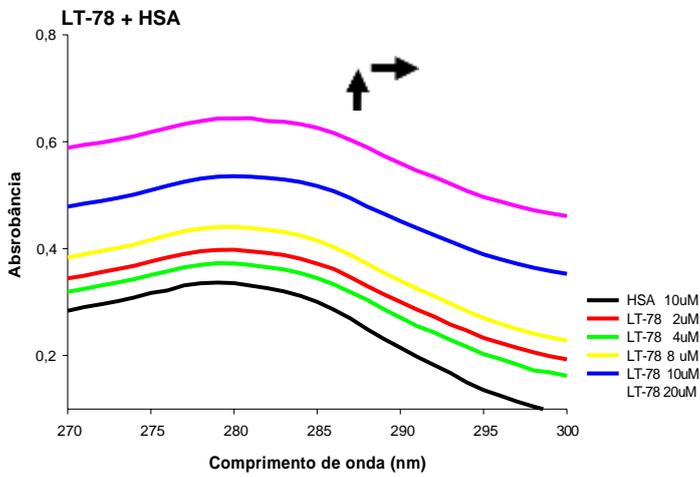
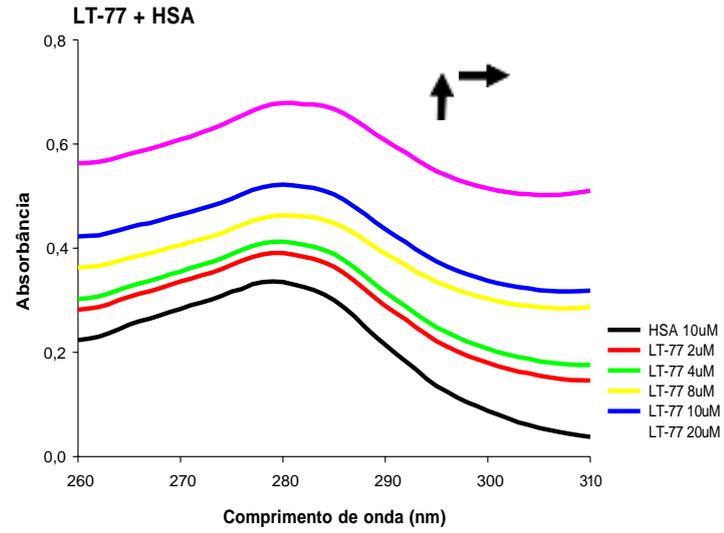
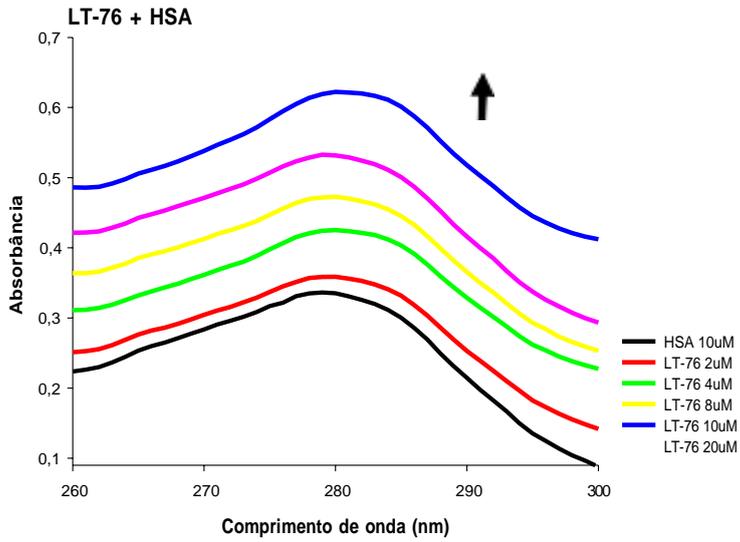
ZHANG, S.; LING, B.; QU, F.; SUN, X. Investigation on the interaction between luteolin and calf thymus DNA by spectroscopic techniques. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. 97 (2012) 521 – 525. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2012.06.040>

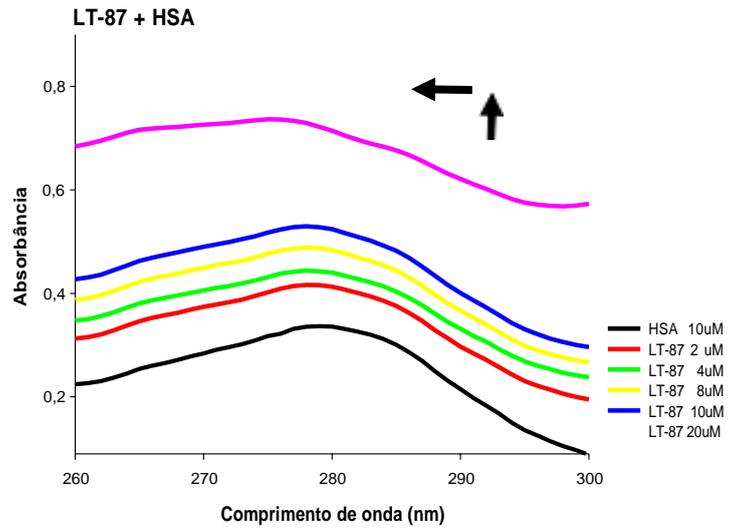
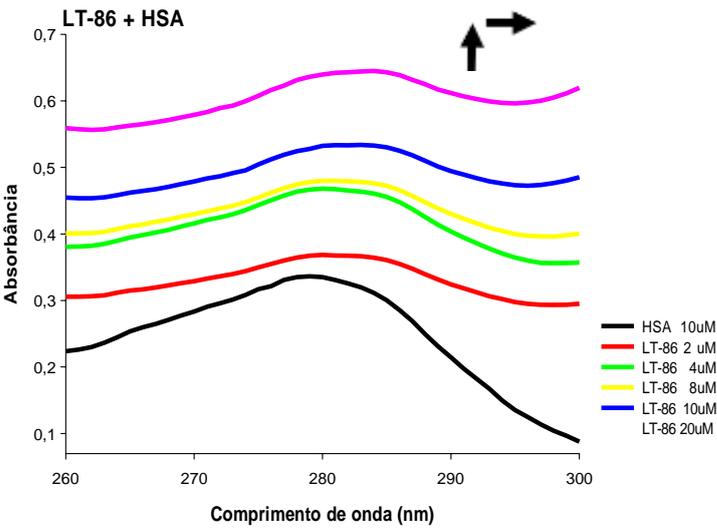
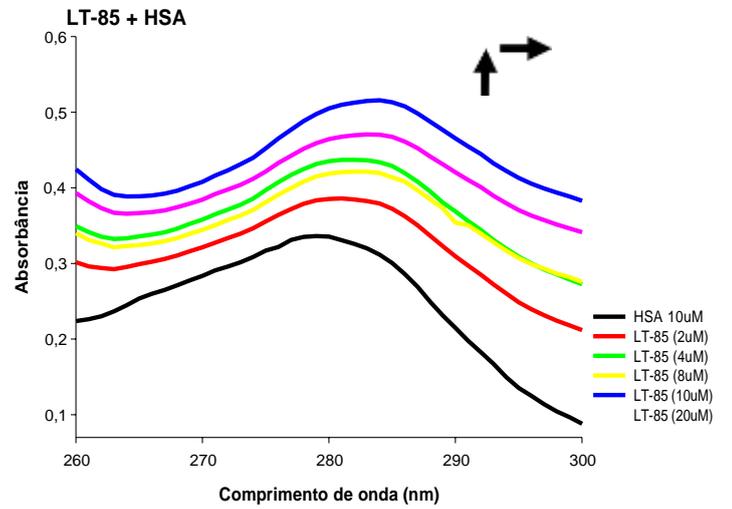
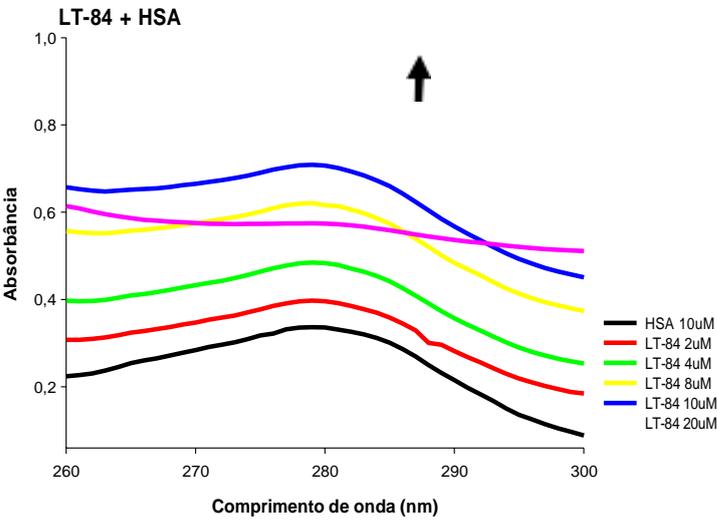
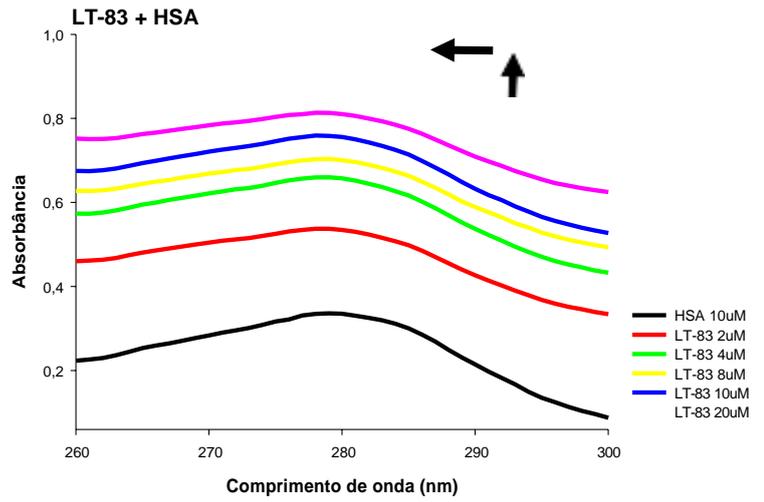
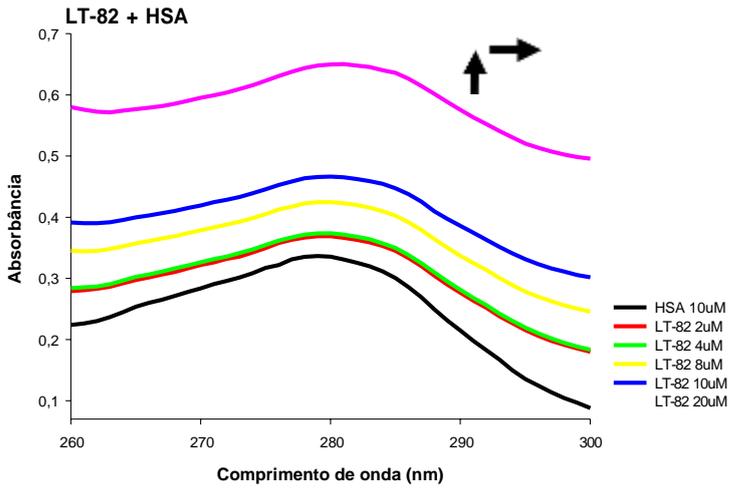
ZHANG, C.; LI, S.; JI, L.; LIU, S.; LI, Z.; LI, S.; MENG, X. Design, synthesis and antitumor activity of non-camptothecin topoisomerase I inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. 25 (2016) 4693 - 4696. DOI: [10.1016/j.bmcl.2015.06.042](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.06.042)

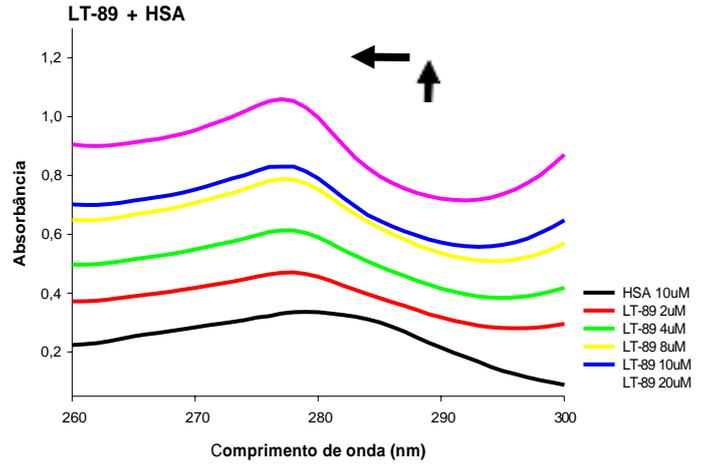
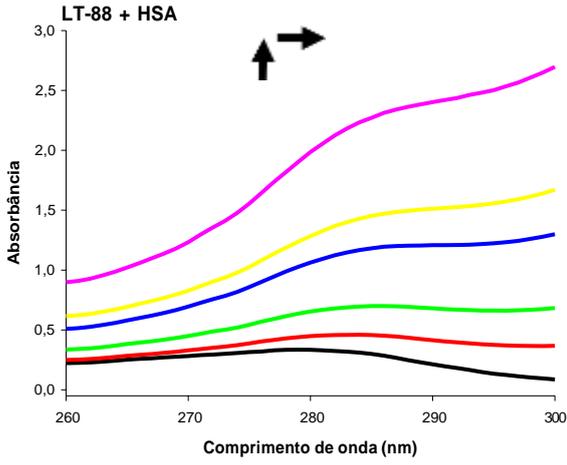
APÊNDICE A – ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV-VIS E EMISSÃO DA HSA COM OS DERIVADOS LT

UV-Vis + HSA

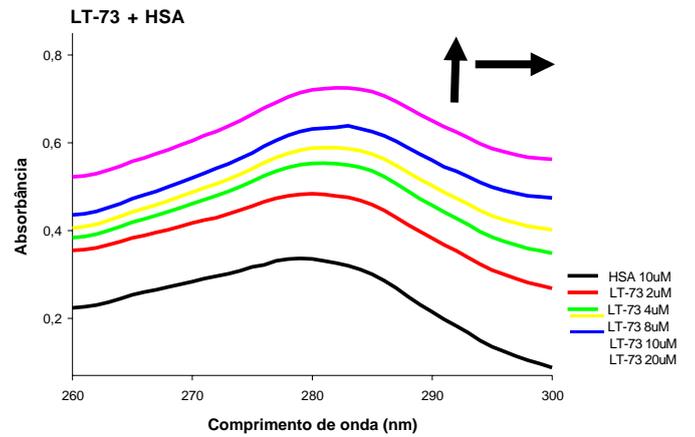
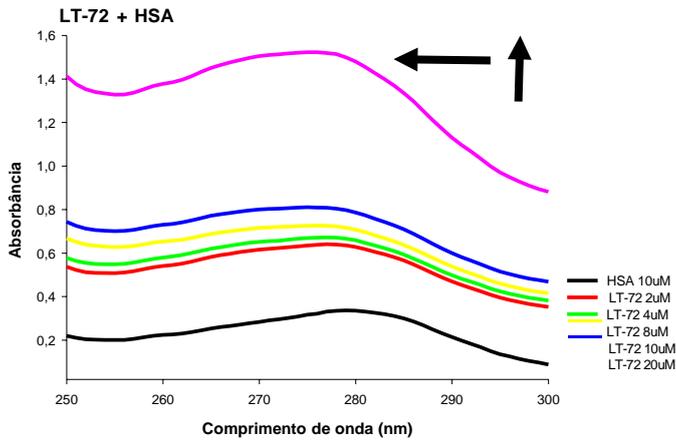
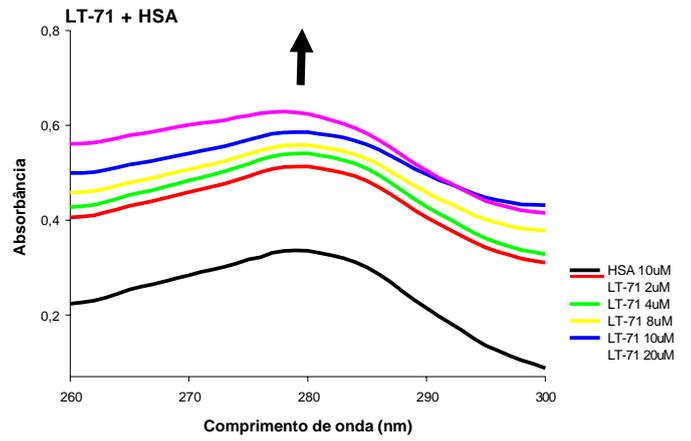
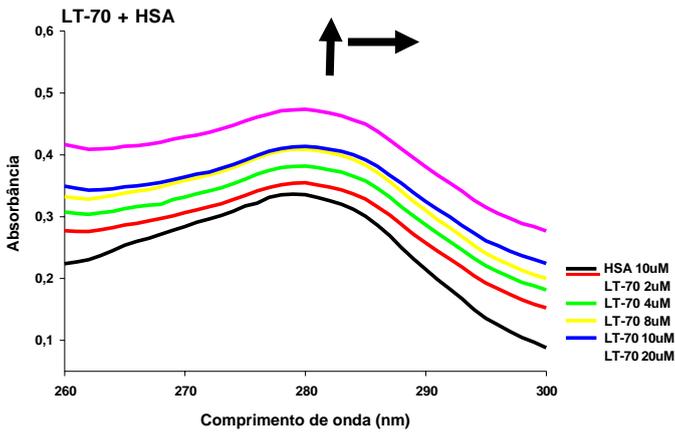


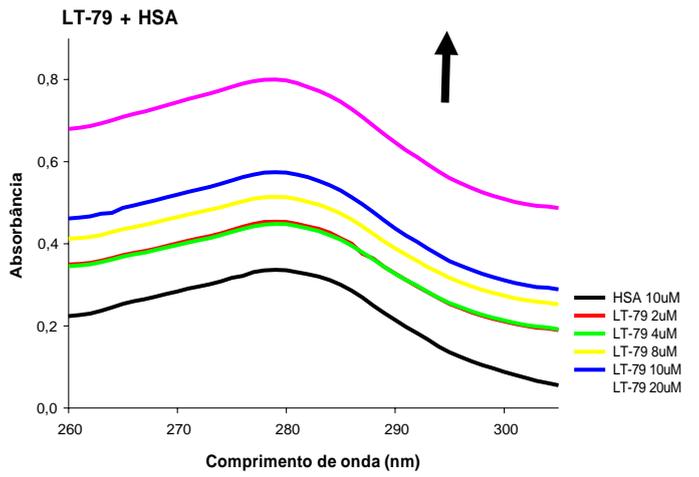
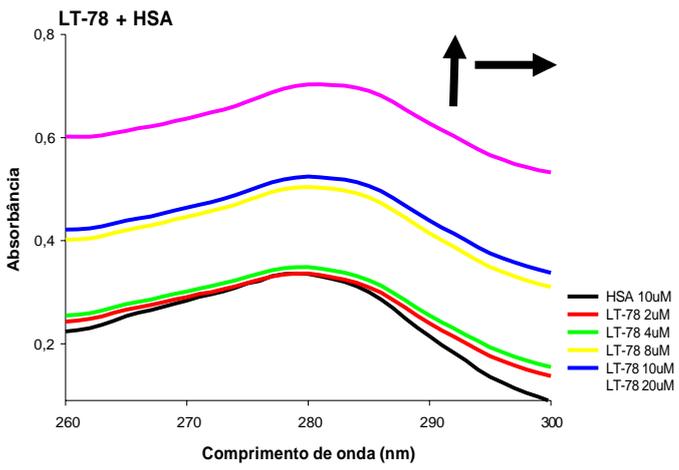
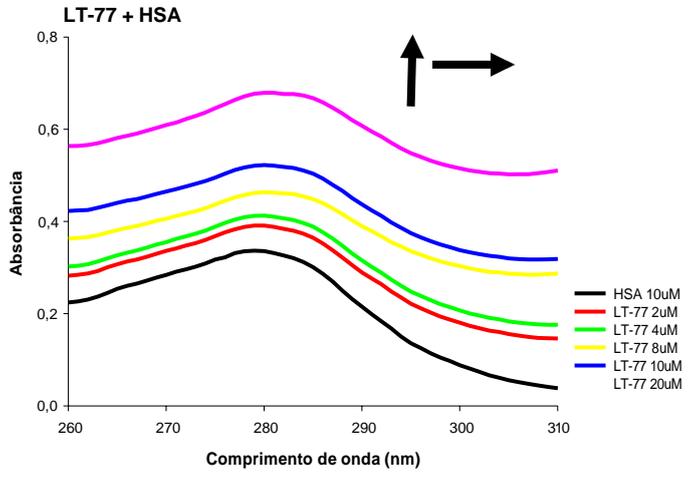
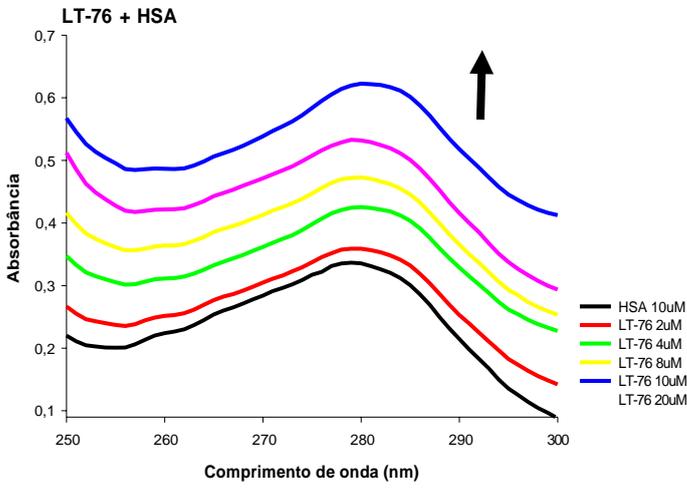
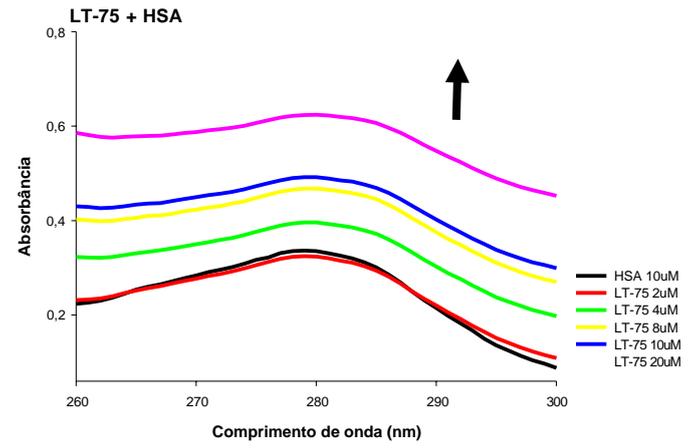
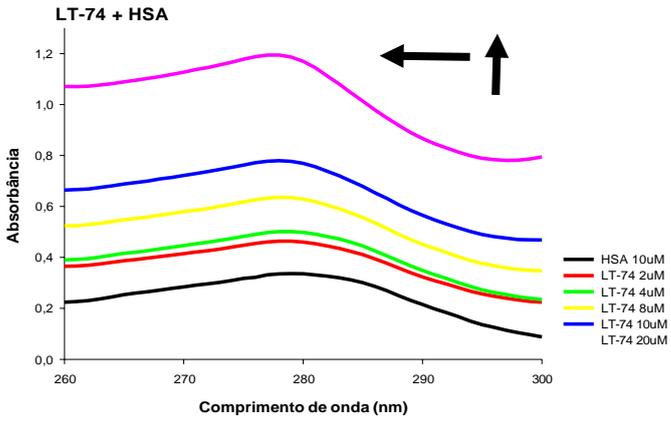


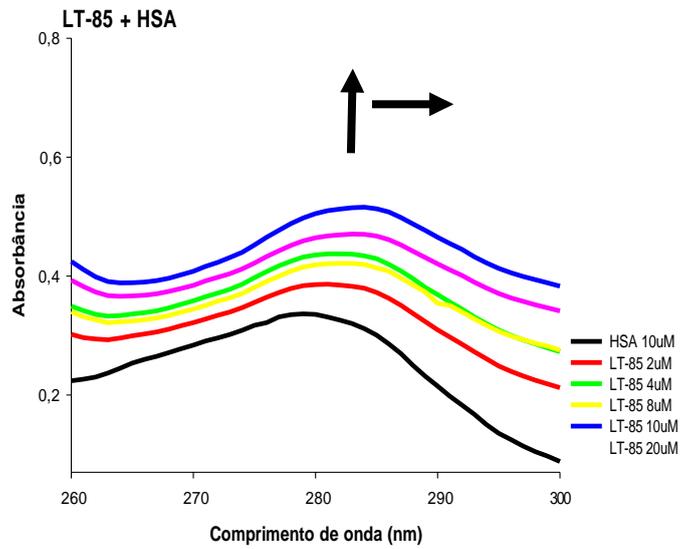
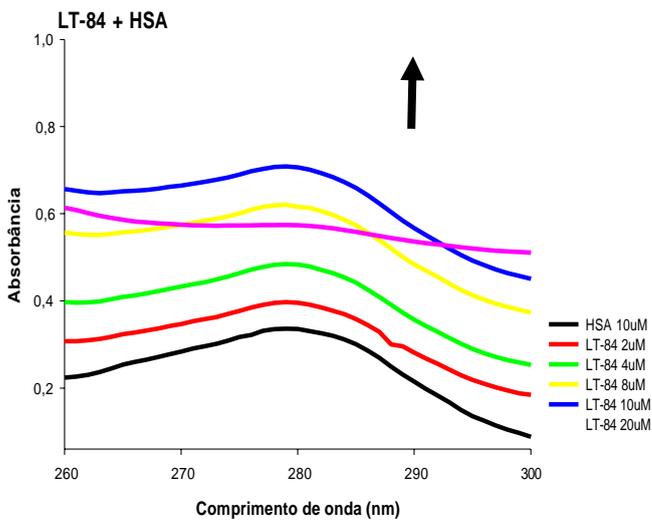
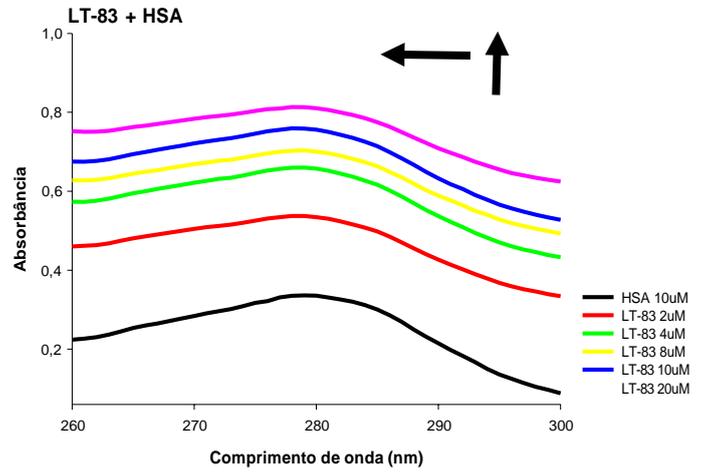
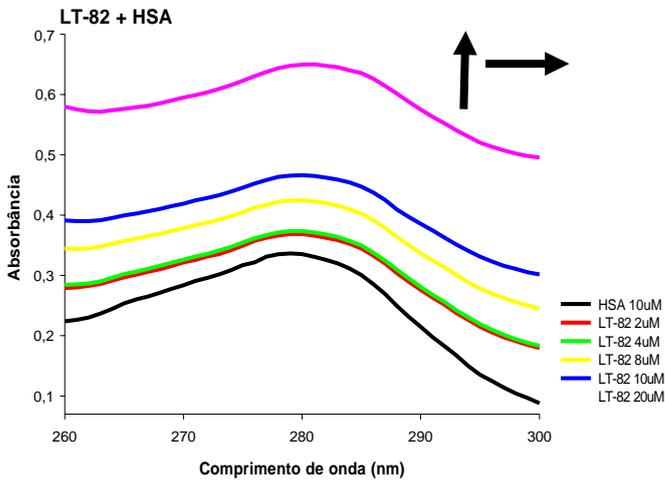
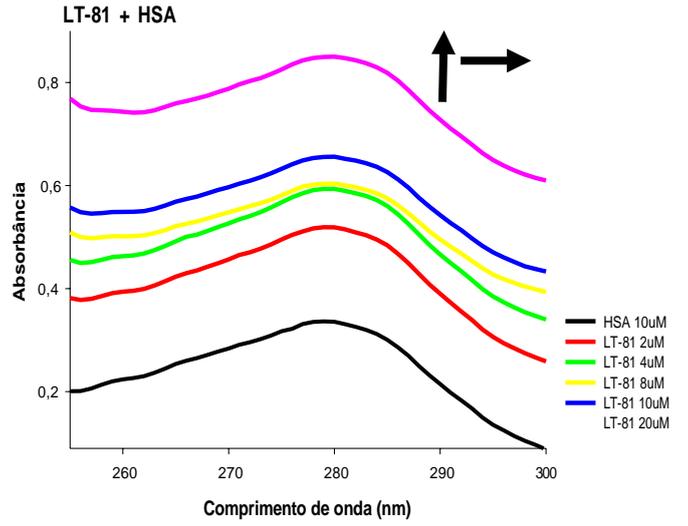
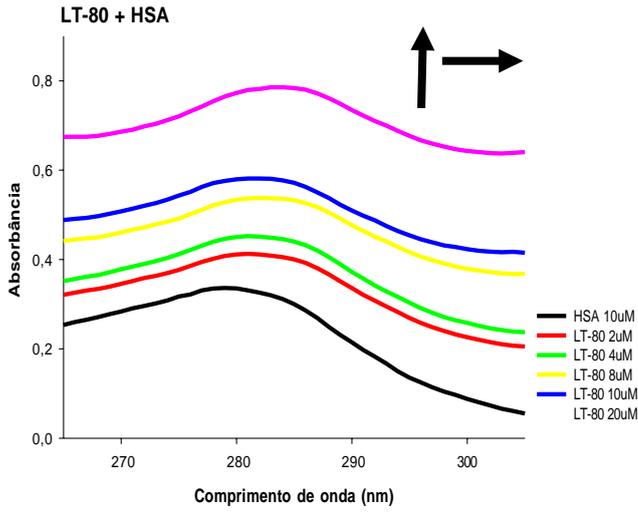


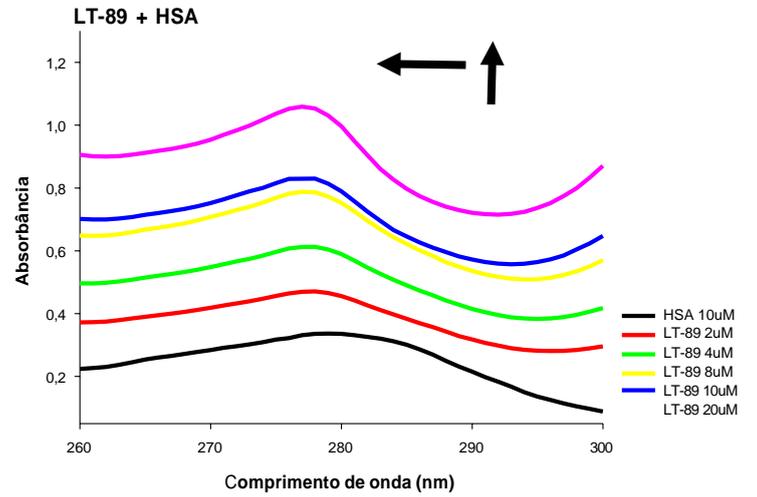
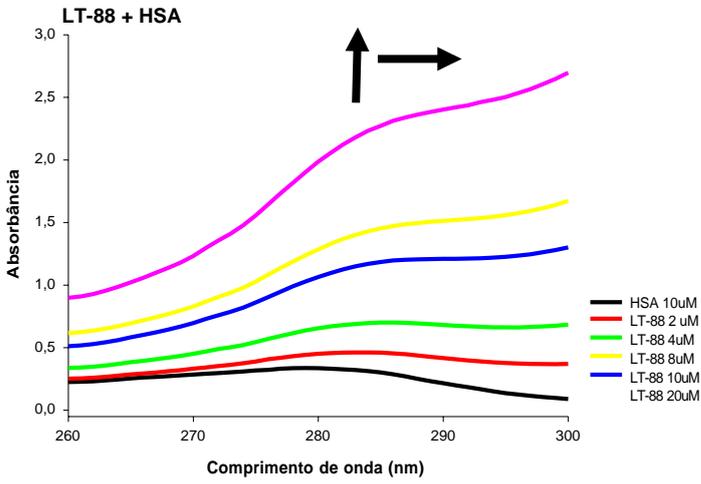
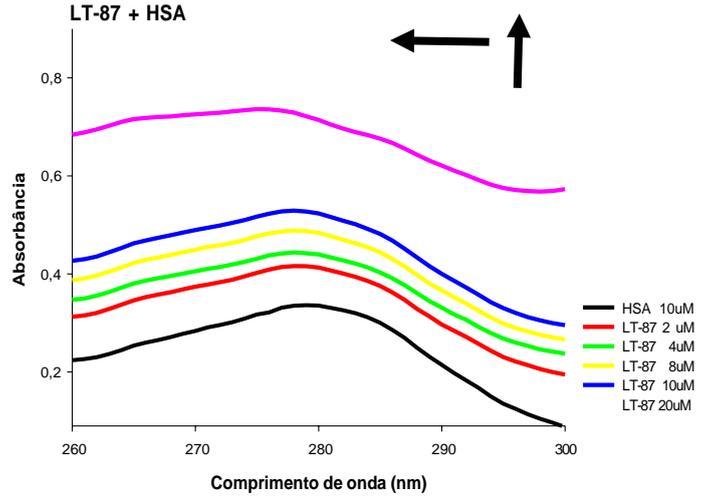
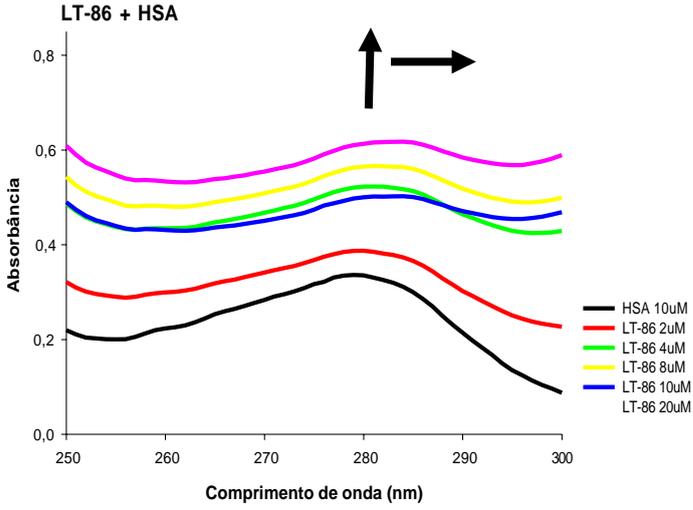


Fluorescência + HSA

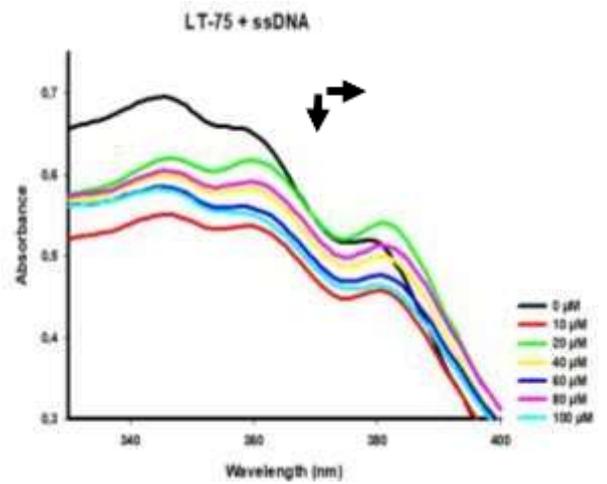
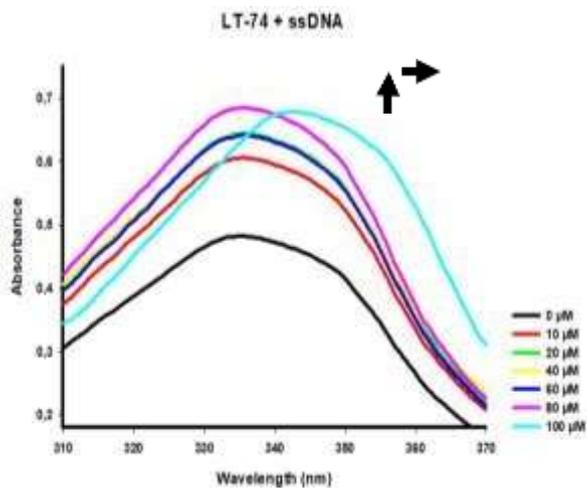
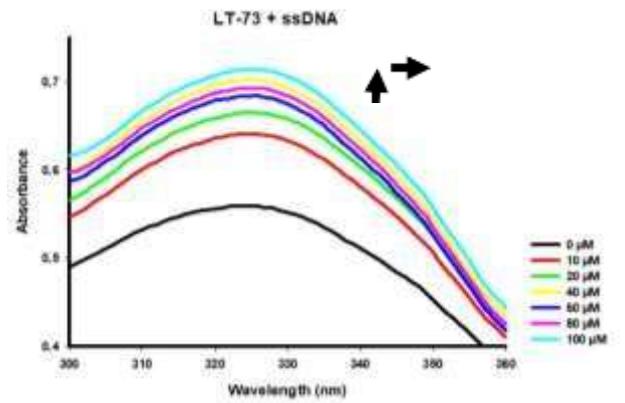
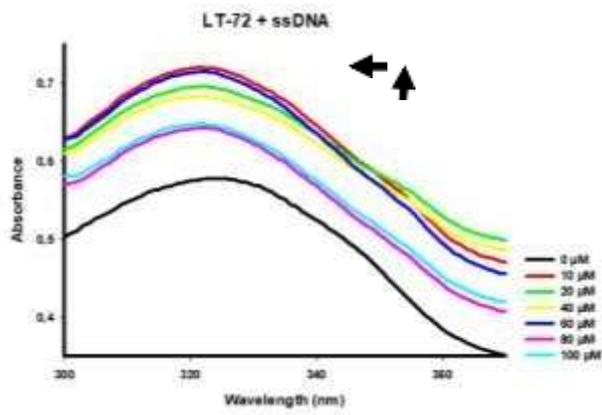
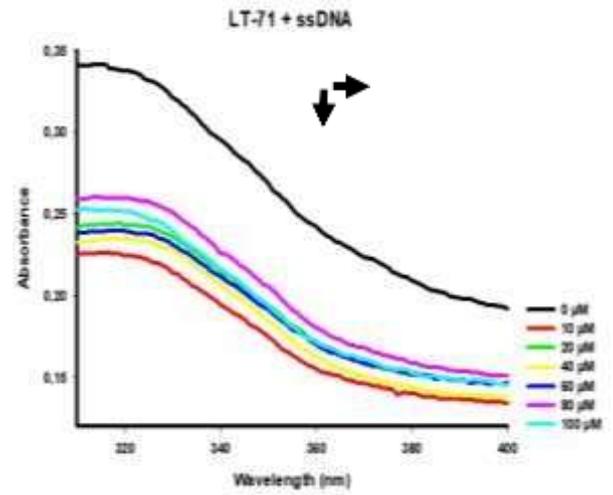
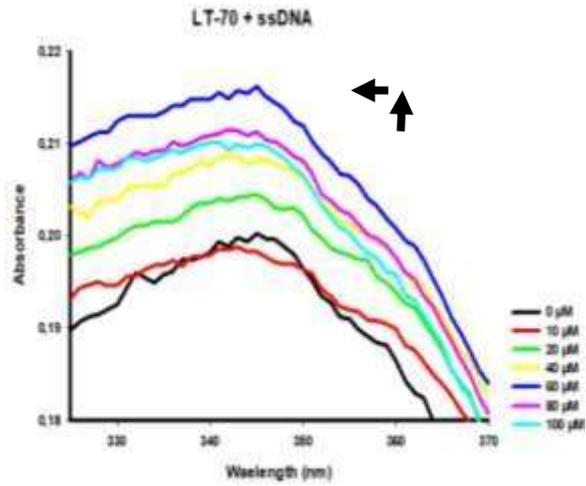


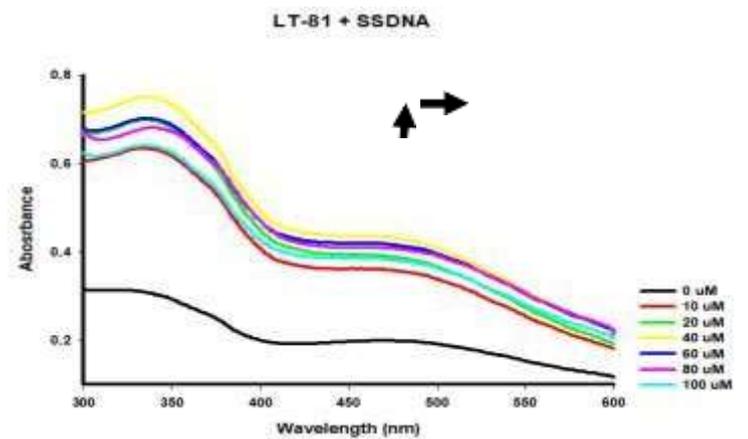
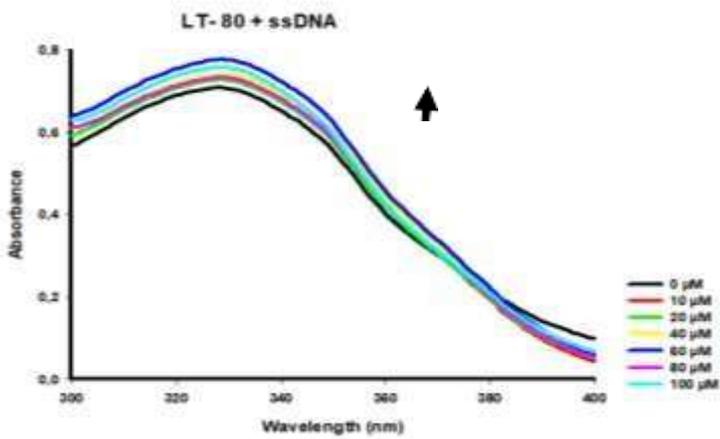
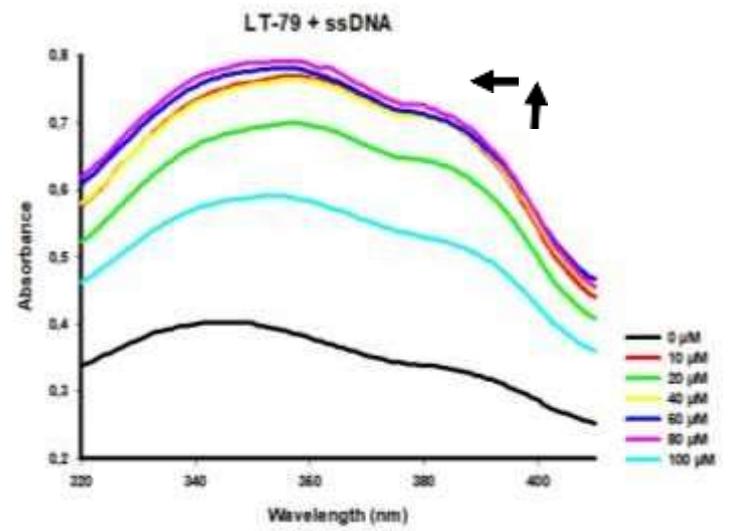
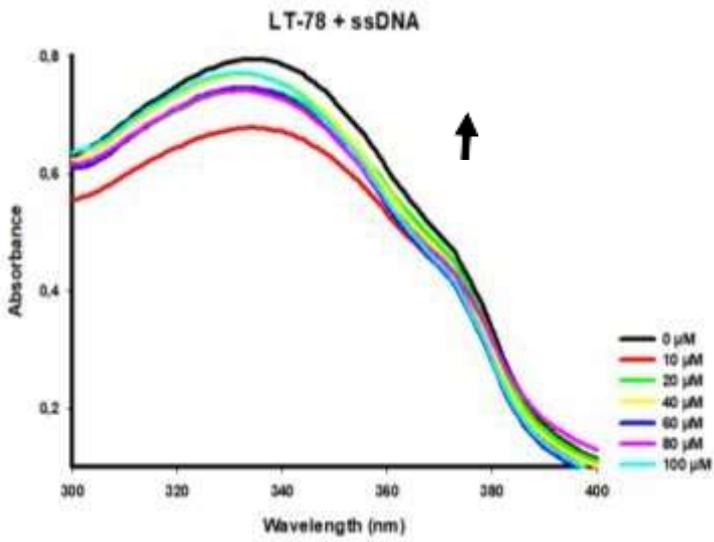
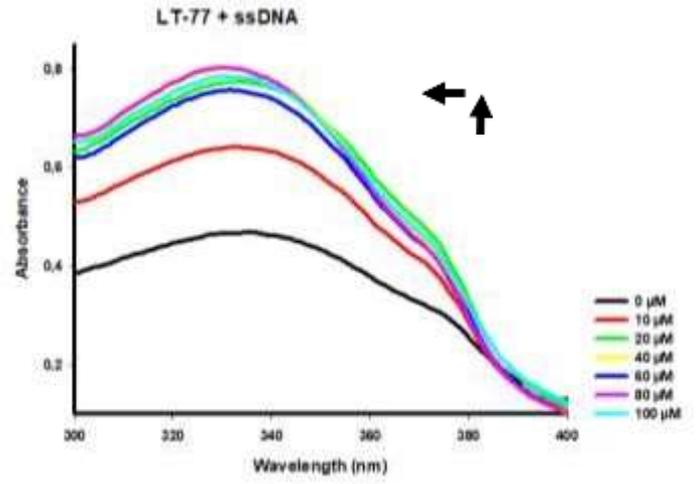
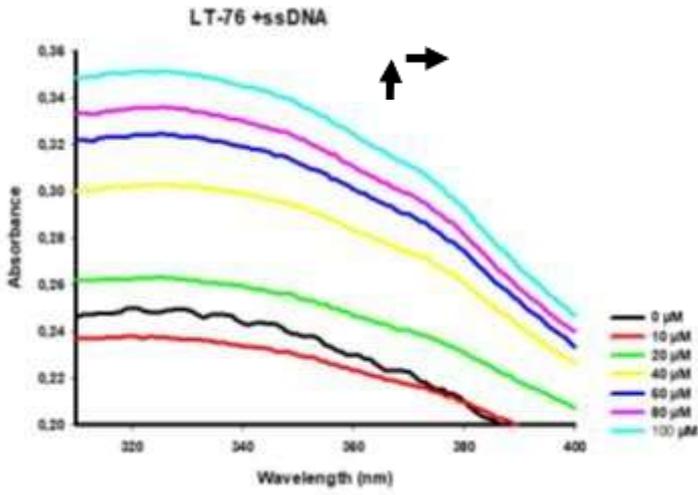


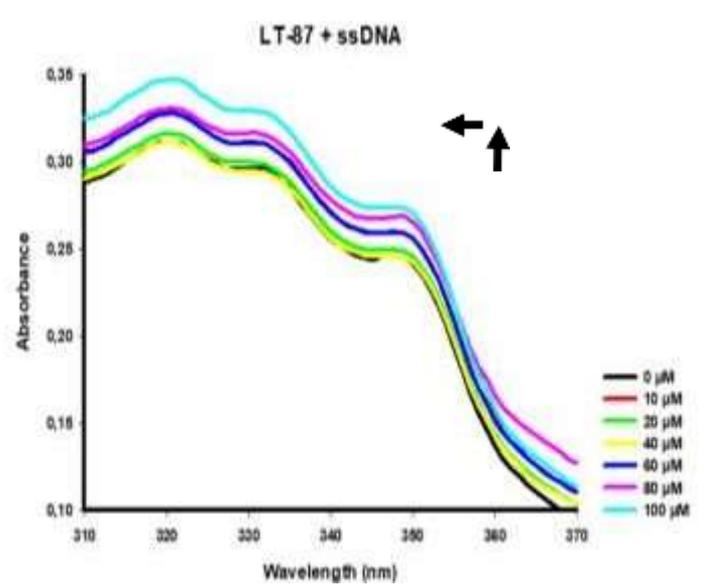
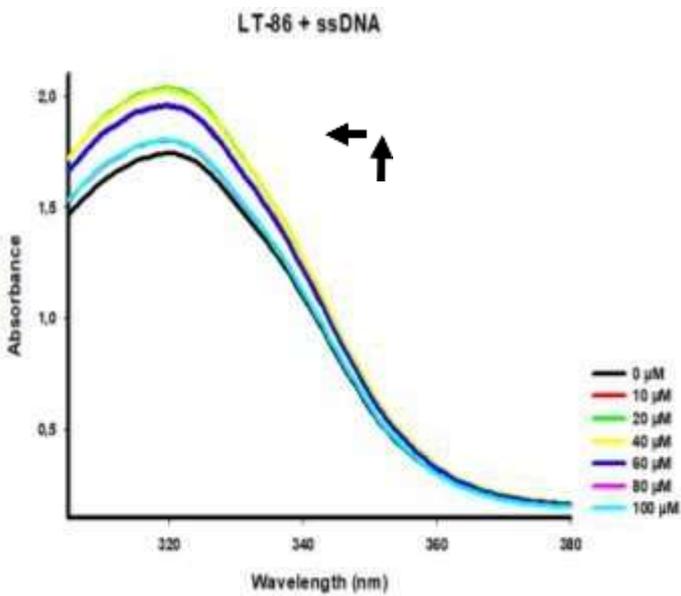
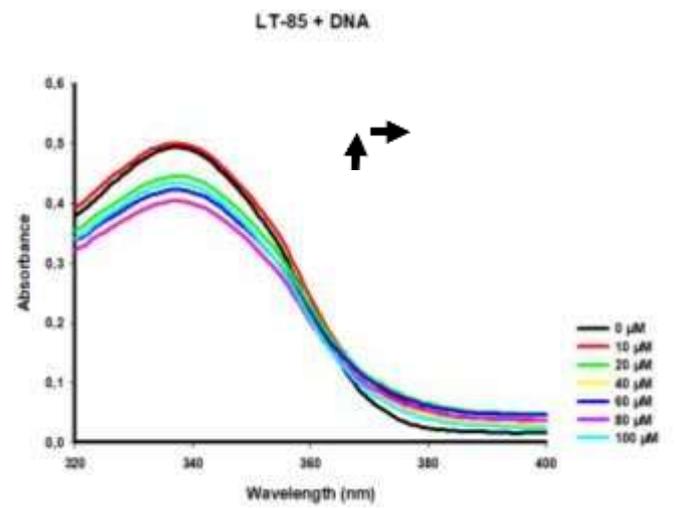
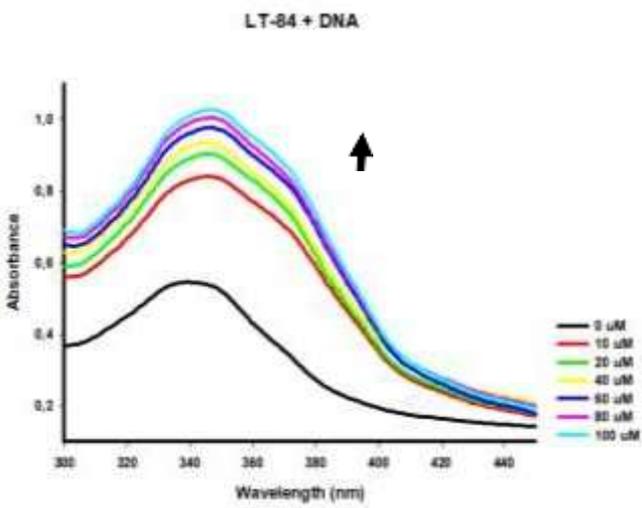
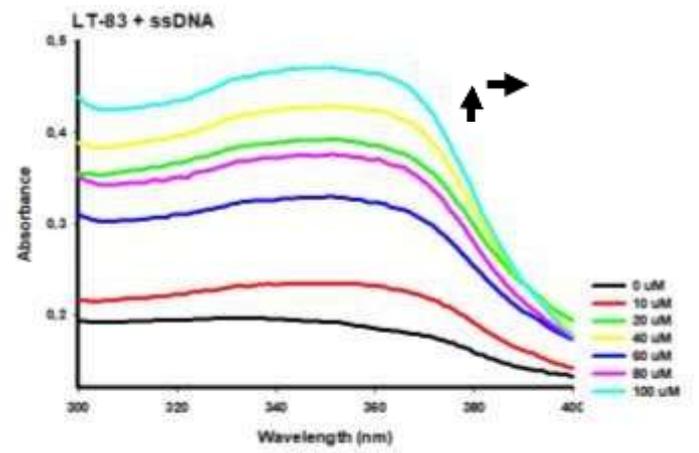
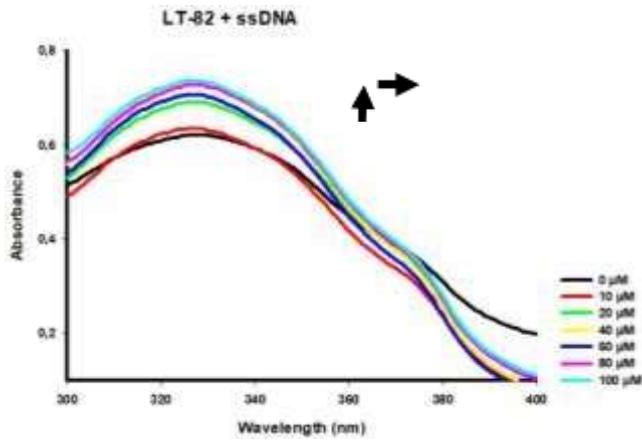




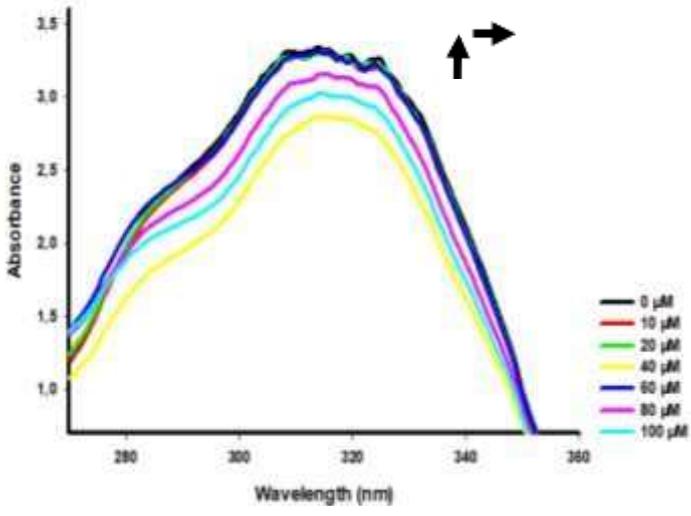
APÊNDICE B– ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV-VIS DO ssDNA COM OS DERIVADOS LT



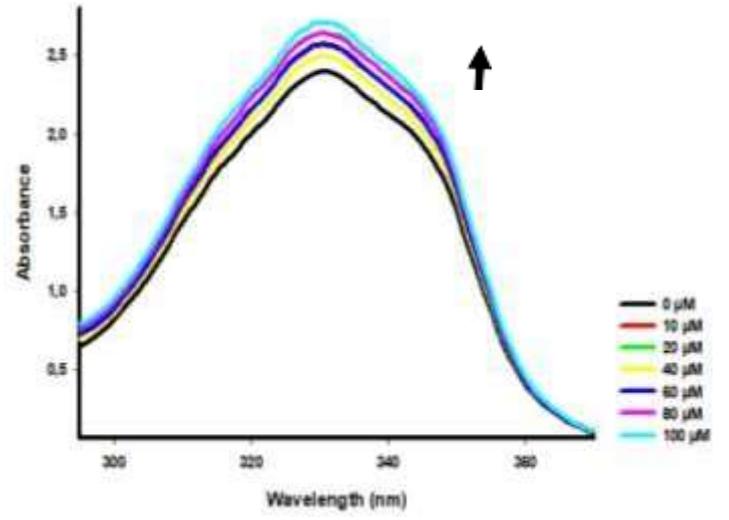




LT-88 + DNA

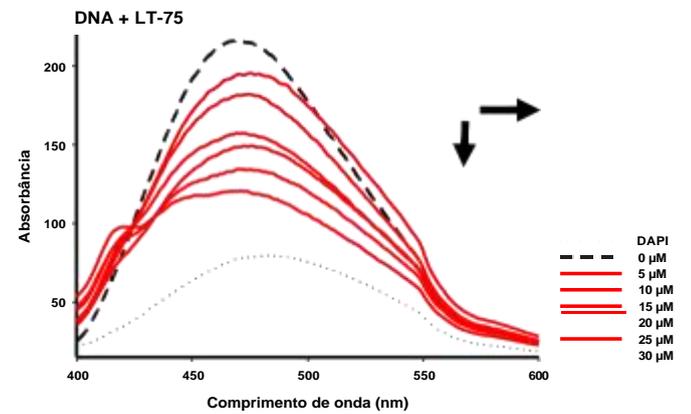
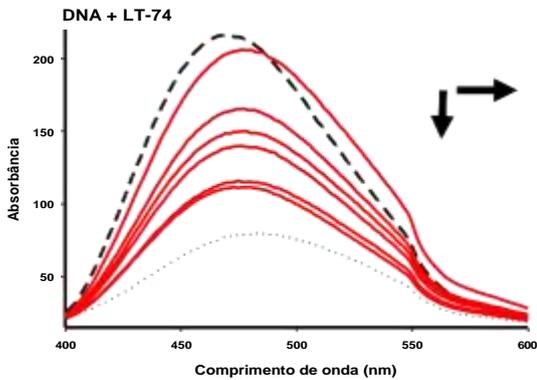
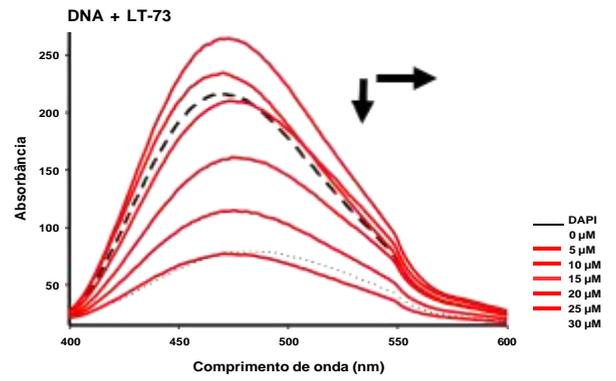
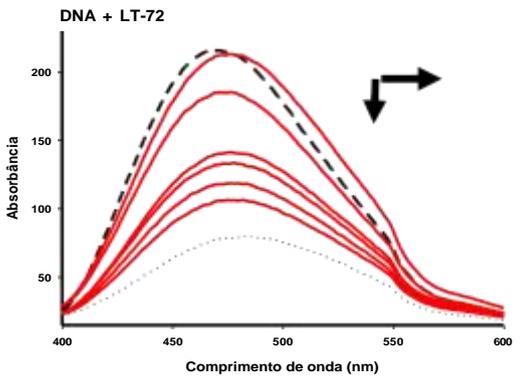
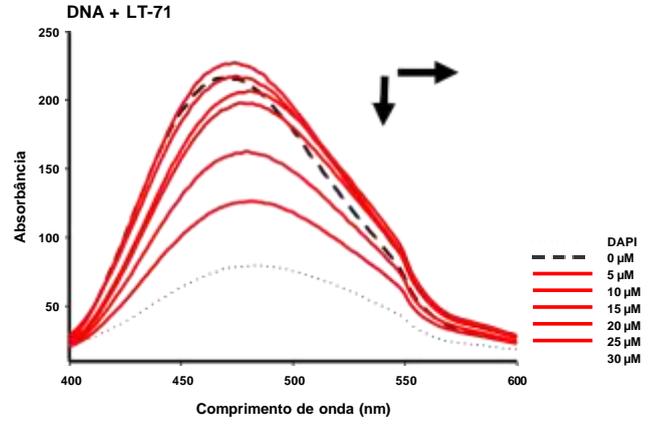
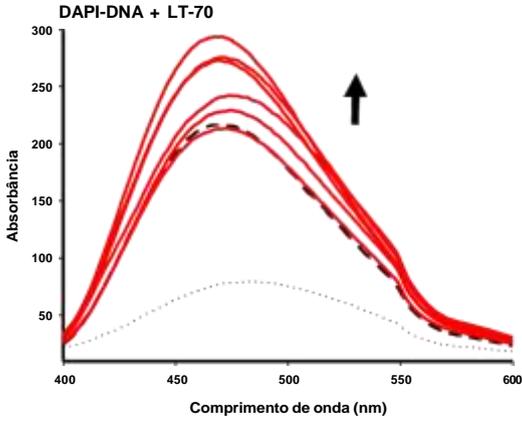


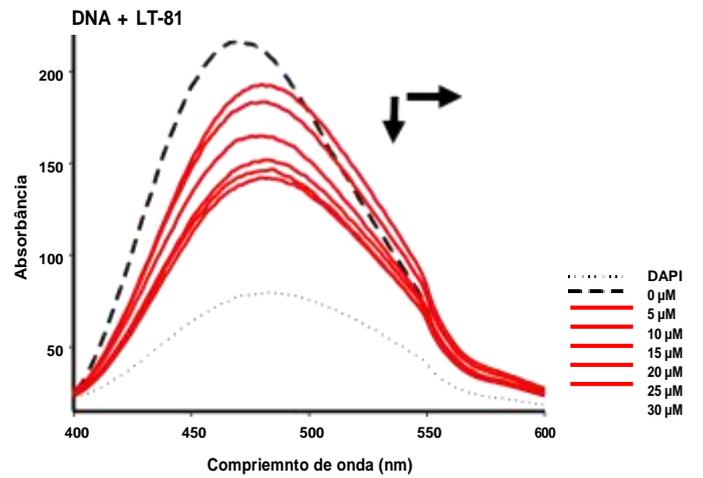
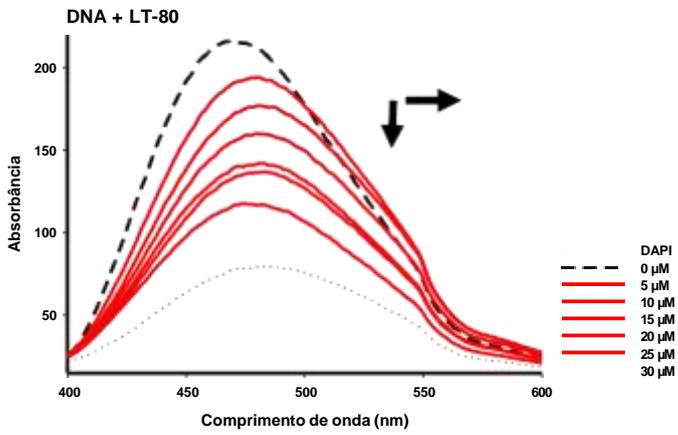
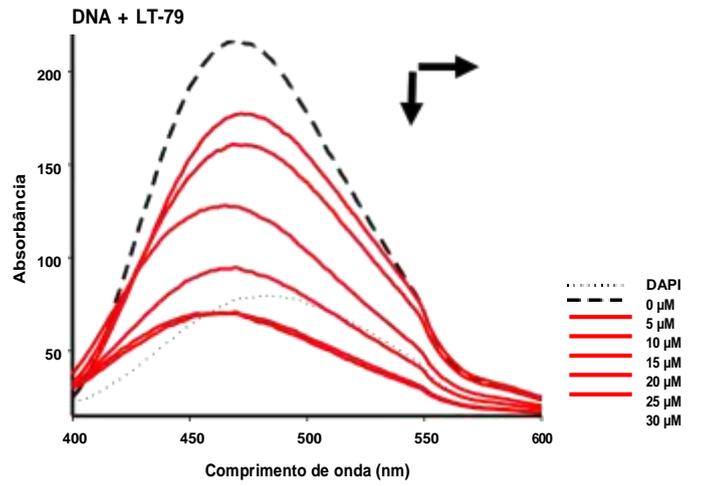
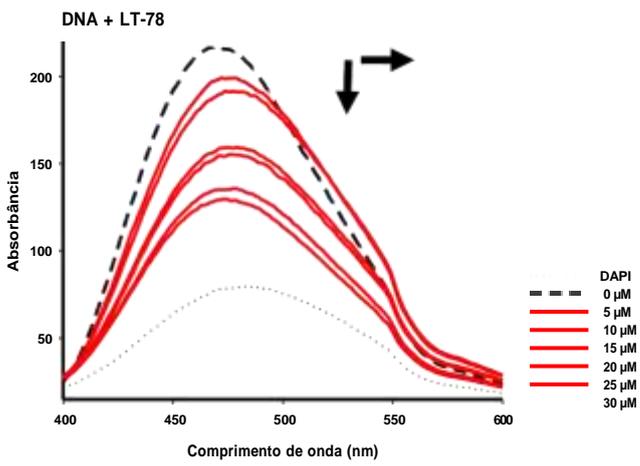
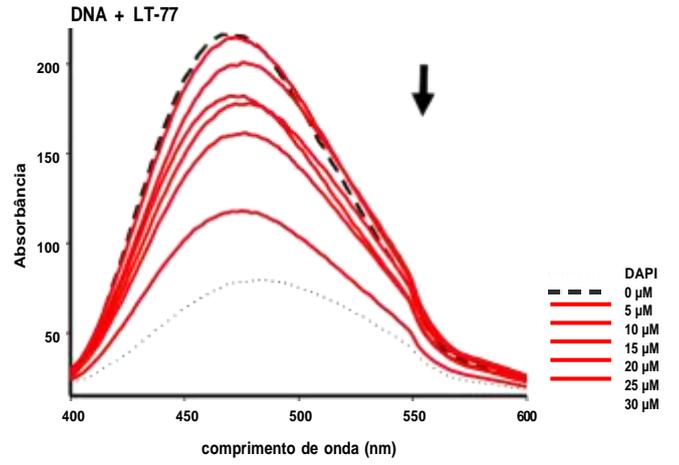
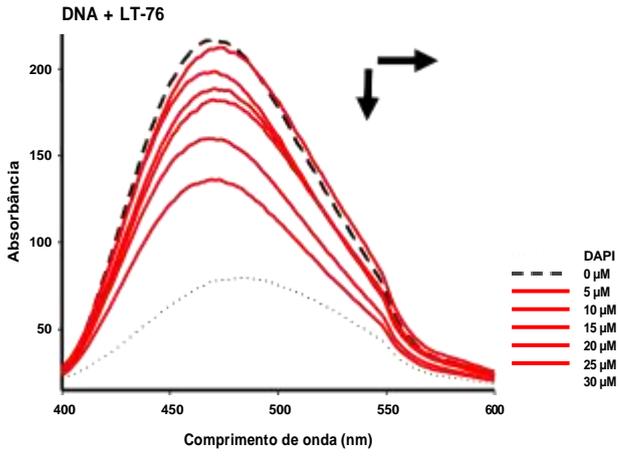
LT-89 + DNA

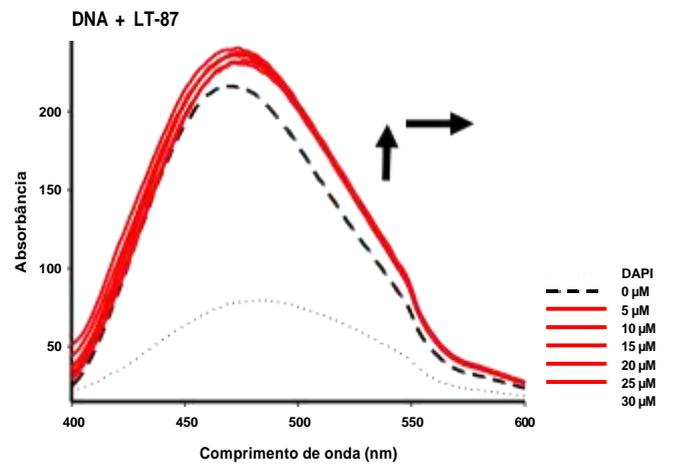
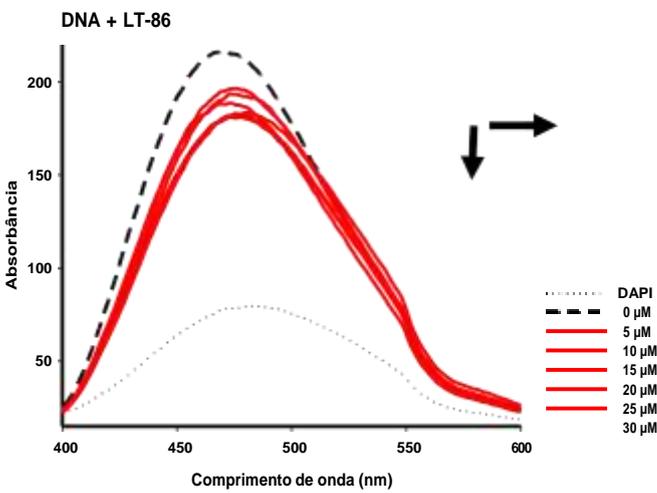
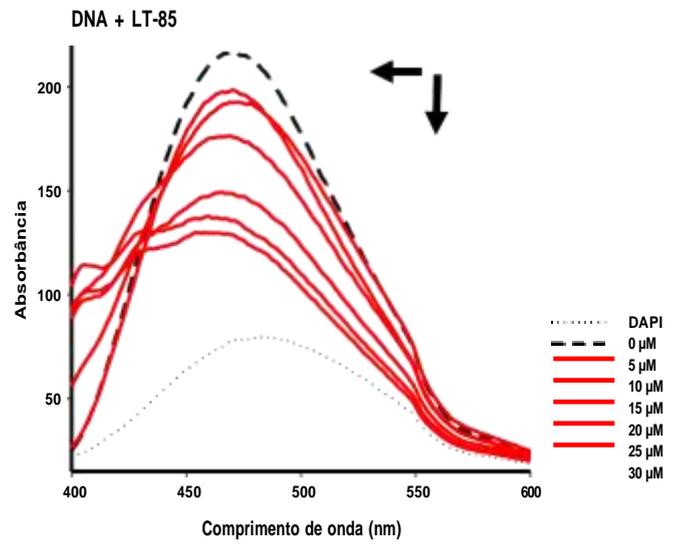
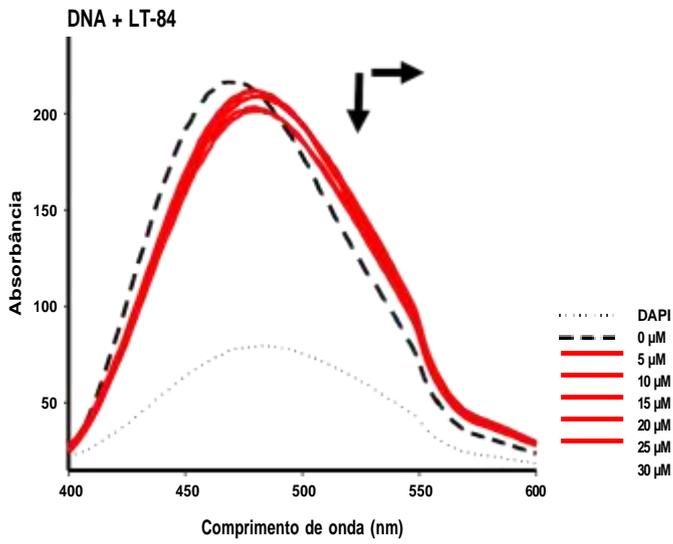
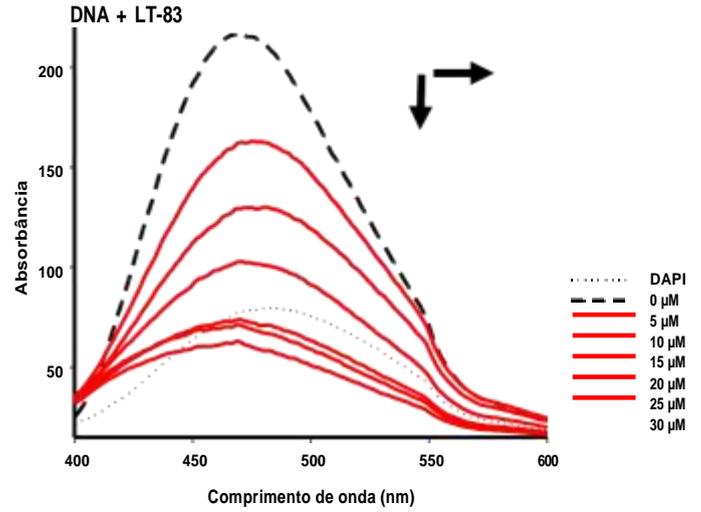
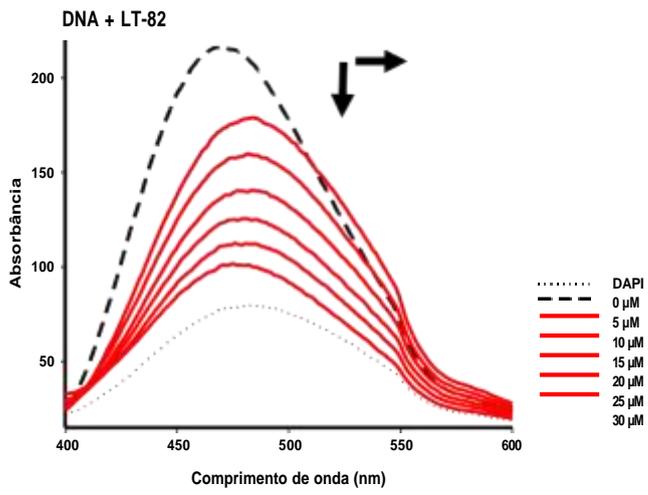


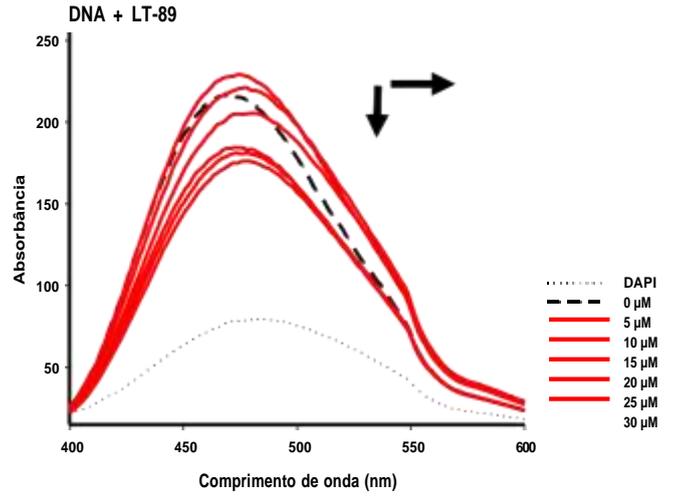
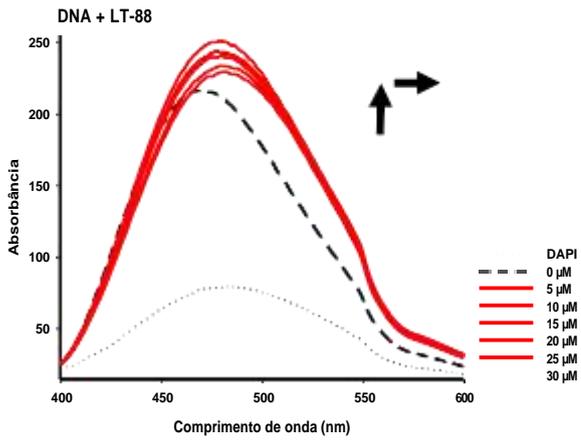
APÊNDICE C- ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA DO ssDNA COM DAPI E LARANJA DE CRIDINA (AO) COM OS DERIVADOS LT

DAPI + ssDNA

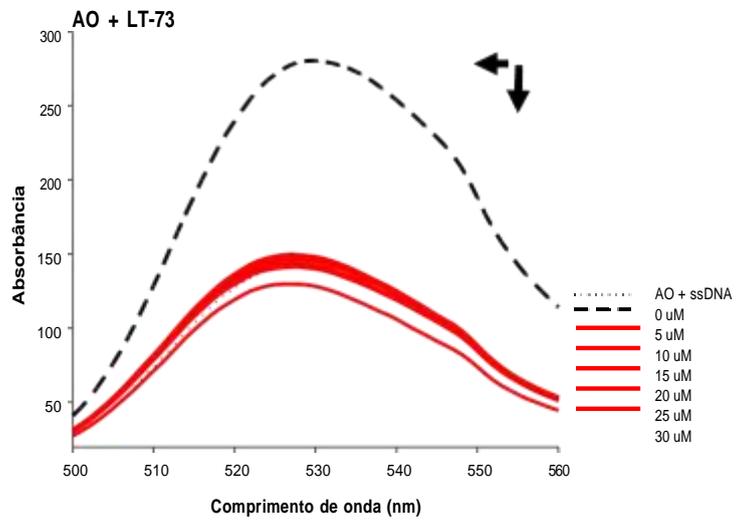
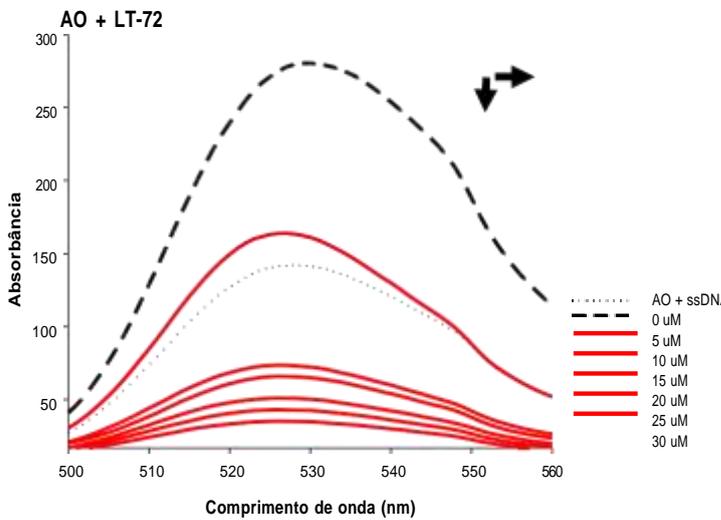
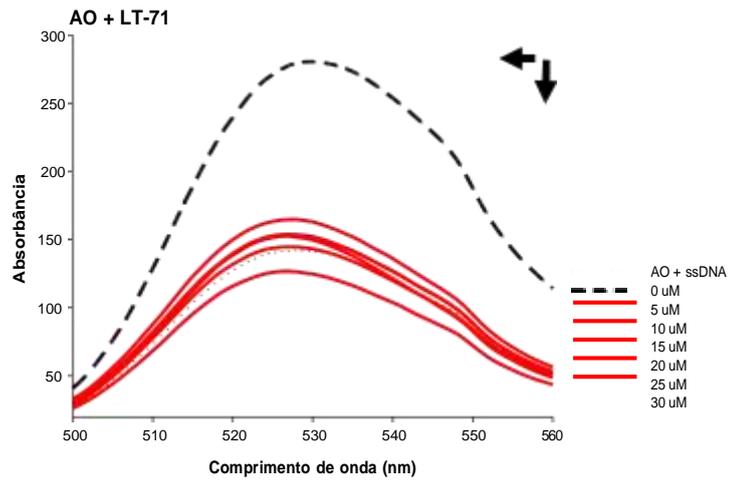
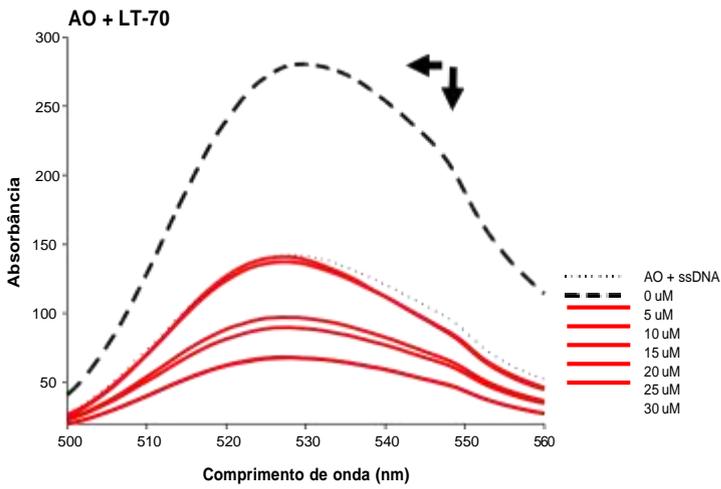


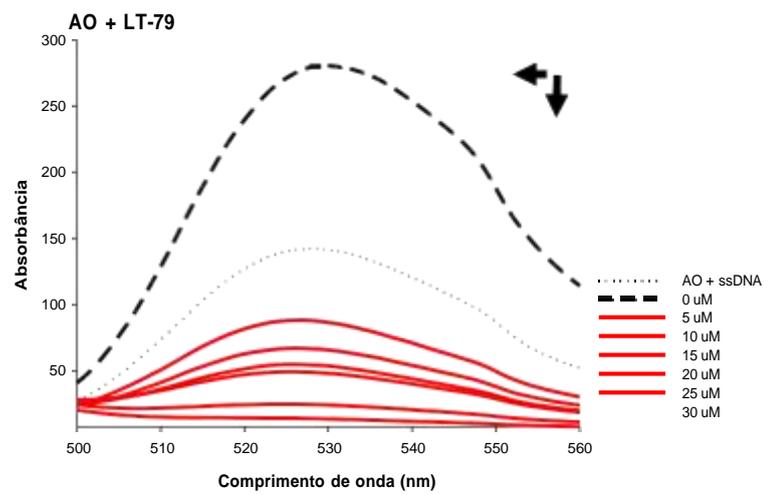
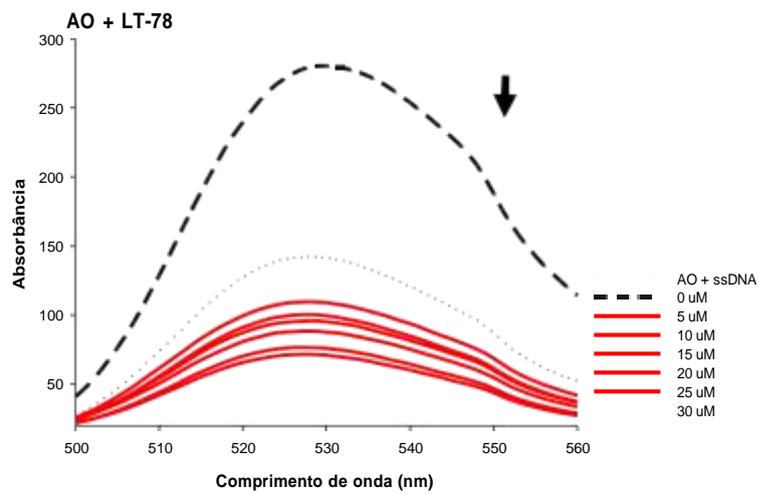
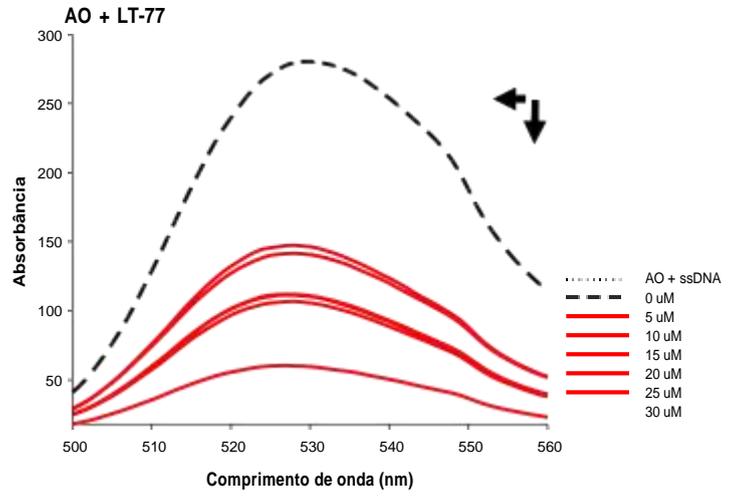
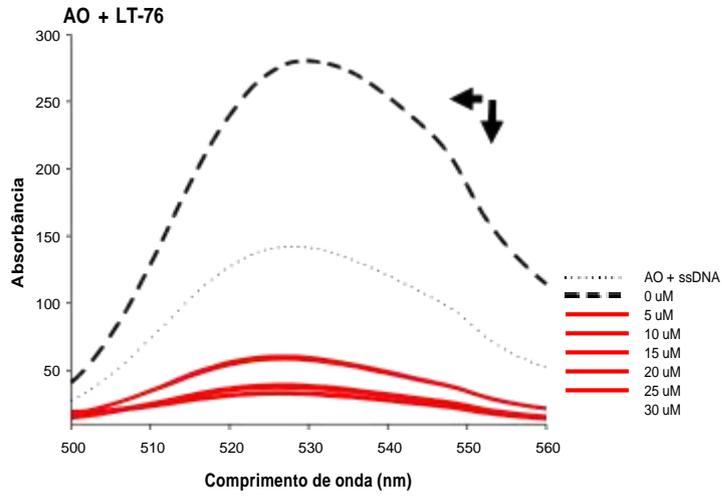
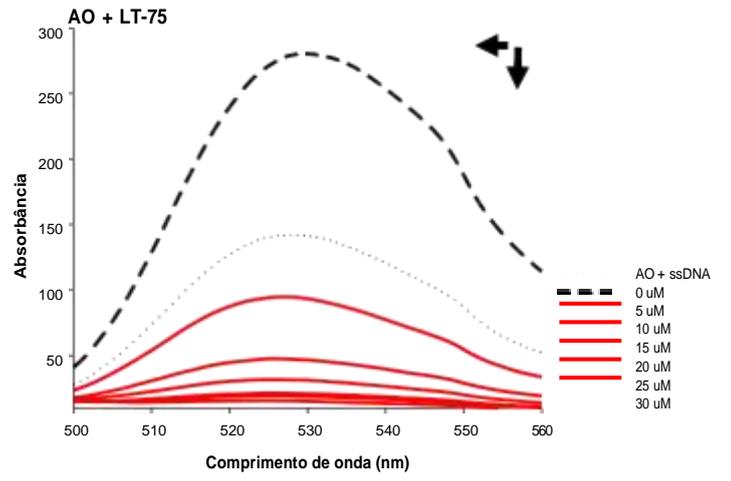
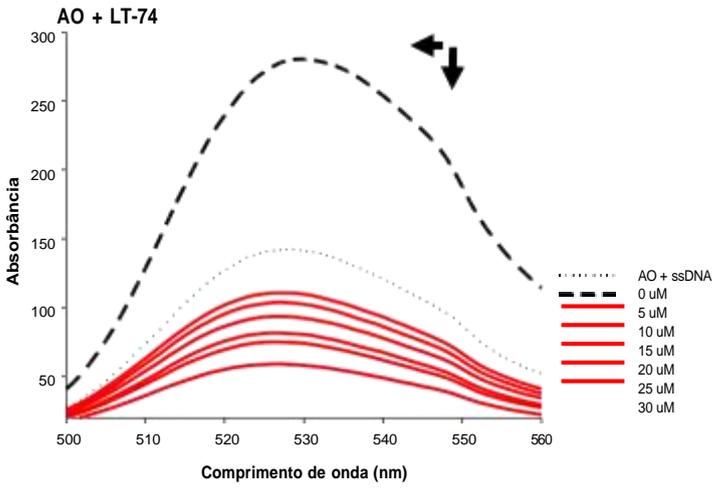


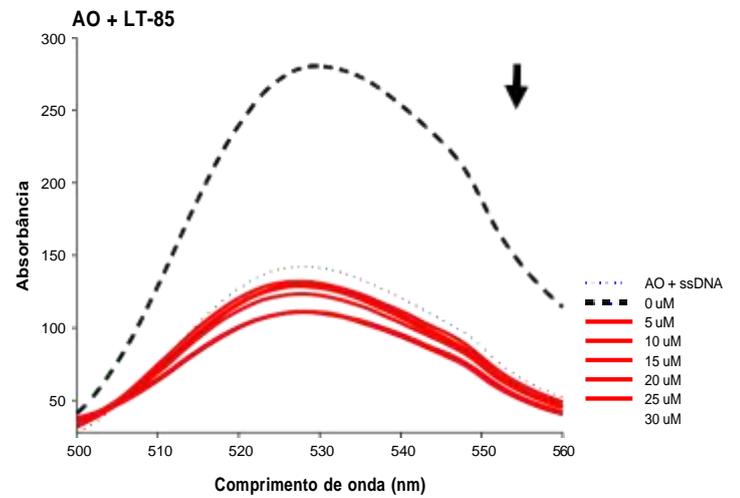
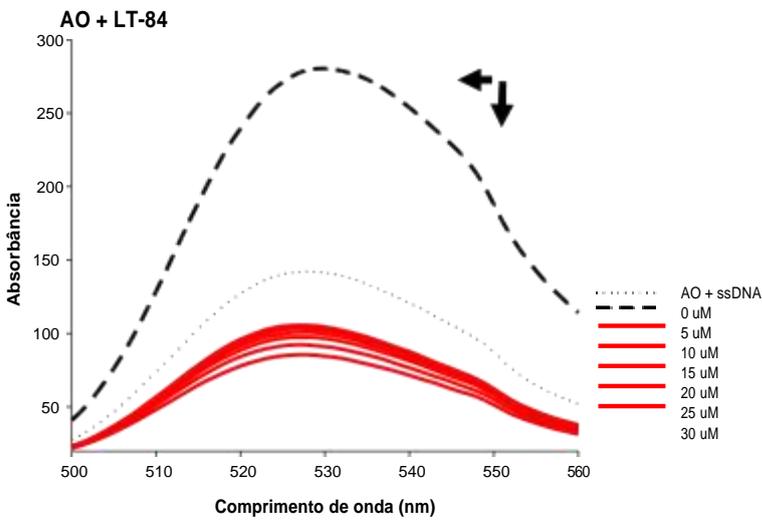
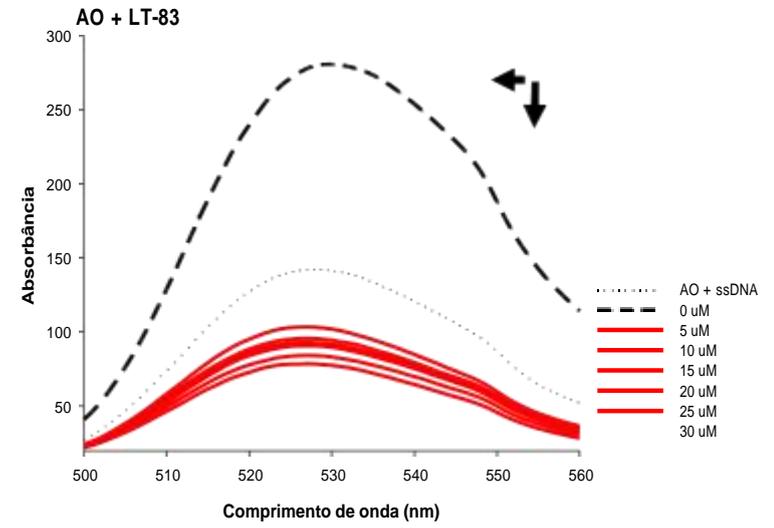
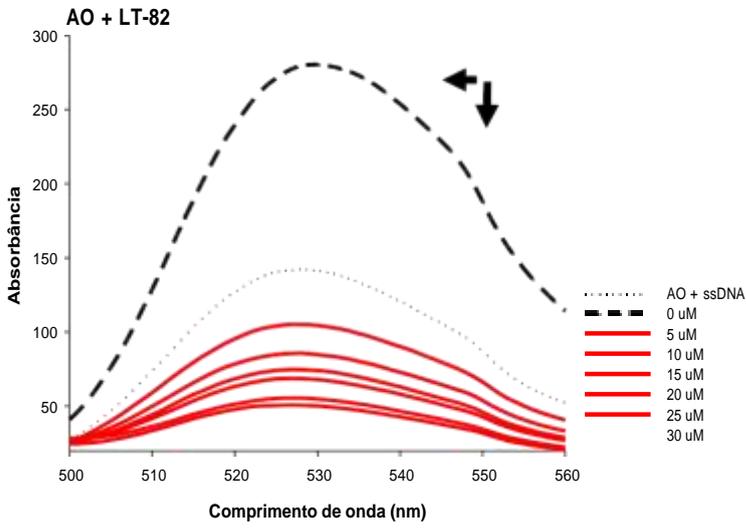
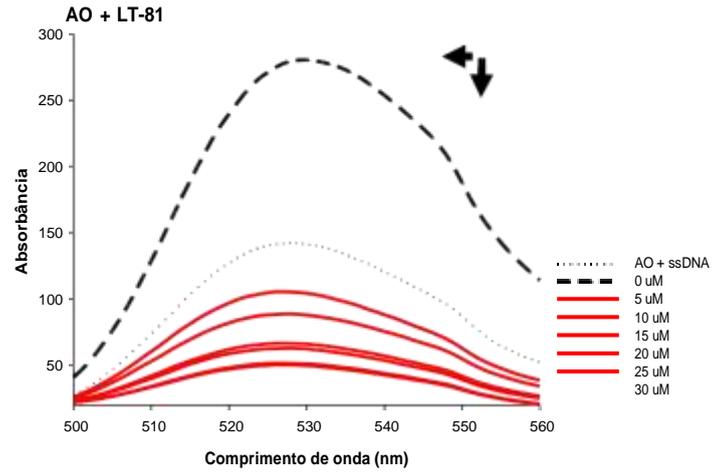
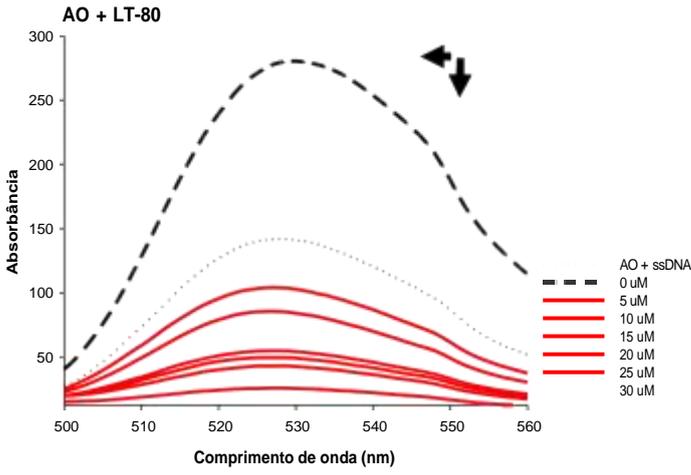


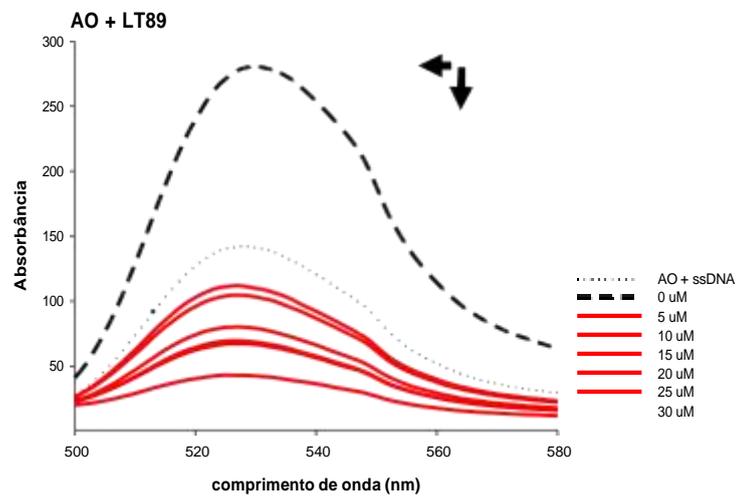
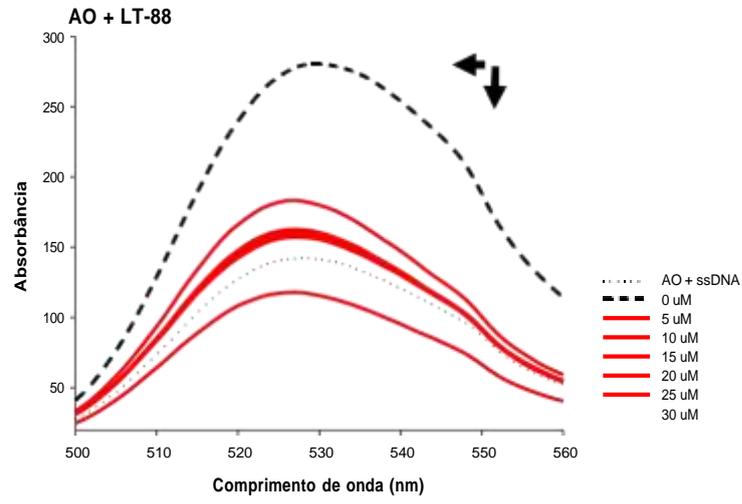
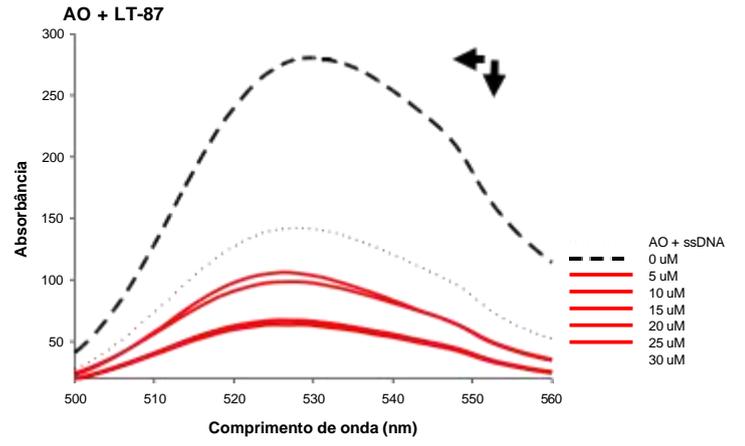
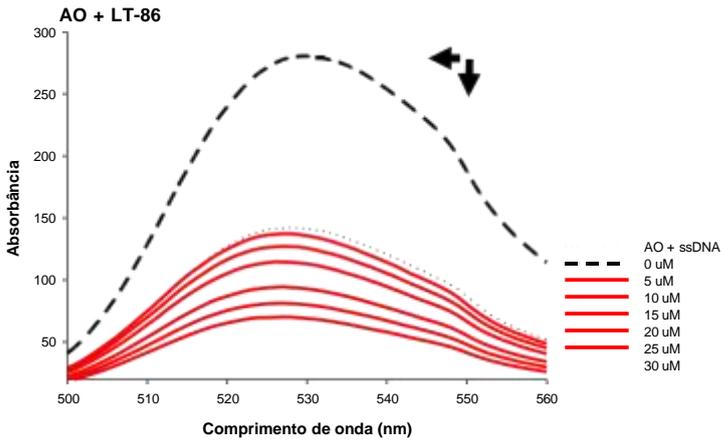


AO-ssDNA





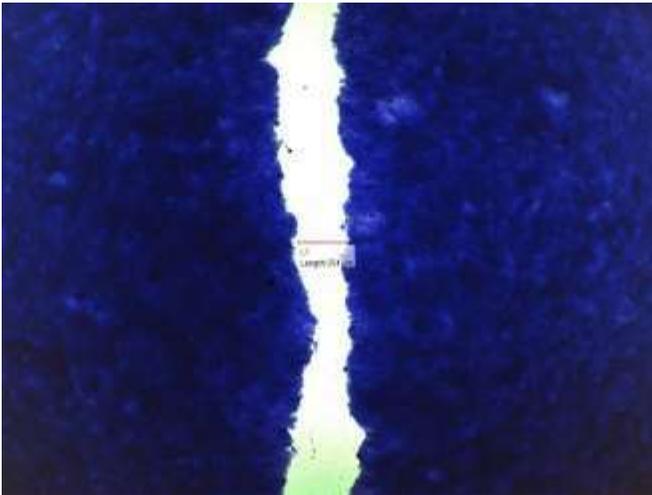




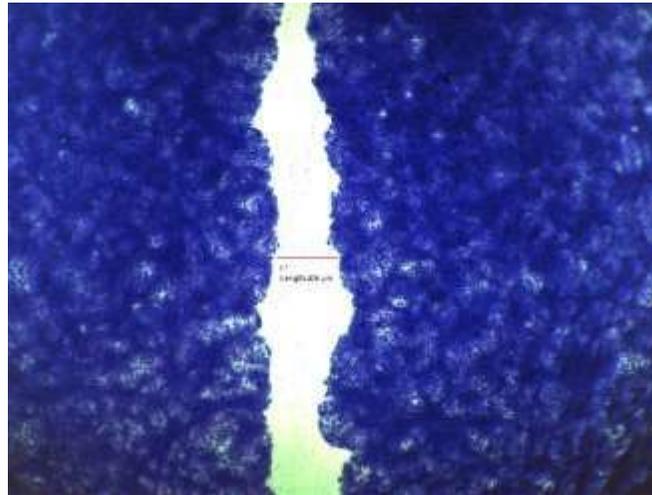
APÊNDICE D- FOTOS DA MIGRAÇÃO
CELULAR

MCF-7

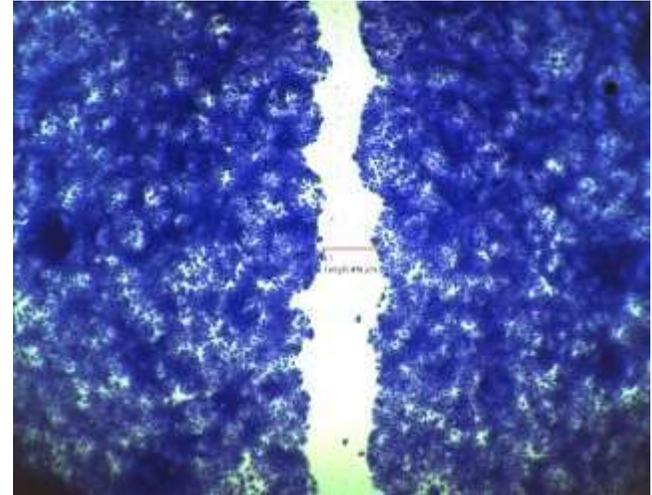
Controle Negativo



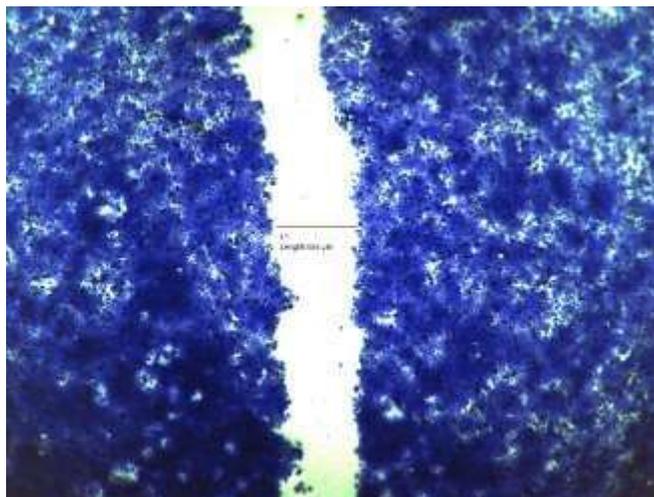
m-Amsa 0.5 μ M



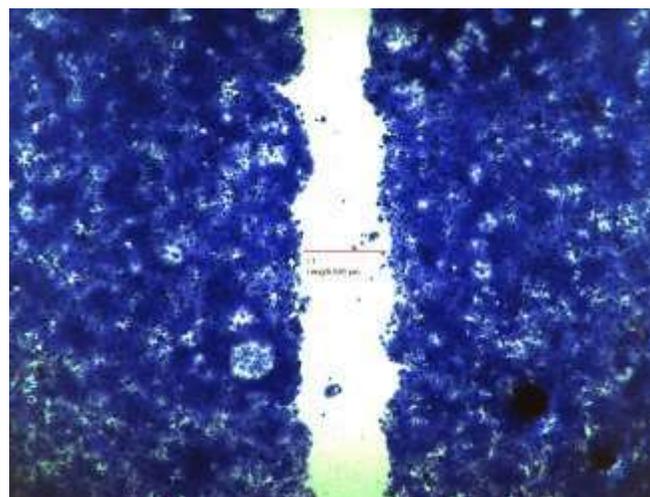
m-Amsa 1.0 μ M



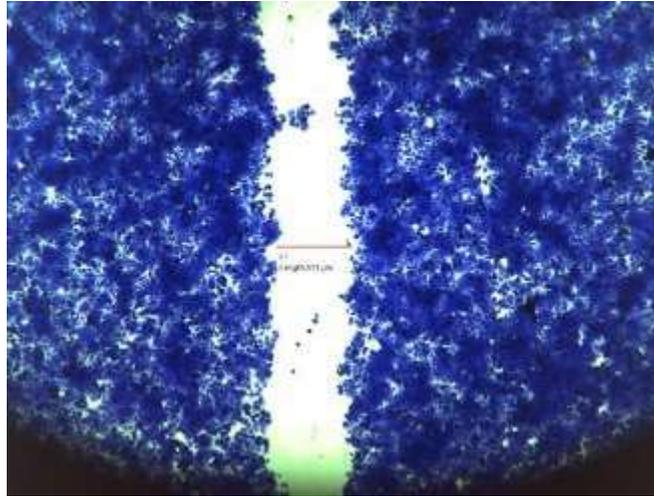
LT-76 0.5 μ M



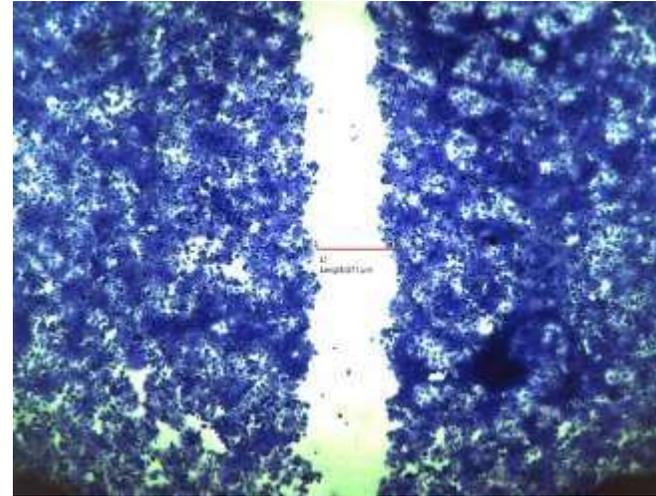
LT-76 1.0 μ M



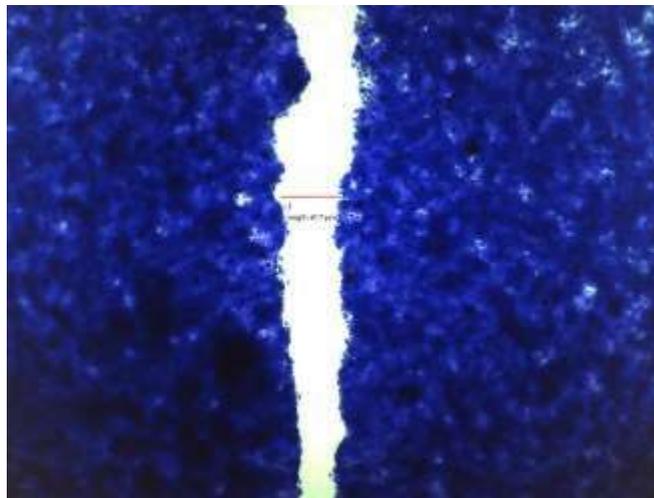
LT-81 0.5 μM



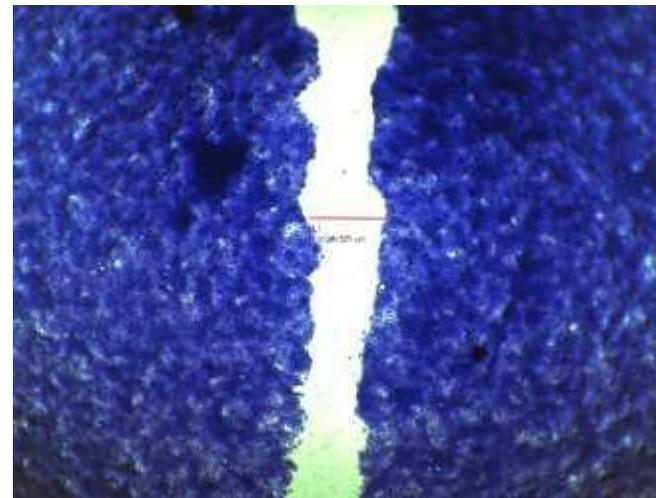
LT-81 1.0 μM



LT-87 0.5 μM

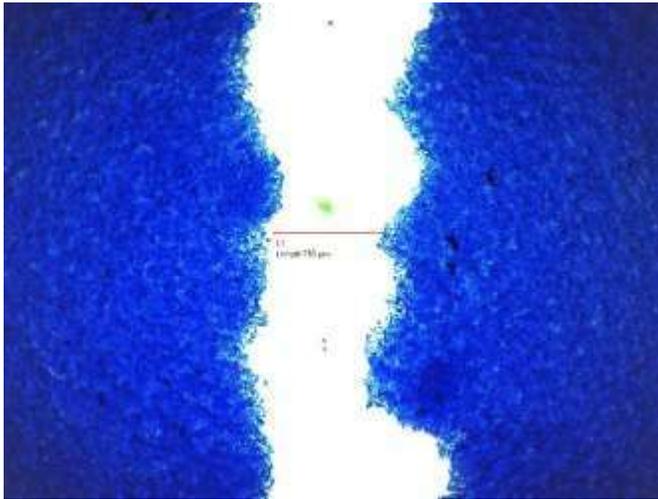


LT-87 1.0 μM

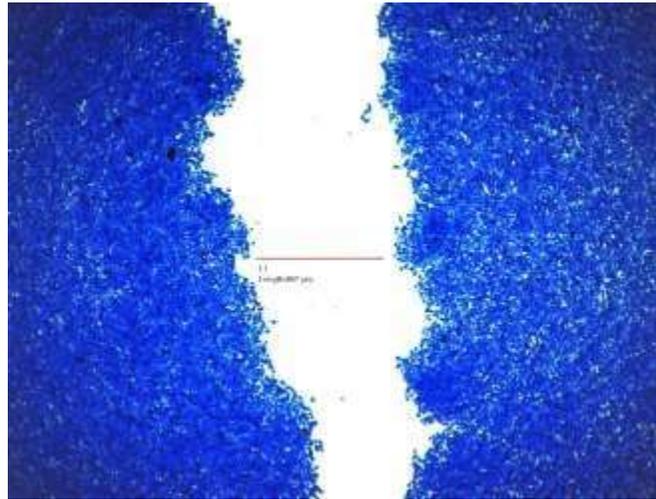


T-47D

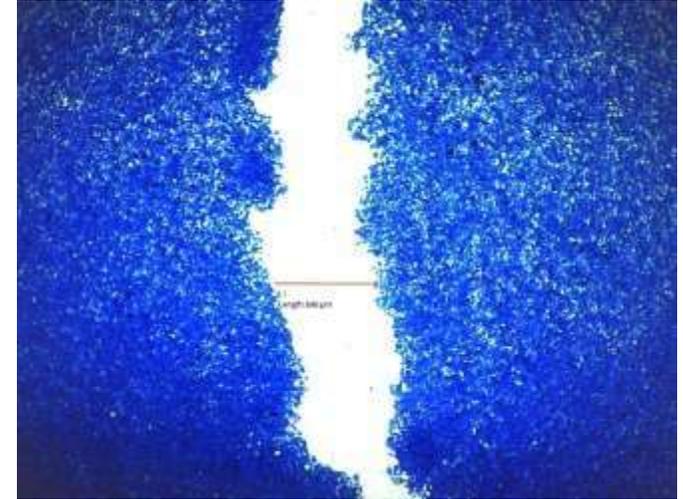
Controle Negativo



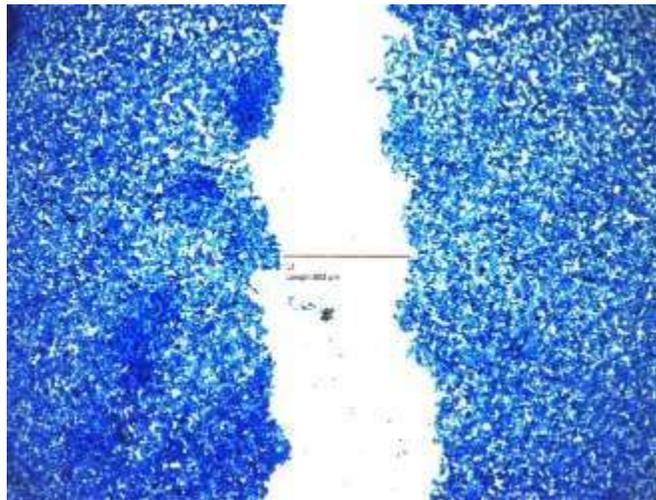
m-Amsa 0.5 μ M



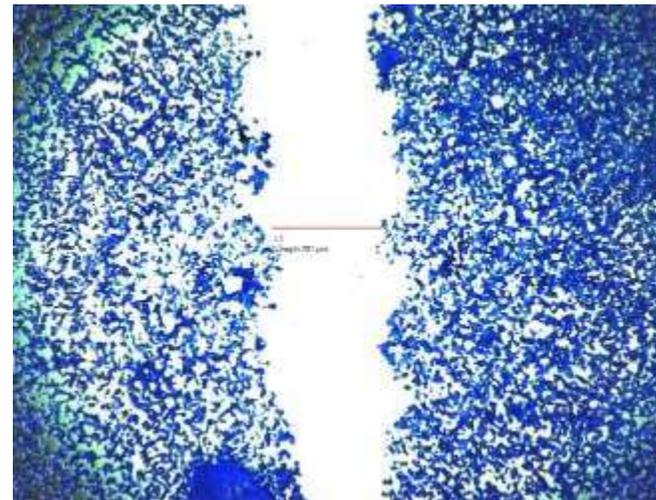
m-Amsa 1.0 μ M



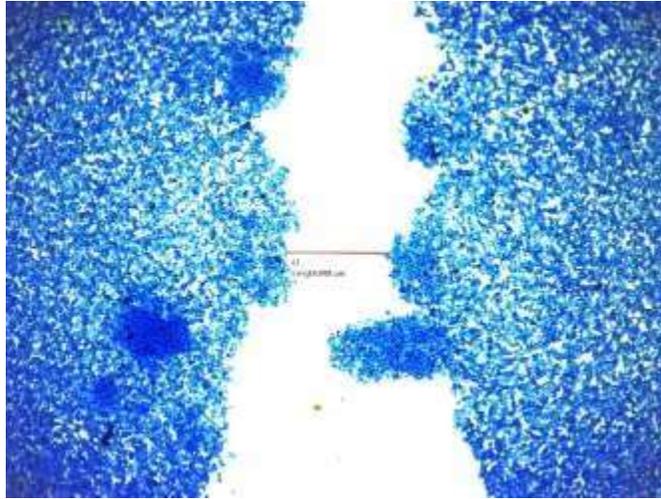
LT-76 0.5 μ M



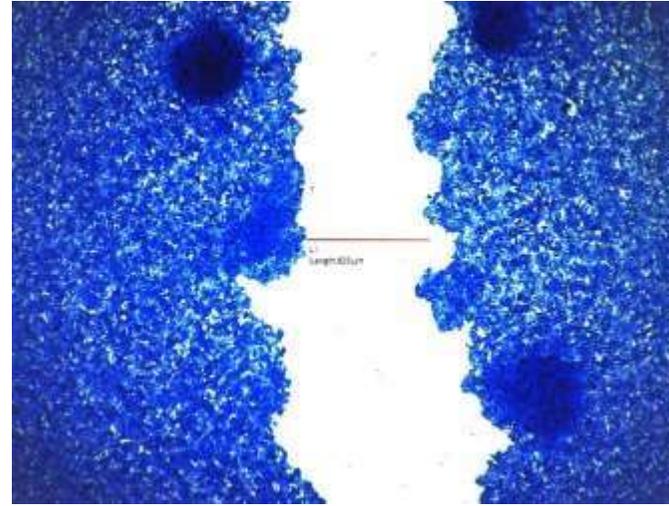
LT-76 1.0 μ M



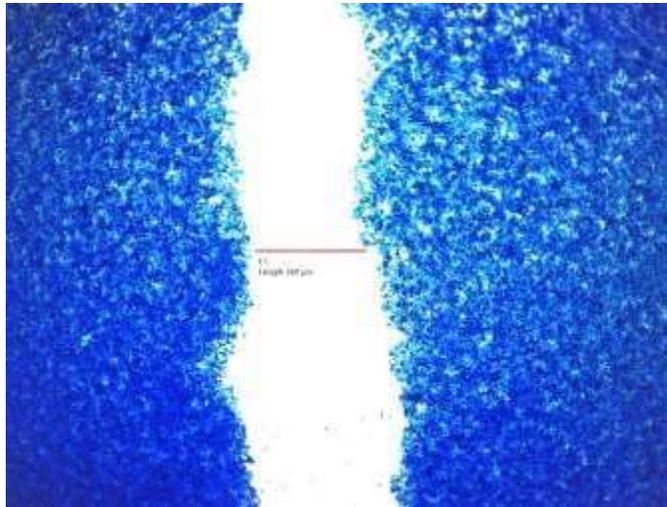
LT-81 0.5 μ M



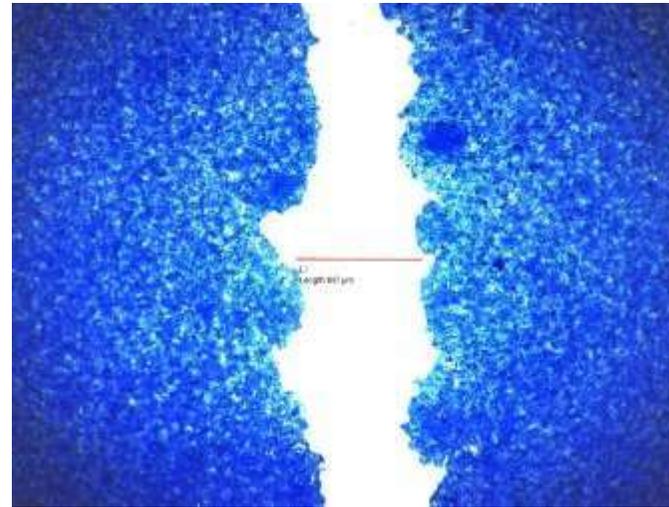
LT-81 1.0 μ M



LT-87 0.5 μ M



LT-87 1.0 μ M



APÊNDICE E - ARTIGO E PATENTE

Pharmacological Reports
<https://doi.org/10.1007/s43440-021-00271-7>

ARTICLE



Anti-inflammatory activity of novel thiosemicarbazone compounds indole-based as COX inhibitors

Iris T. T. Jacob¹ · Fabiana O. S. Gomes² · Mirelly D. S. de Miranda¹ · Sinara M. V. de Almeida³ · Iranildo J. da Cruz-Filho¹ · Christina A. Paixoto² · Teresinha G. da Silva¹ · Diogo R. M. Moreira⁴ · Cristiane M. L. de Melo¹ · Jamerson F. de Oliveira¹ · Maria C. A. de Lima⁵

Received: 19 October 2020 / Revised: 18 January 2021 / Accepted: 21 January 2021
 © Maj Institute of Pharmacology Polish Academy of Sciences 2021

Abstract

Background In this article, a series of 20 new thiosemicarbazone derivatives containing indole were synthesized and evaluated for their anti-inflammatory potential.

Methods The compounds were obtained through a synthetic route of only two steps, with yields that varied between 33.6 and 90.4%, and characterized by spectroscopic and spectrometric techniques.

Results An initial screening through the lymphoproliferation assay revealed that compounds LT76, LT81, and LT87 were able to inhibit lymphocyte proliferation, with CC_{50} of 0.56 ± 0.036 , 0.9 ± 0.01 and 0.5 ± 0.07 μ M, respectively, better results than indomethacin ($CC_{50} > 12$ μ M). In addition, these compounds were able to suppress the in-vitro production of TNF- α and NO, in addition to stimulating the production of IL-4. Reinforcing in-vitro assays, the compounds were able to inhibit COX-2 similar to Celecoxib showing greater selectivity for this isoform (LT81 SI: 23.06 versus Celecoxib SI: 11.88). Animal studies showed that compounds LT76 (64.8% inhibition after 6 h), LT81 (89% inhibition after 6 h) and LT87 (100% inhibition after 4 h) were able to suppress edema in mice after inoculation carrageenan with greater potency than indomethacin, and immunohistochemistry revealed that the groups treated with LT76, LT81 and LT87 reduced the expression of COX-2, similar or better results when compared to indomethacin. Complementarily, in-silico studies have shown that these compounds have a good pharmacokinetic profile, for respecting the parameters of Lipinski and Veber, showing their good bioavailability.

Conclusions These results demonstrate the potency of thiosemicarbazone derivatives containing indole and confirm their importance as scaffolds of molecules with notorious anti-inflammatory activity.

Keywords Thiosemicarbazone · Indole · Immunosuppressive drugs · Immunomodulatory agents · COX-2 · Immunohistochemistry

✉ Jamerson F. de Oliveira
jamerson@antidote.ufrpe.br

✉ Maria C. A. de Lima
marialima.marialiacortese@gmail.com

¹ Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPEL, Recife, PE 50670-901, Brazil)

² Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Aggeu Magalhães, Recife, PE 50740-465, Brazil

³ Faculdade de Ciências, Educação e Tecnologia de Garanhuns (FACITEG), Universidade de Pernambuco (UFPE), Garanhuns, PE 55290-000, Brazil

⁴ Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo de Sá, Salvador, BA 40296-730, Brazil

⁵ Universidade da Integração Internacional da Lusitânia Afro-Brasileira (UNIABR), Rio de Janeiro, CE 62700-970, Brazil

Introduction

The response to tissue damage caused or not by an infectious agent triggers a series of essential vascular and cellular changes to promote the restoration of the injured structure [1]. The repair mechanism is mainly performed by chemical mediators such as prostaglandins, nitric oxide (NO), tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and IL-1 β , IL-6, IL-10, in addition to the activation of T cells and other cells inflammatory [2, 3].

These substances can modulate the inflammatory process determining its beginning, intensity, and evolution [4]. An exacerbated inflammatory response can lead to a physiological imbalance of the tissue with undesirable effects that cause pain and even destruction of the affected site [5, 6].



12/07/2019 870190066066



29409161811246280

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

Número do Processo: BR 10 2019 014503 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24134488000108

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50670-901

País: Brasil

Telefone: (81)2126 8959

Fax: (81)2126 8959

Email: patentes_dine.propesq@ufpe.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): INIBIDORES DA COCLOOGENASE: DERIVADOS N-(2-INDOL-3-IL) METILENO-N-HIDRAZINA-CARBOTIAMIDAS ANTI-INFLAMATÓRIOS E ANALGÉSICOS

Resumo: A presente invenção se refere a moléculas ativas sobre processos inflamatórios, analgésicos e inibidoras da ciclooxigenase 2. Mais especificamente, as moléculas da presente invenção referem-se a derivados N-(2-indol-3-il) metileno-N-hidrazina-carbotioamidas úteis no tratamento de processos inflamatórios ou de outras manifestações clínicas que requeiram o uso de anti-inflamatórios e analgésicos. Os resultados sugerem uma resposta anti-inflamatória dos derivados testados, onde o composto LQIT/LT-81 na dose de 10mg/Kg promoveu uma redução no volume da pata em relação ao grupo controle negativo. Estatisticamente o LQIT/LT-81 comportou-se de maneira similar ao grupo controle positivo inibindo o edema em até 70,20%. Os compostos testados exibiram atividade inibitória da COX-2 (0,14 e 0,049 M, respectivamente) maior que o celecoxib (0,26 µM). Os resultados obtidos com a linhagem de macrófagos J774 tratados in vitro com os compostos mostraram a regulação imunológica para resposta Th2. Parâmetros como a diminuição das citocinas IL-6 e TNF-α, associados à menor liberação de óxido nítrico e à linfoproliferação. As citocinas Th2, como IL-4 e IL-10, foram produzidas em altos valores, e o TNF-α foi produzido em valores mais baixos para todos os compostos testados, reforçando a inibição do perfil Th1.

Figura a publicar: 1

APÊNDICE E– PUBLICAÇÕES PARALELAS

Biorganic & Medicinal Chemistry, 24 (2021) 113717



Contents lists available at ScienceDirect

Biorganic & Medicinal Chemistry

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

COVID-19 therapy: What weapons do we bring into battle?

Simara Mônica Vitalino de Almeida^{a,b,c,*}, José Cleber Santos Soares^b,
 Kerolaine Lima dos Santos^b, Josival Emanuel Ferreira Alves^c, Amélia Galdino Ribeiro^b,
 Iris Triunfada Tenório Jacob^b, Cindy Juliane da Silva Ferreira^a, Jéssica Celerino dos Santos^a,
 Jamerson Ferreira de Oliveira^a, Luiz Bezerra de Carvalho Junior^c, Maria do Carmo Alves de Lima^b

^a Laboratório de Biologia Molecular, Universidade de Pernambuco, Garanhuns, PE, Brazil^b Laboratório de Química e Inovação Tecnológica (Q&T) - Departamento de Análises, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil^c Laboratório de Imunopatologia Celular e Humana (IC&H), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
 Coronavirus
 SARS-CoV-2
 COVID-19
 Antiviral
 Repurposed drug

ABSTRACT

Urgent treatments, in any modality, to fight SARS-CoV-2 infections are desired by society in general, by health professionals, by Estate leaders and, mainly, by the scientific community, because one thing is certain amidst the numerous uncertainties regarding COVID-19: knowledge is the means to discover or to produce an effective treatment against this global disease. Insights from several areas in the world are still considered in this review, as shown by the accelerated scientific production in the first half of 2020 with over 25,000 published articles related to the new coronavirus. Three great lines of publication related to COVID-19 were identified for building this article: The first refers to knowledge production concerning the virus and pathophysiology of COVID-19; the second regards efforts to produce vaccines against SARS-CoV-2 or a speed without precedent in the history of science; the third comprehends the attempts to find a marketed drug that can be used to treat COVID-19 by drug repurposing. In this review, the drugs that have been repurposed so far are grouped according to their chemical class. Their structures will be presented to provide better understanding of their structural similarities and possible correlations with mechanisms of action. This can help identifying anti-SARS-CoV-2 promising therapeutic agents.

1. Introduction

The world is facing a huge challenge in the coronavirus disease (COVID-19) pandemic: How to fight an enemy without weapons in terms of therapy? Unfortunately, even before the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) worldwide spread, there were no clinical treatments or prevention strategies available for any human coronavirus.¹ It is understandable that both society and researchers urge the discovery of new compounds or even of a drug that is commercially available that can be employed by physicians mainly for patients with the extreme presentation of COVID-19. There is also urgency in the discovery of medicines with prophylactic action to prevent the entry of the virus in host cells after exposure. Vaccine research experts already indicate that rescue from SARS-CoV-2 will come from a long but effective journey to produce a vaccine.² While this is not a reality, the scientific community, including medicinal chemists and doctors who accompany patients, are trying to identify therapeutic alternatives. This is a meritorious attitude: The commitment with the

protection of humanity. Nevertheless, the rigorous nature of science in the discovery of a new drug cannot be disregarded, even during a pandemic and in the face of the urgent demand for a treatment, to avoid eventual mistakes and ignominious hope.

The increase in studies related to SARS-CoV-2 during the first semester in 2020 has allowed the rather speedy identification of promising therapeutic targets for both developing immunotherapies and producing/identifying antiviral drugs. It is noteworthy the increase in outbreaks of SARS-CoV (2002) and MERS-CoV (2013), with accelerated production of knowledge on these HCoV, which has been very useful for ongoing investigations on SARS-CoV-2. One example is the availability of technological devices that allowed the fast sequencing of SARS-CoV-2 genome and the elucidation of a promising antigen target, the S glycoprotein. Nonetheless, the development of a human vaccine can take years, especially because employing emergent technologies requires extensive safety tests and expansion to large scale production in order to assist the world population, as demanded in the case of the COVID-19 pandemic.³

*Corresponding author at: Laboratório de Biologia Molecular, Universidade de Pernambuco, Garanhuns, PE, Brazil.
 E-mail address: simara.monica@upe.br (S.M.V. de Almeida).

<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.113717>

Received 28 June 2020; Received in revised form 29 July 2020; Accepted 3 September 2020

Available online 13 September 2020

0944-6460/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Albumin roles in developing anticancer compounds

Amélia Galdino Ribeiro¹ · Josiel Emanuel Ferreira Alves² · José Clebarson Santos Soares¹ ·
 Kestelaine Lima dos Santos¹ · Isis Trindade Tenório Jacob² · Cindy Juliane da Silva Ferreira³ ·
 Jéssica Calerino dos Santos³ · Rafael David Souto de Azevedo³ · Sinara Mônica Vitalino de Almeida^{1,2,3} ·
 Maria do Carmo Alves de Lima¹

Received: 22 March 2021 / Accepted: 26 May 2021

© The Author(s), under exclusive license to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

Abstract

Albumin is an abundant protein in nature, with several biological functions. In the human body, both in health and in illness, its transport function is highlighted by the binding to medicinal drugs and consequent distribution in the bloodstream to the site of action. This is particularly relevant for anticancer treatments, since this protein accumulates in the tumor microenvironment to supply the energetic demands of cancer cells. Different spectroscopy, thermodynamic and in silico studies techniques can be employed to verify how albumin binds to ligands by using either human serum albumin (HSA) or bovine serum albumin (BSA) due to their structural similarity. There is an increasing tendency to use albumin in analyses of absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) properties of anticancer molecules, which further demonstrated the promising character of this investigation for proposing new drugs.

Keywords Albumin · Cancer · Transport · Interaction · Drugs

Introduction

Pharmacological properties of drugs are influenced by the binding and the affinity to plasma proteins, including serum albumin and glycoproteins. This drug-protein binding is reversible in nature, and the balance between the bound and free drug molecule is expected. Therapeutic effects are only shown by the unbound fraction of the drug and the degree of protein binding varies from drug to drug [1, 2]. Therefore, the protein-drug binding tendency is considered one of the most significant factors in the evaluation of specific pharmacological activities [3].

In the last years, there has been an increase in the number of studies performed to determine the involvement of serum proteins in the therapeutic response in both health and disease, including cancer. After serum protein binding, the half-life of a drug can be improved by increasing stability and decreasing toxicity, which can lead to better therapeutic outcomes [4, 5]. If the drug-protein binding affinity towards serum proteins is weak, the drug will be metabolized and excreted from the body very quickly, so its therapeutic effect will be also weak. On the other hand, elevated binding affinity implicates a better drug retention time in the body, which can either lead to high toxicity and undesired side effects or to extended therapeutic benefits [6]. In other words, the binding of compounds to blood serum proteins may affect the distribution, the biotransformation and the mechanism of action of drugs [7]. Because investigations on drug-protein binding help to predict the therapeutic effect and possibly to improve drug efficacy [8], in-depth knowledge of the interaction between serum proteins and drugs is extremely important and significant in clinical medicine, life sciences and chemistry [9, 10].

Albumin is present in several animal classes such as mammals, birds, fish, reptiles and amphibians, with up to 40% of structural similarity [11]. In general, this protein is named according to the organism of origin, for example,

✉ Sinara Mônica Vitalino de Almeida
sinaramonica@ipece.br

¹ Laboratório de Química e Inovação Terapêutica (LQIT) – Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

² Laboratório de Imunopatologia Entre Animais (LIEA), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

³ Laboratório de Biologia Molecular, Universidade de Pernambuco, campus Gamboa, Garanhuns, PE, Brazil