UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

LUIZ DA SILVA MAIA NETO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA E IMUNOMODULADORA *IN VITRO* E ESTUDOS *IN SILICO* DE COMPOSTOS PIRIDIL-TIAZOLÍNICOS

Recife
2022

LUIZ DA SILVA MAIA NETO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA E IMUNOMODULADORA *IN VITRO* E ESTUDOS *IN SILICO* DE COMPOSTOS PIRIDIL-TIAZOLÍNICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Tecnologias Energéticas e Nucleares.

Área de Concentração: Aplicações de Radioisótopos na Indústria e Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Elvis Joacir de França.

Orientadora Externa: Profª. Drª. Mércia Liane de Oliveira.

Recife

2022

Catalogação na fonte
Bibliotecária Margareth Malta, CRB-4 / 1198

M217a Maia Neto, Luiz da Silva.
Avaliação da atividade antineoplásica e imunomoduladora *in vitro* e estudos *in silico* de compostos piridil-tiazolínicos / Luiz da Silva Maia Neto. - 2022.
60 folhas, il., gráfs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Elvis Joacir de França.
Orientadora Externa: Profa. Dra. Mércia Liane de Oliveira.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2022.
Inclui Referências.

1. Energia Nuclear. 2. Piridina. 3. Antitumoral. 4. Tiazol. 5. Docking molecular. 6. Citocinas. I. França, Elvis Joacir de (Orientador). II. Oliveira, Mércia Liane de (Orientadora Externa). III. Título.

UFPE

621.4837 CDD (22. ed.) BCTG/2024-68

LUIZ DA SILVA MAIA NETO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA E IMUNOMODULADORA *IN VITRO* E ESTUDOS *IN SILICO* DE COMPOSTOS PIRIDIL-TIAZOLÍNICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Tecnologias Energéticas e Nucleares. Área de Concentração: Aplicações de Radioisótopos na Indústria e Medicina.

Aprovada em: 15/12/2022.

BANCA EXAMINADORA

_____
Profa. Dra. Mércia Liane de Oliveira (Orientadora Externa)
Centro de Tecnologias Estratégias do Nordeste

_____
Prof. Dr. Paulo André Teixeira de Moraes Gomes (Examinador Externo)
Instituto Aggeu Magalhães-Fiocruz

_____
Prof. Dr. Raul Emídio de Lima (Examinador Externo)
Instituto Aggeu Magalhães - Fiocruz.

_____
Profa. Dra. Mariana Brayner Cavalcanti Freire Bezerra (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

_____
Profa. Dra. Ana Maria Mendonca de Albuquerque Melo (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico aos meus pais e demais familiares pelo crédito e apoio.

AGRADECIMENTOS

A minha família, em especial a minha mãe, Ivonete, meu pai, Damião e minha irmã, Luana.

Aos Professores Dra. Mércia de Oliveira e Dr. Elvis França, pela orientação, paciência e pelo exemplo profissional e pelos ensinamentos que certamente procurarei transmiti-los. A vocês, meu respeito e admiração.

Aos professores(as) Jaciana Aguiar, Ervelyn, Virginia Lorena, Isabella Coimbra e Raul Emídio pelo auxílio e contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

A secretaria do PROTEN, Nilvânia e Kalydja, por toda ajuda e paciência desde sempre.

Ao meu aluno, Carlos Daniel “Bracho” pelo apoio, que foi extremamente importante para conclusão desta etapa.

Aos amigos Vanessa Almeida, Weslley Felix, Zé Roberto e todos os meus amigos e parceiros da UNIBRA pelos bons momentos, carinho e amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares e ao Departamento de Energia Nuclear da UFPE.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Um obrigado a todos, do fundo do meu coração!

"A precisão no diagnóstico é o primeiro passo para um tratamento eficaz e uma melhor qualidade de vida para os pacientes."

— National Cancer Institute, 2021.

RESUMO

O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo. Nos últimos anos, houve melhorias no diagnóstico e tratamento, resultando em uma redução de mais de 20% na taxa de mortalidade dessa doença. No entanto, o câncer ainda representa um sério problema de saúde pública. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antineoplásica de compostos piridil-tiazolínicos por meio de estudos in vitro, imunomodulatórios e in silico. Quinze compostos híbridos piridil-1,3-tiazol e tiossemicarbazonas foram sintetizados por substituição nucleofílica. Esses compostos foram testados quanto ao seu potencial antitumoral em um estudo farmacológico, realizado em várias linhagens in vitro, utilizando uma concentração de 50 µM/mL. As linhagens escolhidas para o estudo foram HT-29 (adenocarcinoma de cólon), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), PC-3 (adenocarcinoma de próstata) e HCT-116 (adenocarcinoma de cólon), além da linhagem não tumoral Vero (células de rim de macaco-verde africano, Chlorocebus sabaeus), que serviu como controle negativo. A maioria dos compostos apresentou atividade citotóxica em pelo menos uma das linhagens testadas. Os compostos TAP-04 e TP-11 mostraram atividade citotóxica em três das linhagens tumorais avaliadas. No entanto, o composto TAP-04 apresentou alta toxicidade para as células não tumorais (Vero), em comparação com o TP-11 (69% e 12,02%, respectivamente), demonstrando efeitos antiproliferativos para as células normais (Vero) (IC_{50}> 40 µM), evidenciando o TP-11 como o composto com o índice de seletividade mais favorável. Quanto à atividade imunomodulatória, o composto induziu a diminuição da expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-6 ($p>0.05$) e IL-17 ($p>0.05$). Nos ensaios *in silico*, o docking molecular apresentou uma média de 1264,47 kcal/mol, indicando que o processo de ligação pode ocorrer de forma espontânea, caracterizando uma boa estabilidade de ligação ao composto. No geral, os resultados deste estudo incentivam investigações futuras sobre o perfil antitumoral de compostos híbridos piridil-tiazolínicos.

Palavras-chave: piridina; antitumoral; tiazol; docking molecular; citocinas.

ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of death worldwide. In recent years, improvements in diagnosis and treatment have led to a more than 20% reduction in the mortality rate of this disease. However, cancer remains a significant public health issue. Therefore, the aim of this study was to evaluate the antineoplastic activity of pyridyl-thiazolinic compounds through in vitro, immunomodulatory, and in silico studies. Fifteen hybrid pyridyl-1,3-thiazole and thiosemicarbazone compounds were synthesized through nucleophilic substitution. These compounds were tested for their antitumor potential in a pharmacological study conducted on various in vitro cell lines, using a concentration of 50 µM/mL. The selected cell lines for the study were HT-29 (colon adenocarcinoma), MCF-7 (breast adenocarcinoma), PC-3 (prostate adenocarcinoma), and HCT-116 (colon adenocarcinoma), in addition to the non-tumoral Vero cell line (African green monkey kidney cells, Chlorocebus sabaeus), serving as the negative control. Most compounds showed cytotoxic activity in at least one of the tested cell lines. Compounds TAP-04 and TP-11 exhibited cytotoxic activity in three of the evaluated tumor cell lines. However, compound TAP-04 showed high toxicity to non-tumor cells (Vero) compared to TP-11 (69% and 12.02%, respectively), demonstrating antiproliferative effects on normal cells (Vero) (IC_{50}> 40 µM), highlighting TP-11 as the compound with the most favorable selectivity index. Regarding immunomodulatory activity, the compound induced a decrease in the expression of pro-inflammatory cytokines IL-6 ($p>0.05$) and IL-17 ($p>0.05$). *In silico* assays revealed that molecular docking averaged 1264.47 kcal/mol, indicating that the binding process can occur spontaneously, characterizing good binding stability to the compound. The results of this study encourage further investigations into the antitumor profile of pyridyl-thiazolinic hybrid compounds.

Keywords: pyridine; antitumor; thiazole; molecular docking; cytokines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Características gerais do câncer 19

Figura 2 – Aspectos celulares do microambiente tumoral: A- Visão reducionista. B- Concepção atual, considerando as células tumorais e todo o microambiente..... 20

Figura 3 – Distribuição por sexo dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para o biênio 2020-2022..... 21

Figura 4 – Estrutura química da piridina..... 25

Figura 5 – Estrutura química de compostos Piridil-tiazol planejados e testados pelo grupo LPqM em linhagem de célula neoplásica: A- (E)-4-(4-chlorophenyl) -2-(2-(pyridin-2-ylmethylene) hydrazinyl)thiazole, B- (E)-4-(4-chlorophenyl)-2-(2-(1-(pyridin-2-yl)ethylidene)hydrazinyl)thiazole..... 26

Figura 6 – Composição estrutural do núcleo tiazól..... 27

Figura 7 – Derivados do tiazol com atividade antitumoral. A- Tiazofurina e B- Bleomicina. 28

Figura 8 – Amplo espectro de atividades biológicas dos tiazóis..... 28

Figura 9 – Valores da concentração que inibe 50% do crescimento celular (CI50) e o intervalo de confiança (CI 95%) dos compostos em seis linhagens tumorais testadas pelo método do MTT após 72 h de incubação..... 43

Figura 10 – Análise morfológica de Hela após 48h de incubação com TP-11, coradas por panótico rápido. Aumento de 100X. A: Células de controle negativo tratadas com DMSO 1%; B: Células de controle positivo tratadas com Doxorrubicina 0,3 µg/mL; C; D e E: Células tratadas com TP-11 0,5, 7,5 e 10 µM /mL, respectivamente. Os números indicam as alterações/ observações: 1: fragmentação nuclear; 2: restos celulares e 3: núcleo picnótico..... 45

Figura 11 – Perfil de distribuição das citocinas A) IL-6, B) IFN-γ e C) TNF-α para a linhagem Hela de câncer humano..... 46

Figura 12 – Perfil de distribuição das citocinas IL-17 para a linhagem Hela de câncer humano..... 48
Figura 13 – Perfil de distribuição das citocinas IL-2, IL-4 e IL-10 para a linhagem Hela de câncer humano..... 48
Figura 14 – Estrutura química do composto TP-11..... 49
Figura 15 – Composto TP-11 se ligando ao sítio de ligação da proteína..... 50
Figura 16 – Possíveis sítios de ligação para o composto TP-11 em proteína integrina..... 51
Quadro 1 – Valores de energias de ligação obtidos para a TP-11 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Limites de detecção para citocinas dos perfis Th1/Th2/Th17..... 36

Tabela 2 – Características gerais dos compostos finais..... 40

Tabela 3 – Percentual de inibição do crescimento celular (CI%) dos compostos em quatro linhagens tumorais testados na concentração de 50μM /mL pelo método do MTT após 48h de incubação..... 44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CH_3CN	Acetonitrila
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfoxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DQF	Departamento de Química Fundamental
Et al.	E outros
H	Hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
IARC	Agência Internacional De Pesquisa Para O Câncer
IS	Índice de seletividade
K_2CO_3	Carbonato de potássio
LpQM	Laboratório de Planejamento em Química Medicinal
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PF	Ponto de fusão
Ph	Fenil
pH	Potencial hidrogeniônico
RR	Ribonucleotidio Redutase
V.S.	Virtual Screening

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15
2 OBJETIVOS 17
2.1 OBJETIVO GERAL 17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 17
3 REVISÃO DE LITERATURA 18
3.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER 20
3.2 A QUÍMICA MEDICINAL CONTRA O CÂNCER 22
3.3 IMUNOMODULAÇÃO POR MEIO DA QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS 22
3.4 DOCKING MOLECULAR NA QUÍMICA MEDICINAL 23
3.5 NÚCLEOS DE INTERESSE 25
3.5.1 Piridina 25
3.5.2 Tiazóis 27
4 MATERIAIS E MÉTODOS 29
4.1 MATERIAIS E REAGENTES 29
4.2 OBTENÇÃO DOS DERIVADOS PIRIDIL-TIAZOLÍNICOS 29
4.2.1 Síntese das hidrazonas piridínicas 29
4.2.2 Síntese das piridinas tiazólicas 30
4.2.3 Síntese das acetil piridinas tiazólicas 30
4.2.4 Síntese da tiossemicarbazona 31
4.2.5 Síntese dos tiazóis acetilpiridínicos 31
4.3 ATIVIDADE DE CITOTOXICIDADE IN VITRO 31
4.3.1 Avaliação da citotoxicidade in vitro 32
4.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA - COLORAÇÃO POR PANÓTICO RÁPIDO 32
4.5 DETECÇÃO DE CITOCINAS POR CYTOMETRIC BEAD ARRAY (CBA) 33
4.5.1 Cultura celular 33
4.5.2 CBA (Citometric Bead Array) 34
4.6 ENSAIOS IN SILICO (DOCKING MOLECULAR) 35
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA 36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 37
5.1 ATIVIDADE ANTICANCER *IN VITRO* 40
5.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA: COLORAÇÃO POR PANÓTICO RÁPIDO 44

5.3 CITOMETRIC BEAD ARRAY (CBA).....46
5.4 ESTUDOS *IN SILICO* (DOCKING MOLECULAR).....48
6 CONCLUSÃO.....54
REFERÊNCIAS.....55

1 INTRODUÇÃO

As mutações no DNA podem resultar em modificações no padrão genômico, provocando um desequilíbrio no controle mitótico das células. Esse desequilíbrio é característico do que é comumente conhecido como câncer. Esta doença, de natureza crônica, se manifesta por um crescimento celular desregulado que invade tecidos e órgãos, podendo se disseminar para outras regiões do corpo, configurando o processo conhecido como metástase (SILVA et al., 2017).

De acordo com dados da Agência Internacional de Pesquisa para o Câncer (IARC), o câncer é considerado a segunda maior causa de morte, ficando atrás apenas das doenças do tipo cardiovasculares. São diagnosticados mais de 9,5 milhões de novos casos de câncer por ano e cerca de seis milhões de mortes em decorrência desta doença. Estudos realizados pela IARC apontam uma estimativa de aproximadamente 21,4 milhões de novos casos e 13,2 milhões de mortes até 2030. O relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS), publicado em 2020, apontou os seis cânceres mais comuns na população: pulmão, mama, cólon-retal, próstata, estômago e câncer do colo do útero.

Embora já existam técnicas bem estabelecidas no tratamento do câncer, pesquisas que busquem alternativas que minimizem os efeitos colaterais da quimioterapia e radioterapia nos pacientes terão impactos diretos e positivos nas políticas públicas de saúde (CARDOSO et al., 2014; DE SANTANA et al., 2018). Desta forma, uma das alternativas para o tratamento do câncer consiste na síntese de compostos buscando a potencialização da atividade no combate às células cancerígenas. A piridina, por exemplo, é um nucleotídeo que veem sendo amplamente estudada por apresentar processos biológicos importantes, tais como, a oxirredução enzimática e atividade seletiva de citotoxicidade contra células de linhagens neoplásicas (CHAO, 2012; SILVA et al., 2017; BARBOSA et al., 2019; VASCONCELOS et al., 2021).

Outra classe de moléculas que têm demonstrado resultados promissores são os tiazóis. As moléculas derivadas dos tiazóis possuem o anel tiazólico atuando como farmacóforo versátil para a síntese de novos derivados. No câncer, pesquisas vêm mostrando que seus derivados podem atuar por meio da inibição de quinases, metaloproteinases de matriz (MMPs) e proteínas antiapoptóticas da família BCL2.

Além disso, os análogos de tiazóis apresentaram propriedades antimetastáticas (MORIGI et al., 2015; GENG-YING et al., 2021). Atualmente existem vários estudos sobre técnicas que buscam aprimorar as atividades biológicas dos compostos através da união de diferentes anéis, essa estratégia é conhecida como hibridização molecular (SZYCHOWSKI et al., 2017).

Essa estratégia pode ser usada para conectar o anel de piridina com o anel tiazolínico em uma nova série de compostos tricíclicos para desenvolver moléculas visando o domínio dos zimogênios inativos e pro-metaloproteinases (proMMPs). Assim, compostos com núcleos piridil e 1,3-tiazol foram descritos como imunomoduladores, anti-inflamatórios e citotóxicos para células cancerígenas (SILVA et al., 2017).

A imunomodulação possui um perfil interessante quando correlacionada às características estruturais de certos compostos sintéticos pela ação direta sobre receptores de membrana ou proteínas relacionadas com a produção de citocinas, atuando de forma direta no contexto imunológico da formação do tumor. Tais citocinas são produzidas tanto por células tumorais, quanto pelas células do sistema imunológico. Desta forma, o uso de estratégias imunomoduladoras associadas a atividade antitumoral, caracteriza uma abordagem promissora dentro deste contexto (FIGUEIREDO et al., 2017).

Além disto, com o avanço na área da informática nos últimos anos, uma forma para obtenção de dados científicos que vem ganhando visibilidade é a modelagem molecular de fármacos associada ao estudo *in sílico* de estruturas químicas de moléculas de interesse farmacêutico, de forma a permitir, uma análise estrutura-atividade por meio de procedimentos computacionais. Desta forma trazendo mais possibilidades de integração entre o composto e o ligante (alvo molecular). Isso explica por que a indústria farmacêutica tem investido muito na compra de computadores cada vez mais potentes em seus centros de pesquisas (SANTANA et al., 2020).

Diante do exposto, este trabalho visou investigar o potencial anticancerígeno *in vitro* de compostos análogos a piridina e tiazol, além da atividade imunomoduladora por meio da quantificação de citocinas TH-1, TH-2 e TH-17 importantes no contexto tumoral, bem como características de ligação ligante-receptor, através de estudos *in sílico*.

2 OBJETIVOS

Diante do disposto trabalho, ressalta-se a importância de pontuar os objetivos gerais e específicos de forma clara, explicitando-os da seguinte maneira:

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antineoplásica de compostos piridil-tiazolícos por meio de estudos *in vitro* e *in sílico*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Analisar *in vitro* o potencial antitumoral frente às linhagens de câncer humano HeLa (carcinoma cervical), HT-29 (adenocarcinoma de cólon), MCF-7 (adenocarcinoma mamário), PC3 (adenocarcinoma de próstata), HCT-116 (adenocarcinoma de cólon), além da linhagem Vero (linhagem normal de células epiteliais renais de macaco-verde africano);
b) Determinar o perfil imunomodulatório do composto mais citotóxico frente a quantificação das citocinas TH-1, TH-2 e TH-17;
c) Realizar os estudos *in sílico* do composto com melhor atividade antitumoral e índice de seletividade por meio de programas computacionais.

3 REVISÃO DE LITERATURA

O câncer é uma doença multifatorial, caracterizada pelo crescimento desordenado de células que apresentam características atípicas. Outro fator comum aos tipos de câncer é a incapacidade de diferenciação celular normal. As células adquirem características de malignidade por meio do processo de progressão tumoral, que consiste no crescimento progressivo, na invasão e na formação de metástases. Quanto aos tumores podemos classificá-los de duas formas, neoplasias benignas e tumores malignos (COSTA, 2015; WHO, 2018).

As neoplasias benignas são caracterizadas por apresentarem crescimento anormal de células análogas às células do tecido original, crescimento lento e não apresentarem características metastáticas. A origem de um processo neoplásico normalmente se dá a partir de uma única célula. Esta célula foi exposta a algum tipo de agente (químico, físico ou biológico) e sofreu mutações genéticas. Resultando assim na progressão de uma lesão pré-cancerígena, envolvendo vários estágios, levando a formação de tumores malignos (AL-OMARY et al., 2012; KLATT, 2017).

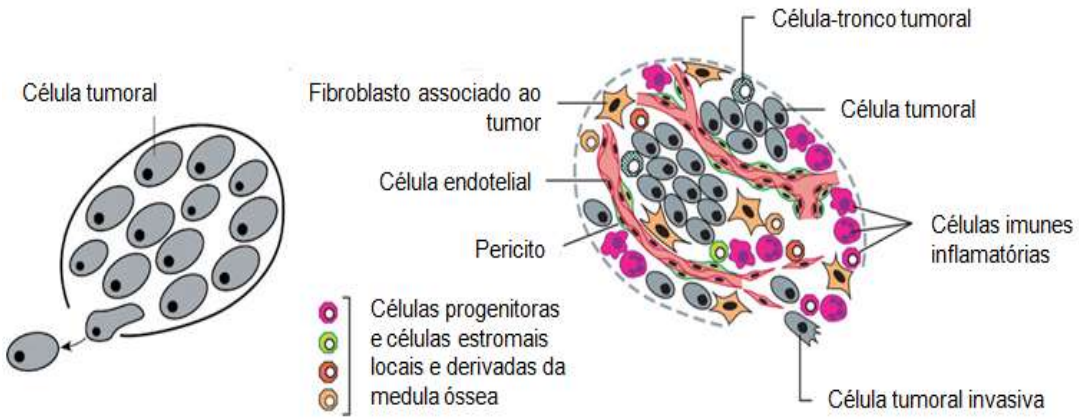
Tais tumores malignos possuem características que constituem o alicerce lógico para o entendimento dessa doença (Figura 1), essas características incluem: escape dos processos de inibição, escape do sistema imunológico, possibilidade de replicação infinita, promoção de inflamação, invasão e formação de metástase, estímulo para formação de novos vasos sanguíneos, instabilidade genômica, resistência aos mecanismos de morte celular, reprogramação do metabolismo celular e estímulo permanente para proliferar.

Figura 1 – Características gerais do câncer

Fonte: https://www.cell.com/fulltext/S0092-8674(11)00127-9

Durante muito tempo os estudiosos da área tinham uma visão reducionista sobre o câncer, ou seja, o foco era baseado apenas no tumor em si (Figura 2A). Atualmente, quando se fala de câncer é levado em consideração todo sistema ao redor e que interagem de forma direta e indiretamente com o tumor, ou seja, são vistos como tecidos complexos onde as células transformadas apresentam capacidade de recrutar e converter células típicas, que atuam como coadjuvantes na formação neoplásica. Desta forma pode- se dizer que as particularidades fenotípicas do câncer não dependem apenas das células tumorais e sim de todo um sistema (Figura 2B) (SANTOS, et al., 2016).

Figura 2 – Aspectos celulares do microambiente tumoral: A- Visão reducionista. B- Concepção atual, considerando as células tumorais e todo o microambiente



Fonte: https://www.correiobraziliense.com.br/.

3.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) (2017), o câncer é considerado a segunda maior causa de morte em todo mundo, ficando atrás apenas das doenças do tipo cardiovascular. O número de novos casos de câncer deverá aumentar em cerca de 70% ao longo das próximas décadas. Para 2030, serão mais de 21 milhões de novos casos e 13 milhões de mortes por câncer, isso devido ao crescimento e envelhecimento da população, assim como a diminuição das mortes devido a doenças infecciosas e redução na mortalidade infantil (OMS, 2017).

Segundo o Globocan (2018), os principais tipos de câncer atualmente diagnosticados em todo o mundo são: pulmão (2,09 milhões), mama (2,09 milhões), intestino (1,8 milhões), próstata (1,28 milhões) e estômago (1,03 milhão). Nos homens, os mais frequentes foram pulmão (14,5%), próstata (13,5%), intestino (10,9%), estômago (7,2%) e fígado (6,3%). Nas mulheres prevalece, mama (24,2%), intestino (9,4%), pulmão (8,4%), colo do útero (6,6%) e glândula tireoide (5,1%).

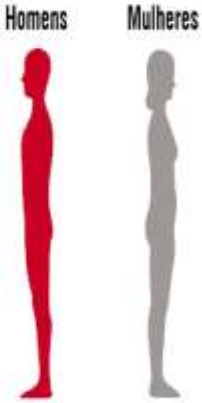
No Brasil, de acordo com a última estimativa realizada pelo INCA (Instituto Nacional de Câncer) foi estimado para o biênio 2020-2022 o surgimento de mais de 500 mil novos casos de câncer. Além disso, acredita-se que esta doença continuará aumentando nos países considerados em desenvolvimento. Em países desenvolvidos seu crescimento será ainda maior caso não haja a implementação de medidas preventivas (INCA, 2020).

Ainda em concordância com o Inca (2020), o Brasil vem passando por alterações no contexto econômico, social e da saúde. O aumento da expectativa de vida e a evolução dos métodos de diagnósticos, podem explicar o crescimento das taxas de incidência de câncer ao longo dos anos. Esses fatores trouxeram alterações importantes no perfil de morbidade e mortalidade, diminuindo a ocorrência das doenças infectocontagiosas e evidenciando as doenças crônicas como novo centro de atenção dos problemas de doença e morte da população brasileira (INCA, 2020).

Estima-se que no Brasil os cânceres mais frequentes em homens serão próstata (31,7 %), colón (68 mil), pulmão (8,7%), intestino (8,1%), estômago (6,3%) e cavidade oral (5,2%). Já para as mulheres os tipos de câncer que figurarão entre os principais serão mama (29,5%), intestino (9,4%), colo de útero (8,1%), pulmão (6,2%) e glândula tireoide (4,0%) como mostra a Figura 3 (INCA, 2019).

Figura 3 – Distribuição por sexo dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para o biênio 2020-2022

Localização primária	casos novos	%
Próstata	61.200	28,6%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%
Cólon e Reto	16.660	7,8%
Estômago	12.920	6,0%
Cavidade Oral	11.140	5,2%
Esôfago	7.950	3,7%
Bexiga	7.200	3,4%
Laringe	6.360	3,0%
Leucemias	5.540	2,6%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%



Localização primária	casos novos	%
Mama Feminina	57.960	28,1%
Cólon e Reto	17.620	8,6%
Colo do Útero	16.340	7,9%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Estômago	7.600	3,7%
Corpo do Útero	6.950	3,4%
Ovário	6.150	3,0%
Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

Fonte: INCA, 2019.

Atualmente existem alguns tratamentos bem definidos contra o câncer, são eles: procedimentos cirúrgicos, radioterapia e a quimioterapia, este último faz uso de compostos químicos para o tratamento desta doença, combatendo totalmente o tumor ou aumentando e melhorando a qualidade de vida dos pacientes (SIQUEIRA et al., 2019).

3.2 A QUÍMICA MEDICINAL CONTRA O CÂNCER

A química medicinal é tida como uma ciência que utiliza compostos químicos para o tratamento de inúmeras doenças como, por exemplo, o câncer. A ação e o efeito dos quimioterápicos acontecem de forma sistêmica no organismo (INCA, 2018).

No contexto histórico a utilização de compostos químicos para o combate de células transformadas teve início durante a segunda guerra mundial nesse período foi observado um grande número de soldados expostos ao gás mostarda, que mais tarde morreram por atrofia de glândulas linfáticas e problemas na medula óssea. A partir daí, se passou a investigar a atividade de substâncias que poderiam causar o câncer, bem como combater a doença. Em meados da década de 1950 foram identificados os primeiros medicamentos com atividade anticâncer, o que levou a um rápido desenvolvimento da quimioterapia antineoplásica (COSTA-LOTUFO, 2010; OLIVEIRA et al., 2021).

Atualmente existem inúmeros agentes quimioterápicos, e a escolha de qual deve ser utilizado depende das particularidades de cada caso, levando em consideração: o tipo de tumor, o estadiamento da doença e as condições do paciente. Para tratamento, na maioria das vezes, é utilizada uma combinação de medicamentos, que podem ser, inibidores mitóticos, agentes alquilantes ou antimetabólitos.

Embora seja indiscutível o avanço dos quimioterápicos nas últimas décadas, suas atividades deixam a desejar quanto à especificidade, agindo não só em células tumorais, mas também em células normais, em ambos os casos pode ser observado uma alteração no perfil do metabolismo celular através da expressão de citocinas pró-inflamatórias (MORVAN et al., 2016; TAVARES et al., 2020).

3.3 IMUNOMODULAÇÃO POR MEIO DA QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS

Dentre os compostos secretados pelas células que compõem a massa tumoral, um dos mais importantes para estudos imunológicos são as citocinas. Esses compostos são proteínas que podem fornecer respostas mediadas por receptores. Atualmente, além dos tratamentos mais convencionais contra o câncer citados anteriormente, a imunoterapia, por exemplo, é um método que pode utilizar como

abordagens as citocinas no tratamento contra certos tipos de tumores. As citocinas podem agir nas maquinarias que dirigem o seu próprio processo de produção, interferindo diretamente no contexto imunológico do microambiente tumoral (MILLER et al., 2016; FIGUEIREDO et al., 2017).

Estas citocinas são produzidas tanto por células neoplásicas malignas, como por células do sistema imune inato e adaptativo, em resposta a uma série de mecanismos celulares, incluindo danos induzidos por carcinógenos, infecção biológica e processos inflamatórios. Sendo assim, o uso de estratégias para modular de forma completa o microambiente tumoral do paciente, constitui uma abordagem interessante no contexto imunomodulatório (MORVAN et al., 2016).

Como sugerido por Mitelman et al., (2009) e Cândido (2011), dentro das mais estudadas, as citocinas da linhagem de células Th1, Th2 e Th17 são umas das mais relevantes para imunomodulação de cânceres atualmente.

Um dos principais mecanismos de ação desempenhada pela resposta Th1 a partir da liberação de citocinas como IL-2, IFN-γ e TNF-α, se dá por meio da indução do sistema imune na ativação de macrófagos e células dendríticas, bem como, no processo recrutamento de células T $CD8^+$ e linfócitos do tipo NK em respostas a processos inflamatórios e tumorais. Não obstante, as respostas mediadas pela via humoral favorecidas pelas células Th2 correspondem a uma ativação do sistema imune através de citocinas como interleucina-4, interleucina-6 com atividade inibitória da resposta celular Th1 (SERS et al., 2002).

As células T helper 17(Th17), também demonstram grandes propriedades para o processo de imunomodulação tumoral. Essas células são expressas a partir da diferenciação dos linfócitos T CD4+ e possuem linhagens distintas das Th1 e Th2 (KORN *et al*., 2009). Estas células possuem a capacidade de produção de diversas citocinas, entre elas, IL-17A, IL-17F, IL-21 IL-22 e CCL20. (LIANG, et al., 2006; CHANG; DONG, 2007).

3.4 DOCKING MOLECULAR NA QUÍMICA MEDICINAL

No processo de planejamento e síntese de novos compostos com atividade biológica, diversas abordagens podem ser utilizadas, entre elas podemos citar as abordagens *in silico*. Estratégias *in silico* têm se mostrado como uma excelente saída

para o desenvolvimento de novas drogas, uma vez que permitem testes de um grande número de moléculas (ZHANG et al., 2021). No contexto de diversas doenças consideradas graves e comuns, como o câncer, muitas vezes apenas tratamentos com eficácia limitada estão disponíveis, reforçando a necessidade do desenvolvimento rápido, seguro e de custo mais acessível de novas abordagens terapêuticas (ZARGARAN et al., 2021).

O uso de estratégias *in silico* na triagem de novos compostos visa a predição de atividade biológica, bem como de alvos biológicos, e tem obtido resultados cada vez mais assertivos. No contexto do docking molecular, duas moléculas, um ligante e um receptor, têm a capacidade de se encaixar, possibilitando a especulação sobre diversas formas de interação. O termo *docking* no inglês se refere ao processo de ancoramento de um navio a um cais. De maneira análoga, este método é empregado para a avaliação do acoplamento de uma molécula ao sítio ativo de uma enzima. Diferentes tipos de moléculas podem ser utilizados no *docking molecular*, como proteínas, carboidratos, e ácidos nucleicos (KARIM et al., 2017; GOMES et al., 2021).

Durante o processo de encaixe molecular, tanto o receptor quanto o ligante sofrem mudanças em sua conformação primária. O reconhecimento molecular é um processo dinâmico, porém de alta complexidade, envolvendo um grande número de interações moleculares entre o ligante e o receptor (MOREIRA et al., 2020). Com a finalidade de solucionar a complexidade do *docking*, normalmente é usado um algoritmo que de forma eficaz analisa a conformação e a orientação do ligante ao receptor. Posteriormente, é realizada a identificação da afinidade de ligação do complexo receptor-ligante através da energia livre de ligação, viável computacionalmente (COUTINHO et al., 2007).

Desde quando foram utilizados os primeiros algoritmos, vários métodos têm sido implementados, estudados e melhorados. Além da diferenciação na função de *scoring*, os métodos de *docking* se diferenciam em relação ao grau de flexibilidade biológica. Dessa forma, existem programas que tratam tanto o receptor quanto o ligante como moléculas rígidas, considerando assim os pontos translacionais e rotacionais do ligante. Atualmente esses algoritmos são utilizados na triagem de grande banco de compostos para a identificação de moléculas bioativas, com intuito de uma possível investigação com técnicas de *docking* mais precisas (TROTT et al., 2010; KNAPP et al., 2011).

No *docking molecular*, a estrutura da proteína é experimentalmente fixada em uma posição específica. Em alguns programas, é possível incorporar a flexibilidade da proteína em relação ao receptor, especialmente em relação a certos resíduos próximos ao sítio de ligação. Essa abordagem permite que os métodos de *docking* descrevam as interações entre o receptor e o ligante. (LAGORCE et al., 2015).

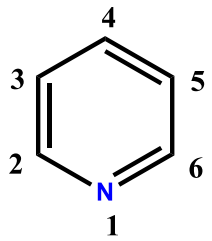
3.5 NÚCLEOS DE INTERESSE

Inúmeros grupamentos químicos vêm apresentando potentes ações biológicas e desta forma se mostrando como promissores candidatos a novos fármacos no tratamento de doenças. A seguir serão descritos núcleos que possuem atividade anticâncer reconhecida.

3.5.1 Piridina

A piridina (Figura 4) é um heterocíclico orgânico de grande importância para a indústria farmacêutica, além de se caracterizar como um potente catalisador químico e biológico (CHAUBEY et al., 2011).

Figura 4 – Estrutura Química da Piridina



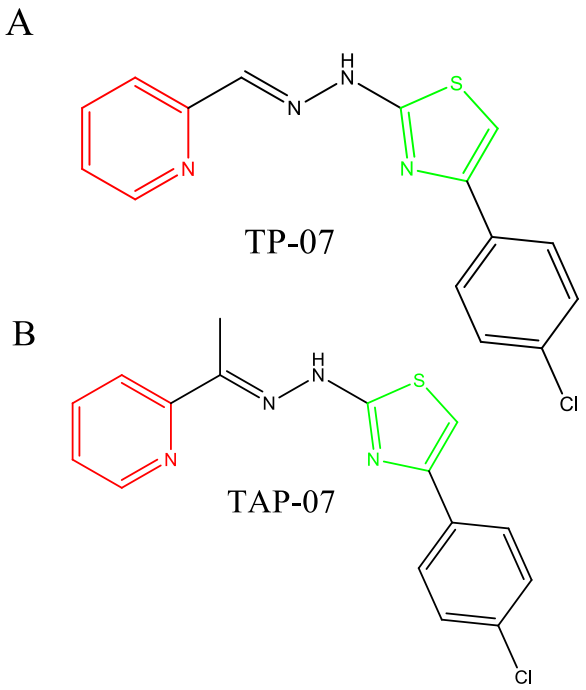
Fonte: O Autor (2022).

A piridina protética (NADP) é um nucleotídeo que está envolvido em vários processos biológicos importantes, por exemplo, a oxirredução enzimática. Outra importante atividade da piridina em sistemas biológicos é a sua presença nas vitaminas niacina e vitamina B6. Na indústria farmacêutica, a piridina forma um amplo núcleo de medicamentos já existentes e comercializados, totalizando aproximadamente 7.000 (VASCONCELOS et al., 2021).

Pesquisas vêm mostrando que derivados desse composto apresentam várias atividades como: bactericida (BHATIA, 2009), fungicida (OZDEMIR et al., 2010), anticâncer (SILVA et al., 2017) e tripanocida (CARDOSO et al., 2014).

Estudos desenvolvidos no LpQM (Laboratório de Planejamento em Química Medicinal) vêm trabalhando com diversos compostos heterocíclicos os quais evidenciam em sua estrutura, núcleos piridil-tiazóis, e apresentaram potente atividade anticâncer, como descrito por Silva et al., (2017) e representados na Figura 5.

Figura 5 – Estrutura química de compostos Piridil-tiazol planejados e testados pelo grupo LPqM em linhagem de célula neoplásica: A- (E)-4-(4-chlorophenyl)-2-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)thiazole, B- (E)-4-(4-chlorophenyl)-2-(2-(1-(pyridin-2-yl)ethylidene)hydrazinyl)thiazole



Fonte: SILVA et al. (2017)

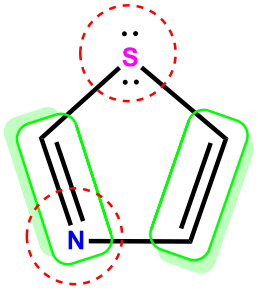
Silva e colaboradores (2017) mostraram que um composto da série piridil-tiazol TP-07 (Figura 5A) reduziu o número de células da linhagem HL-60, leucemia promielocítica após o tratamento a 6μM (46% de inibição), após 48h, causou inibição significativa do crescimento celular a 16μM reduzida em 68%. No entanto, o composto TAP-07 (Figura 5B) que é possível observar um grupo metil em C6 também apresentou ação anticancerígena sobre células da linhagem (HL-60), apresentando

um IC_{50} ≤3μM, assim julgadas como altamente potentes, apresentaram também um (SI) índice de seletividade favorável, sendo tóxico para células transformadas e não tóxico para linfócitos do sangue periférico humano.

3.5.2 Tiazóis

Os tiazóis ou 1,3 tiazóis são uma classe de compostos heterocíclicos constituídos por um anel de cinco membros contendo três átomos de carbono, um de enxofre e um de nitrogênio, além de duas duplas ligações (Figura 6). Os tiazóis são membros dos heterociclicos azóis que incluem imidazóis e oxazóis. O anel tiazol é planar e sua aromaticidade é caracterizada pela deslocalização de um par de elétrons do átomo de enxofre para completar os 6 elétrons π necessários para satisfazer a regra de Huckel (KASHYAP et al., 2012).

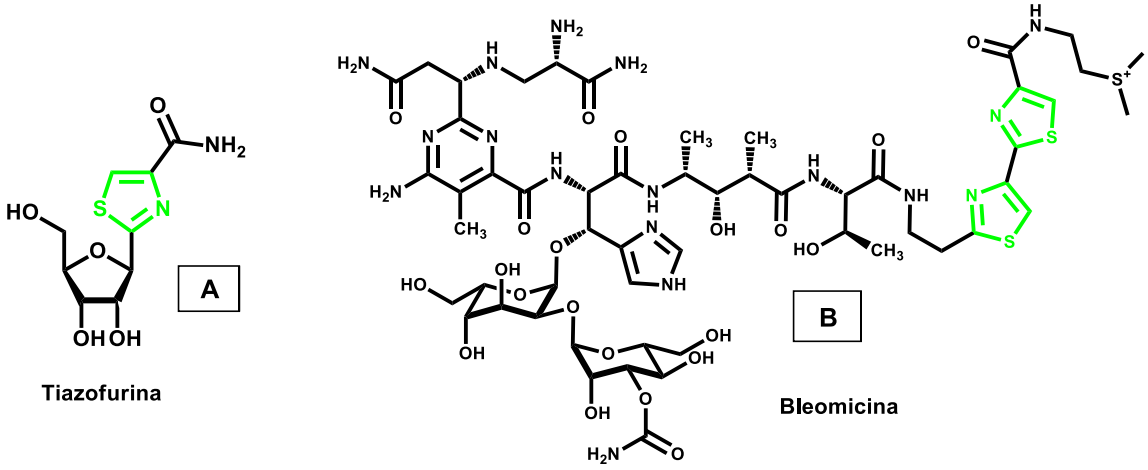
Figura 6 – Composição estrutural do núcleo tiazól



Fonte: O Autor (2022).

Esta classe de compostos destaca-se pela potente ação citotóxica frente a diferentes tipos de tumores tais como carcinoma de pulmão, adenocarcinoma de cólon, glioblastoma, melanoma, câncer de próstata e leucemia (HASSAN et al., 2012; LEFRANC et al., 2013). Como exemplo de agentes antitumorais que apresentam tiazol em sua estrutura, podem ser citados o Tiazofurina e a Bleomicina (Figuras 7 A e B, respectivamente) (KASHYAP et al., 2012).

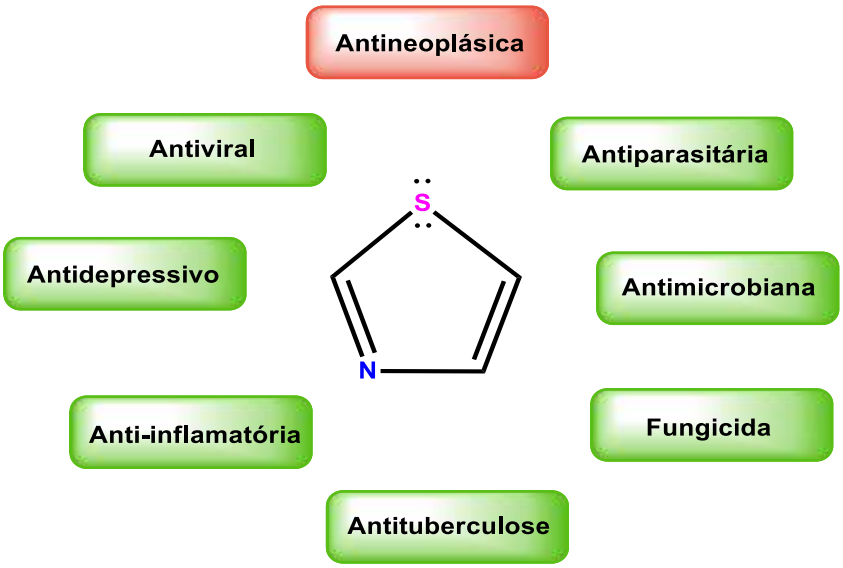
Figura 7 – Derivados do tiazol com atividade antitumoral. A- Tiazofurina e B- Bleomicina



Fonte: O Autor (2022).

Os derivados tiazólicos são conhecidamente uma classe de compostos com um amplo espectro de atividades biológicas, dentre as quais podem ser citadas a atividade antibacteriana, anti-inflamatória, imunomoduladora, anti-hipertensiva, anticonvulsivante, antidepressiva e anticâncer, conforme ilustrado na Figura 8 (MESHRAM et al., 2012). Resultados de trabalhos anteriores do laboratório (LpQM), envolvendo o núcleo tiazolínico, identificaram novos potenciais inibidores da proliferação celular. Desta forma, derivados de compostos com esse anel em sua estrutura se tornam promissores protótipos de fármacos no tratamento contra o câncer.

Figura 8 – Amplo espectro de atividades biológicas dos tiazóis



Fonte: O Autor (2022).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para fins de experimento e metodologia adotada para realizar os experimentos que envolvem a identificação e ação das moléculas citadas ao longo de toda a proposta do trabalho referido, adotou-se de forma assertiva o seguinte método:

4.1 MATERIAIS E REAGENTES

Para as reações foram utilizados os solventes: acetona e hexano (marca: dinâmica) acetato de etila e etanol (marca: cinética) isopropanol, DMF e metanol (química moderna). Todos os reagentes utilizados na síntese foram da empresa Sigma Aldrich.

As reações em laboratório foram acompanhadas a partir de cromatografia em camada delgada (CCD). A fase estacionária utilizada foi a sílica-gel 60 da Alugram® com indicador fluorescente F254. Para a visualização uma câmara de radiação ultravioleta com duas lâmpadas com diferentes comprimentos de onda (365 e 254 nm).

O banho ultrassônico (marca Unique EM-804) foi utilizado para auxiliar nos processos reacionais, com frequência de 40 kHz (180W de potência).

O fusiômetro, da marca Fisatom modelo 430D, foi usado para aferição do ponto de fusão dos produtos obtidos.

4.2 OBTENÇÃO DOS DERIVADOS PIRIDIL-TIAZOLÍNICOS

Os compostos (N=15) foram sintetizados seguindo a metodologia proposta em tese por Cardoso et al., (2012) e desenvolvido no LpQM (Laboratório de planejamento em Química medicinal) **(**CARDOSO, 2012)**.**

4.2.1 Síntese das hidrazonas piridínicas

Para obtenção do primeiro intermediário dos compostos piridil-tiazolínicos foi realizado uma reação entre o reagente 2-piridina carboxialdeído com a tiossemicarbazida usando o ácido acético glacial como catalizador para proporcionar estabilidade a reação, como resultado obteve-se a hidrazona piridínica 2-((piridin-2-il)

metileno) tiossemicarbazona). Para reação foi acrescentado 25 ml de álcool isopropílico em um balão juntamente com 2,80 mmol de piridina carboxialdeído, 2,80 mmol de tiossemicarbazida e quatro gotas de ácido acético glacial. A reação foi realizada em ultrassom sob temperatura de 45ºC por aproximadamente duas horas. Depois de passado o tempo reacional, o composto foi levado para CCD para confirmação do produto final. A formação sendo confirmada foi adicionado hexano para auxiliar na precipitação do produto, o balão foi levado para geladeira por um período de 24h e em seguida realizada uma filtração a vácuo. Após a retirada de todo o solvente o material foi armazenado em dessecador para retirada de resíduos.

4.2.2 Síntese das piridinas tiazólicas

Para síntese das piridinas tiazolínicas foi realizada uma reação em meio alcoólico (PA) entre a hidrazona piridínica e várias α-halocetonas. A reação aconteceu em um balão, onde após o álcool adicionou-se 1,66 mmol de piridina tiossemicarbazona e 1,99 mmol da respectiva α-haloacetofenona. O sistema reacional usado foi o ultrassom por aproximadamente uma hora. Posteriormente, foi usado a CCD para confirmação do término reacional. Ao término observou-se a formação de um produto da cor laranja, o qual foi submetido à refrigeração por 24h. Em seguida o precipitado foi filtrado sob vácuo, sendo lavado com hexano. Após a retirada de todo o solvente o material foi armazenado em dessecador para retirada de resíduos dos solventes usados.

4.2.3 Síntese das acetil piridinas tiazólicas

Realizou-se a obtenção da hidrazona oriunda da reação entre a acetil piridina e a tiossemicarbazida em meio etanólico e sob irradiação em ultrassom por aproximadamente 60 minutos. Posteriormente, foi usado a CCD para confirmação do término da reação. Ao término observou-se a formação de um produto da cor laranja e um pouco avermelhado, o qual foi submetido à refrigeração por 24h. Em seguida o precipitado foi lavado com hexano e filtrado sob vácuo simultaneamente. Logo após o material foi armazenado em dessecador.

4.2.4 Síntese da tiossemicarbazona

Para essa reação, adicionou-se 2,47 mmol de acetil piridina, e 2,47 mmol de tiossemicarbazida em 25 ml de álcool isopropílico, posteriormente foi adicionado 4 gotas de ácido acético glacial e todo o sistema levado para irradiação por ultrassom, por duas horas, com aquecimento de 37ºC. O termino da reação e a confirmação do produto final foi confirmada por placa de CCD. Em seguida a reação foi armazenada sob refrigeração, por 24h. Para etapa de filtração foi utilizado um funil sinterizado, a reação foi lavada com hexano e o precipitado obtido ao dessecador.

4.2.5 Síntese dos tiazóis acetilpiridínicos

Em 30 mL de isopropanol adicionou-se 1,54 mmol de acetilpiridina tiossemicarbazona e 1,85 mmol da respectiva α-haloacetofenona. O sistema foi levado para irradiação por ultrassom, por duas horas, com aquecimento de 37ºC. O término da reação e a confirmação do produto final foram registrados por meio de uma placa de CCD, onde se observou a formação de um produto de coloração amarelo claro. Em seguida a reação foi armazenada sob refrigeração, por 24h. Para etapa de filtração foi utilizado um funil sinterizado, a reação foi lavada com hexano e o precipitado obtido ao dessecador.

4.3 ATIVIDADE DE CITOTOXICIDADE IN VITRO

As linhagens celulares eleitas (HeLa, HT-29, MCF-7, PC-3, HC-116 e Vero) todas pertencentes ao Laboratório de Cultura Celular do Departamento de Antibióticos da UFPE foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 25cm^2, volume de 50mL para células aderidas, e 75cm^2, volume de 250mL para células em suspensão); utilizando o meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO_2, seguido da observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão a cada 24 horas.

Quando necessário, as células foram repicadas em meio de cultura nova, em uma concentração de 0,5-1,0 x 10^6 cél/mL.

4.3.1 Avaliação da citotoxicidade in vitro

As citotoxicidades dos compostos foram avaliadas pelo método do 3-(4,5-dimetil-2-tiazol) -2,5 difenil-2-Hbrometo de tetrazolium (MTT) (MOSMANN, 1983; ALLEY et al., 1988). As células em suspensão ou monocamadas foram distribuídas em multiplacas de 96 cavidades em uma densidade de 0,3 x 10^6 células/mL. Após 24 horas de incubação, os derivados TP e TAP dissolvidos em DMSO puro estéril para a concentração estoque de 5mg/mL, foram diluídos seriadamente em meio RPMI para obtenção das concentrações finais (0,039-25µg/mL), adicionados em placa de 96 poços (100µL/poço) e incubados por 48 horas. O quimioterápico doxorrubicina (0,09 a 5µg/mL) foi utilizado como controle positivo. O controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO. Após o período de incubação cada cavidade recebeu 25 µL da solução de MTT. As placas foram reincubadas durante 3 horas, em estufa a 37 ºC e a 5% CO_2. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 100µL de DMSO.

Para a quantificação do sal reduzido nas células vivas, as absorbâncias foram lidas com o auxílio do espectrofotômetro de placa (Modelo EL808, BioTek, USA), no comprimento de onda de 595nm (MOSSMAN et al., 1983). Os compostos foram testados em diluição seriada em triplicata. Foi registrada a percentagem de inibição x log da concentração e determinado suas CI50 (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

Os compostos com IC_{50} ≥ 70% foram considerados potentes e os compostos com valores de IC_{50} na faixa de 50 ≤ 70% foram considerados moderadamente potentes para atividade antineoplásica. Por outro lado, os compostos com IC_{50} entre 1 ≤ 50% foram considerados como tendo baixa potência. Finalmente, os compostos que exibem IC_{50}=SA (0,00), foram considerados não citotóxicos.

4.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA - COLORAÇÃO POR PANÓTICO RÁPIDO

As células HELA (carcinoma cervical) foram plaqueadas na concentração de $5x10^4$ células/mL em placas de 12 poços e, após 24 horas, foram tratadas com o composto TP-11 (5; 7,5; 10 e 15 µM), sendo incubadas por 24 e 48 horas em incubadora com 5% de CO_2 a 37°C. A doxorrubicina (0,5 µM) foi utilizada como controle positivo, e o controle negativo foi tratado apenas com o veículo (DMSO-0,5 µM). Após os períodos de incubação, as células foram fixadas com solução de triarilmetano a 0,1% (Laborclin®), coradas com solução a 0,1% de xantenos (Laborclin®) e com solução de 0,1% de tiazinas (Laborclin®) para coloração de núcleo e citoplasma. Os poços foram lavados com PBS (100 a 200 µM) para remover o excesso de corante por meio de aspiração com pipeta, e em seguida, as células foram visualizadas em microscópio óptico e fotografadas no aumento de 200x (Olympus, Tokyo, Japan) (FARIAS et al., 2020).

4.5 DETECÇÃO DE CITOCINAS POR CYTOMETRIC BEAD ARRAY (CBA)

4.5.1 Cultura celular

A linhagem celular Hela foi cultivada em meio RPMI 1640 suplementado com L-Glutamina, 10% de SFB, 10 mM de HEPES (4-(2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid) e 200 U/mL de Penicilina/Estreptomicina (Cultilab, Brasil). O ajuste celular foi realizado com 50 µL da suspensão celular final e foi adicionado à 50 µL do corante azul de tripan 0,4% v/v (Sigma-Aldrich, Brasil) ou seja, na proporção 1:1. As células foram depositadas na câmara de Neubauer e analisadas quanto à viabilidade por microscopia óptica. A concentração celular foi ajustada para $5x10^5$ células/µL (ensaio de citotoxicidade) ou para $1x10^6$ células/mL (quantificação de citocinas) de meio RPMI 1640 suplementado com 10% SBF durante 48 horas em estufa a 5% de CO_2 e 37°C. O PMA e a ionomicina (50 µM) foram utilizadas como estímulo à proliferação celular e à produção de citocinas.

Os fármacos, teste e padrão, foram adicionados à cultura logo após obtenção e ajuste da concentração celular, as condições da cultura celular para ambos os grupos foram:

- Poços contendo células + DOX (Controle positivo) + PMA e IONO;
- Poços contendo células + DMSO a 0,1% e 0,2% (Controle negativo) + PMA e IONO;

- Poços contendo células + TP-11 na concentração de 10 μM (Teste); + PMA e IONO;
- Poços contendo apenas células.

Após o período de incubação de 48h, o conteúdo dos poços foi homogeneizado e transferido para tubos tipo falcon de 15 mL. Em seguida o conteúdo foi centrifugado e os sobrenadantes foram retirados, identificados e em seguida encaminhados para a realização do CBA.

4.5.2 CBA (Citometric Bead Array)

Os sobrenadantes de cultura da linhagem tumoral Hela, bem como dos controles positivo e negativo, foram analisados em citômetro de fluxo (BD FACS Canto II Flow Cytometer), pertencente ao Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Recife-PE. Os sobrenadantes foram encaminhados para análise logo após o período de cultura (48h), não tendo sido necessário o armazenamento. As citocinas presentes foram detectadas utilizando o kit CBA Human TH1/Th2/Th17 cytokine (BD Biosciences, USA), seguindo as recomendações dos fabricantes. As citocinas IFN-γ, TNF, IL-17A, IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10 foram avaliadas considerando-se o Índice Médio de Fluorescência (IMF). Na tabela 1 podem ser observados os limites de detecção para o perfil de cada citocina.

Tabela 1 - Limites de detecção para citocinas dos perfis Th1/Th2/Th17

Citocina	**Limite de detecção (pg/mL)**
IL-2	2**,**6
IL-4	4.,9
IL-6	2,4
IL-10	4,5
TNF	3,8
IFN-γ	3,7
IL-17a	**18,9**

Fonte: O Autor (2022).

Para a preparação da solução de *beads* padrão transferiu-se *as beads* das 7 citocinas para tubo tipo Falcon de 15 mL. Em seguida adicionou-se 2 mL do *assay diluent* e incubou-se por 20 minutos. A partir desta solução fez-se diluição seriada (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256 e 1/512) a fim de obter uma curva contendo 11 pontos, onde a menor concentração (0 pg/mL) equivale ao tubo contendo apenas *assay diluent* e a maior concentração (5000 pg/mL) equivale à concentração contida no tubo da solução mãe. Enquanto aguardava-se o período de incubação, preparou-se o *mixed capture beads*, contendo os anticorpos de todas as citocinas a serem dosadas. Uma vez preparadas as soluções de trabalho, misturou-se 25 µL do mixed capture beads, 25 µL do standard ou da amostra teste e 25 µl do reagente de detecção, incubou-se por 3h à temperatura ambiente e abrigo da luz. Após 3h, adicionou-se 200 µL de *wash buffer* e fez-se a aquisição de 10.000 eventos por amostra em citômetro de fluxo utilizando o software FACSDiva. Para as análises das aquisições utilizou-se o software FCAP (LOPES et al., 2020).

4.6 ENSAIOS IN SILICO (DOCKING MOLECULAR)

A molécula com melhor atividade citotóxica para todas as linhagens testadas foi submetida ao *docking* molecular usando o Molegro Virtual Docker v. 6.0.1 (MVD), DockThor (https://dockthor.lncc.br) e Avogadro Software V.1.2. O efeito do melhor composto foi avaliado frente a estrutura de cada enzima utilizando parâmetros predefinidos no mesmo software. O ligante utilizado foi coletado por meio do servidor público Protein Data-Bank - PDB (*https://www.rcsb.org).* Para procedimento de acoplamento (ligante – enzima) foi utilizado um grid de 15 Å de raio e 0,30 de resolução que cobre o local do sítio de ligação, com as configurações do Grid definidos e: Centro X: 98.424, Centro Y: 98.454, Centro Z: 91.402, Tamanho do Grid em eixo X, Y e Z igual a 40, com discretização de 0.42 e um total de 884.736 pontos analisados no Grid, definido através de um ligante conhecido para cada enzima.

Foi gerado o modelo para realizar o encaixe com características esperadas entre o ligante e a enzima, utilizando o algoritmo Moldock score (GRID) como função de pontuação e o algoritmo de busca foi o Moldock144. Evidenciando as pontuações de ancoragem são calculadas pela função de pontuação interativa baseada em

conhecimento ITScorePP ou ITScorePR do próprio servidor; Pontuação de confiança (Confidence Score) calculado pelo próprio servidor seguindo a seguinte fórmula Confidence_score = 1.0/[1.0+$e^{0.02*(Docking_Score+150)}$], onde uma pontuação de 0.7 ou acima significa que as duas moléculas provavelmente se ligariam, entre 0.5 e 0.7 existe uma possibilidade de ligação, e abaixo de 0.5 a ligação se torna improvável.

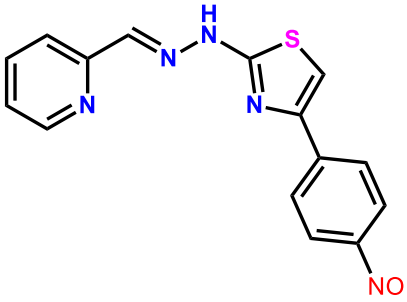
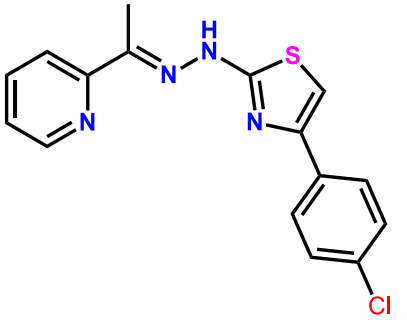
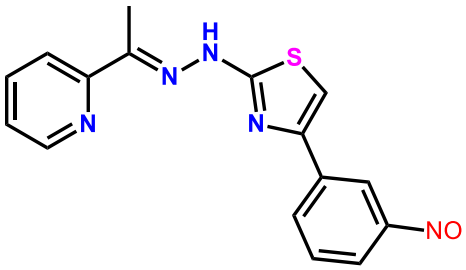
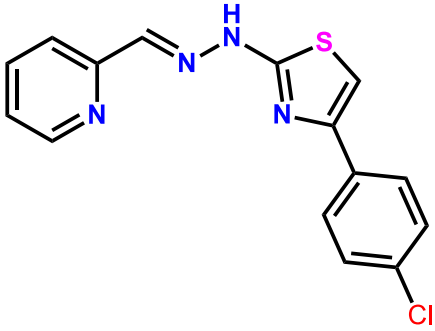
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

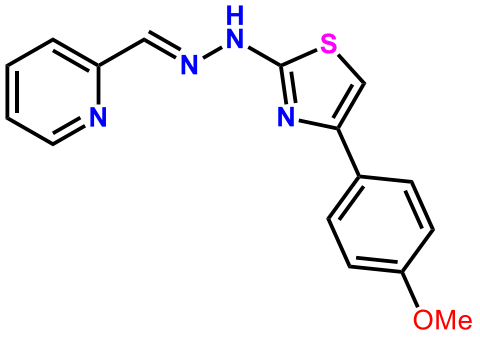
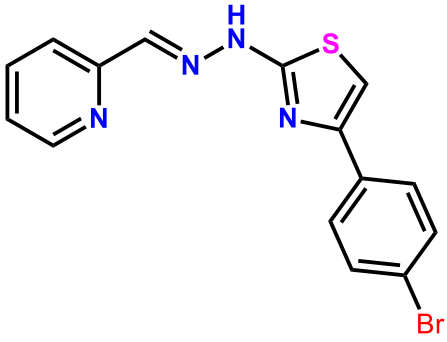
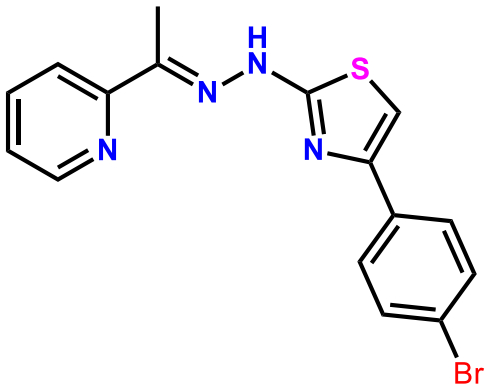
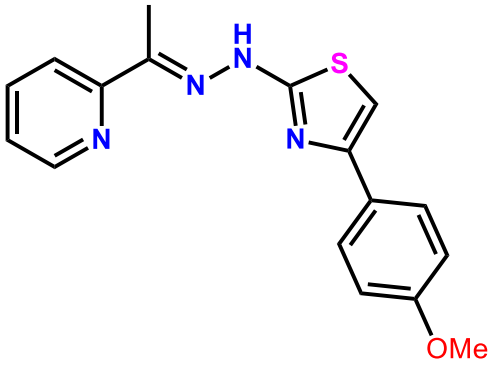
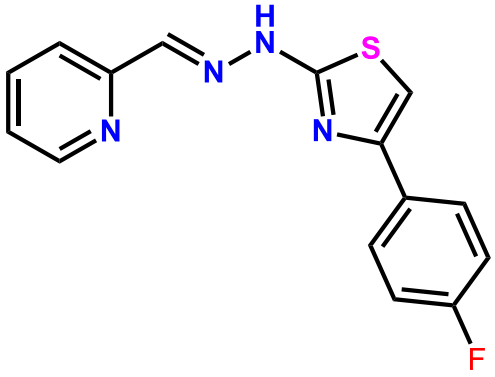
Os resultados em relação aos níveis de citocinas e NO foram avaliados estatisticamente usando o GraphPad Software Prism 8.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, EUA). Os dados que passaram pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi analisado por análise de variância (ANOVA), foi considerado nível de significância de 5%.

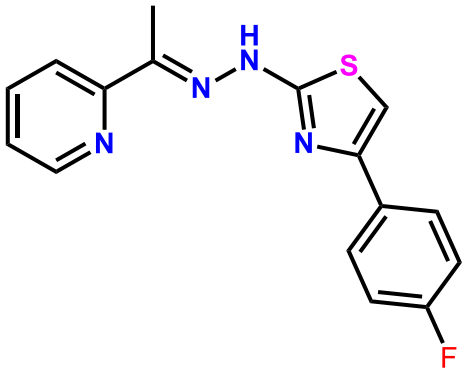
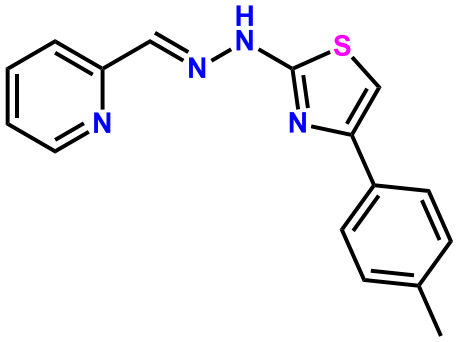
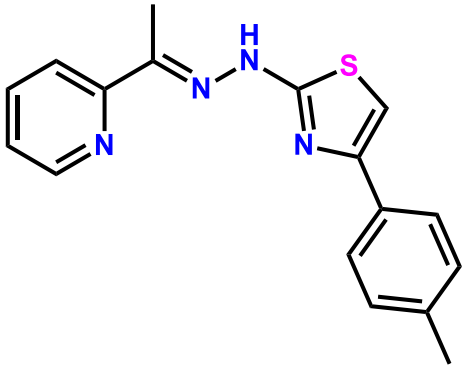
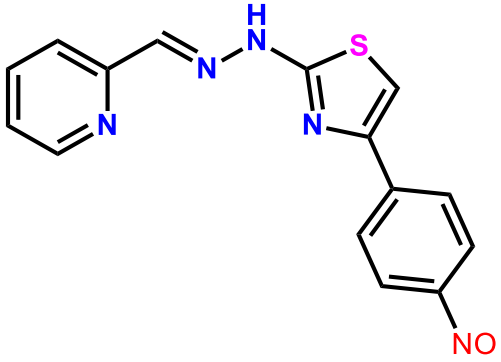
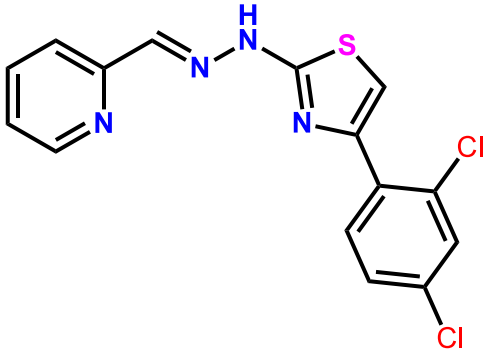
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

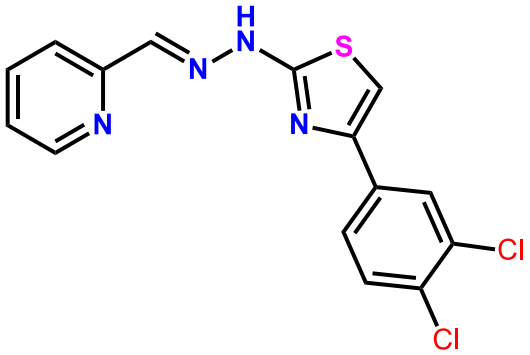
A série de compostos apresentada neste estudo foi sugerida por Cardoso e colaboradores (2014). Na Tabela 2 estão listadas as principais propriedades dos compostos sintetizados, bem como o ponto de fusão (PF) e o fator de retenção (RF) de cada um dos produtos. Os resultados obtidos e apresentados na tabela 2 indicam semelhança entre aqueles encontrados por Cardoso et al., 2014.

Tabela 2 – Características gerais dos compostos

Estrutura da molécula	Composto	PF (ºC)	RF
	TAP-11	208-210	0,64
	TAP-07	202-204	0,54
	TP-10	214-216	0,66
	TP-07	210-212	0,56

	TP-06	215-217	0,66
	TP-04	202-204	0,66
	TAP-04	205-207	0,58
	TAP-06	206-208	0,44
	TP-05	210-211	0,78

	TAP-05	208-210	0,58
	TP-02	206-208	0,56
	TAP-02	151-153	0,64
	TP-11	200-202	0,70
	TP-08	209-211	0,66



TP-09	227-229	0,72

Fonte: O Autor (2022).

5.1 ATIVIDADE ANTICANCER *IN VITRO*

A Tabela 3 apresenta os resultados de citotoxicidade na dose de 50 μM para cada composto testado.

Tabela 3 – Porcentagem de inibição do crescimento celular (CI%) dos compostos em quatro linhagens de células tumorais testadas na concentração de 50 μM pelo método MTT após 72 horas de incubação

	Linhagens celular					
Compostos - COD	**Vero**	**HT-29**	**HeLa**	**MCF-27**	**PC-3**	**HCT-116**
TAP-11	70,83 ±2,04	83,61 ±1,24	71,37 ±2,43	67,76 ±3,79	42,34 ±0,52	68,22 ±1,55
TAP-07	54,57 ±10,10	83,28 ±2,38	63,63 ±4,32	49,30 ±3,63	51,46 ±4,17	64,11 ±0,86
TP-10	73,36 ±3,74	90,03 ±0,51	21,50 ±6,11	58,41 ±2,51	38,16 ±1,77	SA
TP-07	52,71 ±7,58	91,98 ±1,38	38,77 ±4,72	56,15 ±5,51	46,63 ±4,90	66,03 ±1,01
TP-06	39,86 ±8,84	57,64 ±4,64	59,13 ±2,19	48,82 ±0,78	36,96 ±1,38	50,96 ±2,15
TP-04	56,19 ±2,98	78,18 ±1,02	63,43 ±6,42	63,11 ±4,95	42,97 ±2,21	69,78 ±1,54
TAP-04	69,93 ±6,48	**86,95 ±3,12**	**71,01 ±3,22**	62,82 ±6,14	56,78 ±1,25	**81,46 ±1,35**
TAP-06	59,31 ±4,67	89,21 ±1,32	80,58 ±2,34	45,49 ±1,33	43,52 ±2,59	47,74 ±2,27
TP-05	57,45 ±11,68	88,85 ±0,54	81,77 ±3,63	34,71 ±1,81	22,95 ±2,59	3,47 ±1,80
TAP-05	66,56 ±1,32	91,02 ±1,09	71,21 ±7,72	53,22 ±1,71	28,95 ±3,05	47,91 ±1,04
TP-02	74,02 ±4,49	91,67 ±1,04	53,15 ±3,65	62,40 ±4,83	39,20 ±0,73	69,51 ±0,88
TAP-02	44,24 ±1,86	67,62 ±1,58	SA	52,34 ±5,00	50,63 ±0,73	SA
TP-11	12,02 ±8,39	**74,97 ±0,96**	**75,88 ±2,44**	48,34 ±2,20	12,02 ±8,39	**87,67 ±1,04**
TP-08	56,30 ±1,63	79,07 ±2,68	53,35 ±0,66	16,65 ±1,07	45,49 ±1,34	SA

TP-09	45,17 ±4,25	83,25 ±5,79	83,24 ±4,58	36,88 ±2,7 7	34,71 ±1,80	SA
DOX	25,15 ±6,71	86,98 ±1,50	92,42 ±0,85	53,53 ±4,85	*	*

Fonte: O Autor (2022).

Nota: TP/TAP: Compostos testados; DOX: doxirrubicina; *.: Composto não testado (amostra insuficiente); SA: sem atividade; pouca atividade: 1 ≥ 50%; moderada atividade: 50 ≥ 70%; alta atividade: 70 ≥ 100%; ± erro padrão da média.

Na tabela 3 podem-se observar os resultados, em percentuais da inibição do crescimento celular (CI%), da triagem inicial da citotoxicidade dos compostos testados. A linhagem celular mais sensível foi a HT-29 (Adenocarcinoma de cólon humano) e a linhagem celular mais resistente foi a Vero (Rim do macaco verde africano), o que demonstra seletividade dos compostos, uma vez que esta linhagem é composta por células normais, o que a coloca na posição de controle negativo deste estudo.

O composto TP-11 apresentou de moderada a alta atividade inibitória em pelo menos duas linhagens testadas com valores variando entre 74,97% e 75,88% para HT-29 e HeLa respectivamente. Por outro lado, a doxorrubicina (controle positivo) apresentou um perfil mais potente que o TP-11 para todas as linhagens testadas. Em contrapartida, o TP-11 se mostrou menos tóxico (12,02%) para a linhagem Vero, quando comparado com a doxorrubicina (25,15%). Esse resultado revela que existe índice de seletividade do composto TP-11, o que pode estar relacionado com um anel com NO na posição 4 ligado ao anel do tiazol, assim como observado no trabalho de Santos e colaboradores (2017).

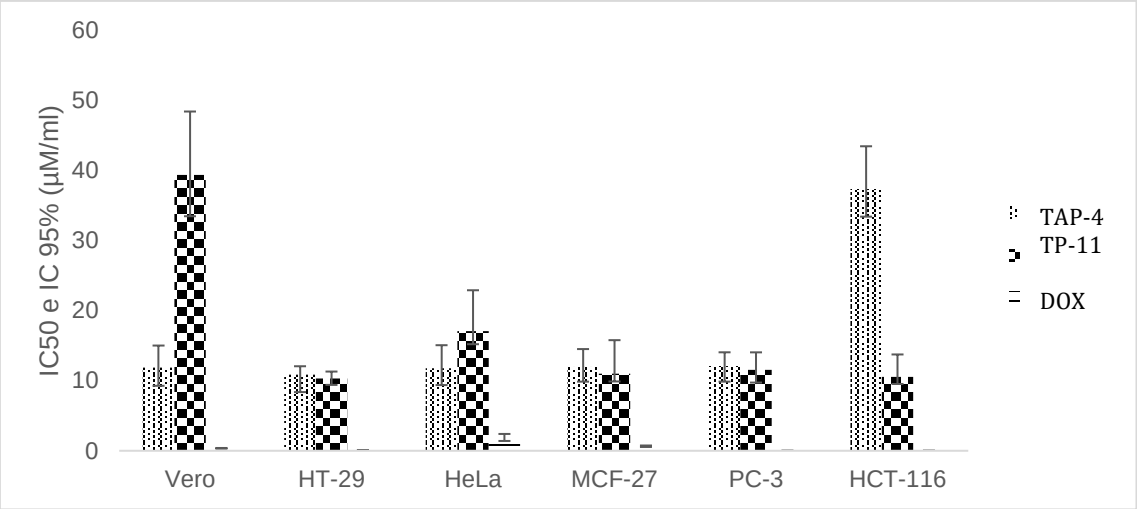
Os compostos TAP-11, TAP-07 e TP-10 apresentaram uma potente atividade para a linhagem HT-29 (Adenocarcinoma de cólon humano), com valores de 83,61%, 83,28 e 90,03% respectivamente; por outro lado, as três apresentaram um perfil tóxico considerado potente para a linhagem Vero, com valores de 70,83%, 54,57% e 73,36% respectivamente. O composto TP-10 possui em sua estrutura um anel com NO na posição 4 ligado ao anel do tiazol, se assemelhando com o composto TP-11 tanto na estrutura quanto na atividade citotóxica para linhagens de células cancerígenas.

Os compostos (TP-07; TAP- 07; TP-04; TAP-04; TAP-06; TP-05; TAP-05; TP-02; TP-08 e TP-09) apresentaram alta citotoxicidade para a linhagem HT-29, com resultados que variam entre 74,97% e 91,98%. Para Santos e colaboradores (2017) todos os compostos híbridos de piridina com o anel tiazolínico apresentaram morte

celular por apoptose em cultura após 72h de tratamento, entretanto os compostos que apresentaram o Cl na posição C4 do anel de tiazol e com variação apenas do grupamento metila na posição C6 do anel de piridina apresentaram um perfil mais tóxico quando comparada as outras linhagens, esses resultados se assemelham aos encontrados nesse estudo, onde o composto TP-07 com o Cl na posição C4 e com a ausência da metila na posição C6 do anel piridínico apresentou um resultado de 91,98% de atividade citotóxica contra a linhagem HT-29, a TAP-07 se difere da TP-07 apenas pela presença do grupo metila na posição C6 do anel piridínico trazendo uma diminuição da citotoxicidade frente a linhagem HT-29 (83,28%). Cardoso e colaboradores em 2014 também realizaram testes com compostos piridiltiazolínicos, porém para atividade antiparasitária, entretanto os compostos usados por ele com a presença do cloro na posição C4 do anel de tiazol trouxeram resultados promissores para seu estudo.

Após o ensaio de inibição, foram selecionados os compostos TP-11 e TAP-04 que apresentaram atividade moderada (> 70% de inibição) em no mínimo três linhagens de células tumorais e em seguida foram submetidos a determinação da concentração que inibe 50% do crescimento celular (CI_{50}). Todos os extratos brutos apresentaram CI_{50} < 40 µM/ml frente às linhagens testadas (Figura 9) revelando que esses compostos se mostram promissores, quando feito a comparação concentração/atividade.

Figura 9 – Valores da concentração que inibe 50% do crescimento celular (CI_{50}) e o intervalo de confiança (CI 95%) dos compostos em seis linhagens tumorais testadas pelo método do MTT após 72h de incubação



Fonte: O Autor (2022)

Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Santos et al., (2016), onde mostraram que compostos derivados de 1,3-tiazóis exibiram toxicidade em células neoplásicas da linhagem HT-29 e Jukart como também foram capazes de promover danos irreversíveis a essas células, induzindo necrose e apoptose, destacando compostos tiazolínicos, apresentando IC_{50} de 57,83 µM contra a cepa HT-29 na concentração de 4,68 µM.

Silva e colaboradores (2017) testaram compostos piridil-tiazolínicos em linhagens de tumores sólidos, assim como as linhagens apresentadas neste estudo. Seus resultados demonstraram que a linhagem HepG2 (CA-hepático) apresentou perfil sensível, frente aos compostos piridil-tiazolínicos testados TP-07 e TAP-07. Foi observado uma inibição expressiva no crescimento celular das células HepG2, ($p<0,05$) a 8µM (85%) e 16µM (93%), respectivamente, após 48h de exposição, apresentando uma inibição de 68% para o composto TAP-07, e 80% para o composto TP-07.

Ivasechko e colaboradores em 2022, testaram novos composto derivados da pidridina-tiazol com potenciais atividades antitumoral frente a linhagens humanas de carcinoma de cólon (HCT-116), mama (MCF-7), pulmão (A549), ovário (SK-OV-3), colo do útero (KB3-1). Foi constatado em seus ensaios alta atividade antiproliferativa da 3-(2-fluorofenil) -1-[4-metil-2-(piridin-2-ilamino) -tiazol-5-il] -propenona e 4-(2- {1-(2 -fluorofenil) -3-[4-metil-2-(piridin-2-ilamino) -tiazol-5-il] -3-oxopropilsulfanil} -acetilamino) -benzoico na concentração de 10 µM, onde foi possível observar uma

redução de 36% de proliferação celular da linhagem de câncer de mama MCF-7 para o composto 4.

Com base no estudo é possível observar que os compostos 3 e 4 apresentaram atividade citotóxica forte e semelhante. Deve-se notar que esses compostos agiram muito mais especificamente contra as linhagens de células tumorais onde a IC_{50} variou de 0,57 µM a 7,8 µM, dependendo da linhagem celular do tumor, quando comparado com as linhagens celulares normais usadas como controle (células renais HEK293) e (queratinócitos epidérmicos humanos HaCaT) com IC_{50} > 50 µM para ambas. Esses resultados se assemelham com os encontrados nesse estudo onde o composto TP-11 apresentou um índice de seletividade interessante de apenas 12,02% para a linhagem vero (células normais) e de 48,34% para linhagem MCF-7.

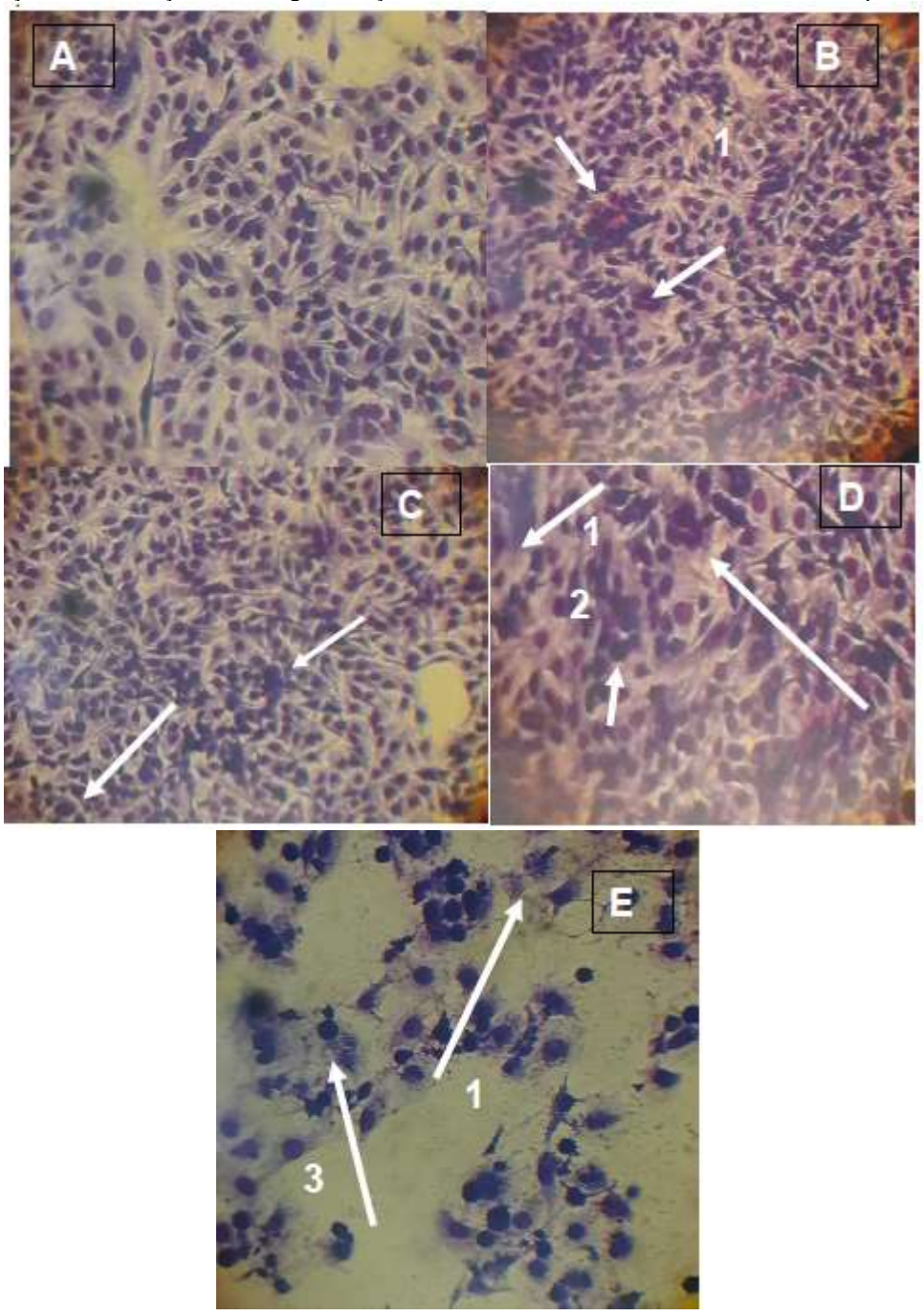
Romagnoli e seus colaboradores em 2012 também planejaram e sintetizaram novos compostos contendo 2-substituído-4-(3',4',5'-trimetoxifenil) -5-ariltiazol para rastrear sua atividade anticancerígena *in vitro* contra as linhagens celulares, como HeLa, MCF-7 e HT-29. Os resultados obtidos sugerem que a atividade antiproliferativa é devido à posição C-2 do anel tiazol apresentando atividade de (IC_{50}; 0,89 µM) para células HT-29. Estruturalmente pode-se comparar o composto citado acima com o composto TP-11 apresentado neste estudo que também possui um anel de tiazol com um C na posição 2 apresentando uma inibição celular de 83,61% para a linhagem HT-29.

5.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA: COLORAÇÃO POR PANÓTICO RÁPIDO

As células do grupo controle negativo apresentaram características típicas de células não aderidas, como membranas plasmáticas bem delimitadas e definidas, bem como núcleos bem preservados (Figura 10 A), além disso, foram observadas numerosas figuras mitóticas. Nas células tratadas com doxorrubicina foram observadas alterações como resto celular e fragmentação nuclear (Figura 10 B). Nos grupos tratados com TP-11 nas concentrações de 0,5; 7,5 e 10 µM/mL (Figuras 10 C, D e E, respectivamente) foram observadas alterações condizentes com processo de apoptose, incluindo, condensação da cromatina, formação de núcleos picnóticos e fragmentação nuclear. Entretanto, também foram verificados restos celulares que são indicativos de necrose celular. Ainda, foi observada diminuição de figuras mitóticas já

na menor concentração testada. Também é interessante ressaltar que na concentração de 10 µM/mL poucas eram as células de aspectos normais.

Figura 10 – Análise morfológica de Hela após 48h de incubação com TP-11, coradas por panótico rápido. Aumento de 100X. A: Células de controle negativo tratadas com DMSO 1%; B: Células de controle positivo tratadas com Doxorrubicina 0,3 µg/mL; C; D e E: Células tratadas com TP-11 0,5, 7,5 e 10 µM /mL, respectivamente. Os números indicam as alterações/observações: 1: fragmentação nuclear; 2: restos celulares e 3: núcleo picnótico



Fonte: O Autor (2022)

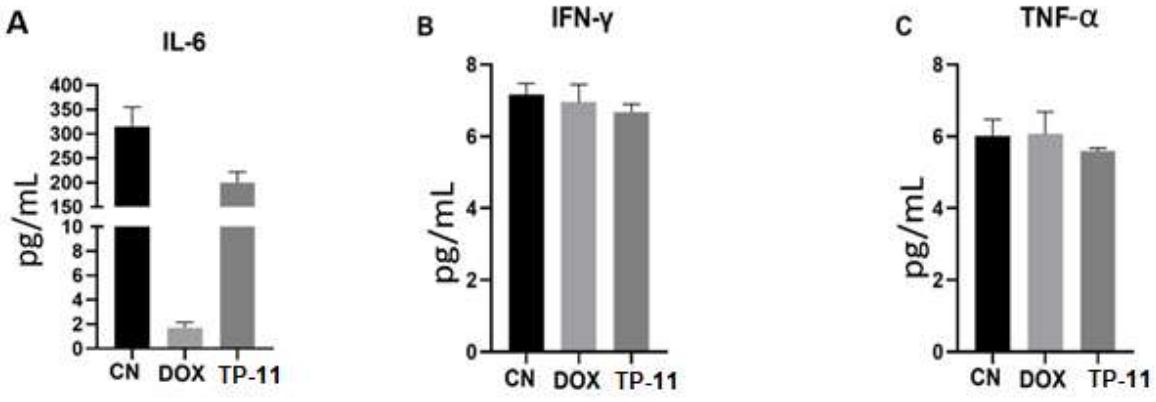
Alterações morfológicas, tais como a condensação da cromatina, rompimento de membrana e corpos apoptóticos, são amplamente apontados como indicativos de células apoptóticas (HUSAIM et al., 2015). Outras alterações, como retração celular, núcleo picnótico e cariorrex, já foram descritas para indução farmacológica de apoptose em Hela.

Os resultados obtidos no ensaio da morfologia de Hela revelaram que a substância TP-11 induziu morte por apoptose, baseando-se na presença células com núcleos picnóticos ou fragmentados, entretanto, necrose celular também foi induzida, pois restos celulares foram encontrados nas amostras tratadas com TP-11. Desta forma fica evidente a ação do composto TP-11 frente a células cancerígenas da linhagem Hela.

5.3 CITOMETRIC BEAD ARRAY (CBA)

Com a intenção de compreender de forma mais profunda os mecanismos operados pela interação do composto sintético TP-11 com as células cancerígenas da linhagem HeLa, realizou-se a quantificação dos perfis de citocinas pró-inflamatórias Th1 - IL-6, IFN-γ e TNF-α (Figura 11) e Th17 - IL-17 (Figura 12), assim como do perfil de modulação antagônico Th2 - IL-2, IL-4 e IL-10 (Figura 13).

Figura 11 – Perfil de distribuição das citocinas A) IL-6, B) IFN-γ e C) TNF-α para a linhagem Hela de câncer humano



Fonte: O Autor (2022)

Nota: N- Controle Negativo; DOX- Doxirrubicina; TP-11- Composto teste

Observou-se a ocorrência de menores concentrações da IL-6 no sobrenadante da cultura tratada com o composto TP-11 na concentração de 10 µM quando comparado com o controle negativo apresentando um valor de ($p > 0.05$).Também foi possível comparar o composto TP-11 com o controle positivo (DOX), os resultados mostram que a DOX de fato foi capaz de inibir uma maior liberação da citocina pró-inflamatória IL-6 quando comparado a TP-11, desta forma o composto TP-11 não apresentou redução significativa ($p > 0.05$) quando comparado com o controle positivo. Esses resultados corroboram com os encontrados por Bahrate e colaboradores (2008), que utilizaram compostos derivados da piridina na mesma concentração (10 µM) e os compostos analisados apresentaram atividade anti-inflamatória contra células cancerígenas e foi observado que TNF-α e IL-6 tiveram inibição de liberação em até 65%.

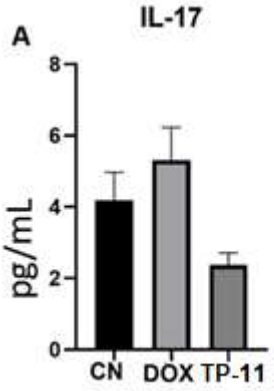
Silva e colaboradores (2017), também realizaram testes com produtos sintéticos contendo o anel de tiazol, uma das bases estruturais do composto TP-11. Os compostos tiazolínicos responsáveis pela melhor atuação em inibir as citocinas IL-6, IFN-γ e IL-10 em cultura de células Pht1 foram o LPSF/ZKD2 a 50 µM e o LPSF/ZKD4 a 100 µM com valores de 94%, 62%, 88% e 96%, 77%, 85%, respectivamente por citocina e composto. Esses resultados se assemelham aos observados nesse estudo onde a melhor atividade dos compostos piridiltiazolínicos testados foi referente a inibição da secreção de IL-6 quando comparada com as IFN-γ e IL-10, podendo ser observado nas Figuras 11 e 13. Não foi encontrada relevância significativa para os perfis de IFN-γ e TNF-α ($p<0,05$).

Os resultados da dosagem da IL-17 no sobrenadante da cultura de células Hela são apresentados na Figura 12, evidenciando uma diminuição da concentração quando a célula é tratada com o composto TP-11 ($p<0,05$). Entretanto, o mesmo composto quando comparando sua ação frente às citocinas IL-2, IL-4 e IL-10 não mostrou nenhuma ação moduladora significante ($p<0,05$), como pode ser observado na Figura 13.

Esses resultados se assemelham com os encontrados por Martin-Orozco e Dong (2009), que usaram compostos sintéticos da classe dos tiazois e embora seus estudos tenham sido realizados em um modelo *in vivo* os resultados apresentados mostraram um papel ativo da IL-17 na imunovigilância tumoral, a diminuição da

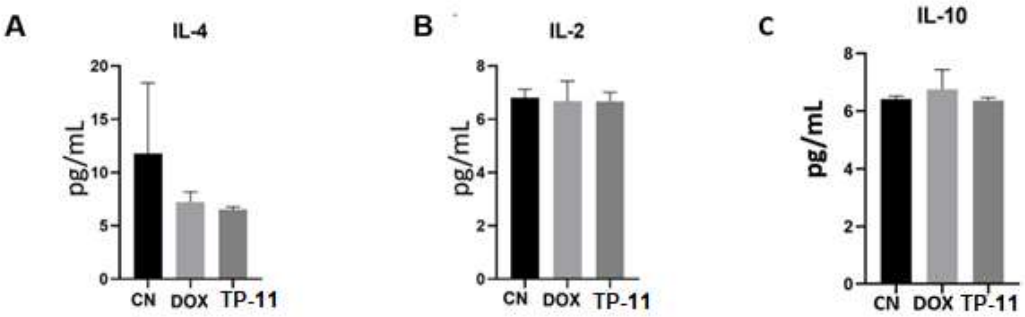
mesma resultou na redução da infiltração de leucócitos, o que mostra uma diminuição no perfil inflamatório do tumor.

Figura 12 – Perfil de distribuição das citocinas IL-17
para a linhagem Hela de câncer humano



Fonte: O Autor (2022)
Nota: CN- Controle Negativo; DOX- Doxirrubicina; TP-11- Composto teste

Figura 13 – Perfil de distribuição das citocinas IL-2, IL-4 e IL-10
para a linhagem Hela de câncer humano



Fonte: O Autor (2022)
Nota: CN- Controle Negativo; DOX- Doxirrubicina; TP-11- Composto teste

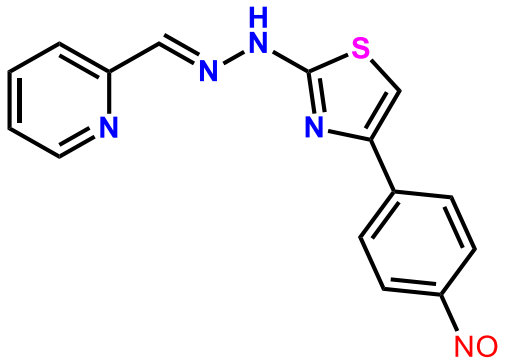
5.4 ESTUDOS *IN SILICO* (DOCKING MOLECULAR)

Compreender os princípios pelos quais os ligantes de pequenas moléculas reconhecem e interagem com macromoléculas é de grande importância na pesquisa e desenvolvimento farmacêutico (P&D) (Blandey, 2012). O design racional de medicamentos refere-se ao uso sistemático de dados estruturais (por exemplo, alvos

macromoleculares, também chamados de receptores), que geralmente são obtidos experimentalmente ou por meio de modelagem computacional (Mandal, 2009).

O docking molecular torna possível a observação das prováveis ligações e interações entre a molécula estudada com o sítio ativo da proteína 1QGK (Importina alfa-2), pertencente à classe das integrinas, bem como a melhor conformação assumida pelas moléculas para interagir com a proteína. A molécula eleita para esta etapa do estudo foi a TP-11 (Figura 14), devido aos resultados em ensaios descritos anteriormente. A interação do composto TP-11 acontece de forma externa com as células da linhagem hela, especificamente com os aminoácidos LYS548, LYS579 e CYS539, esses aminoácidos integram proteínas da classe das integrinas, presentes em todas as linhagens de células tumorais testadas neste trabalho.

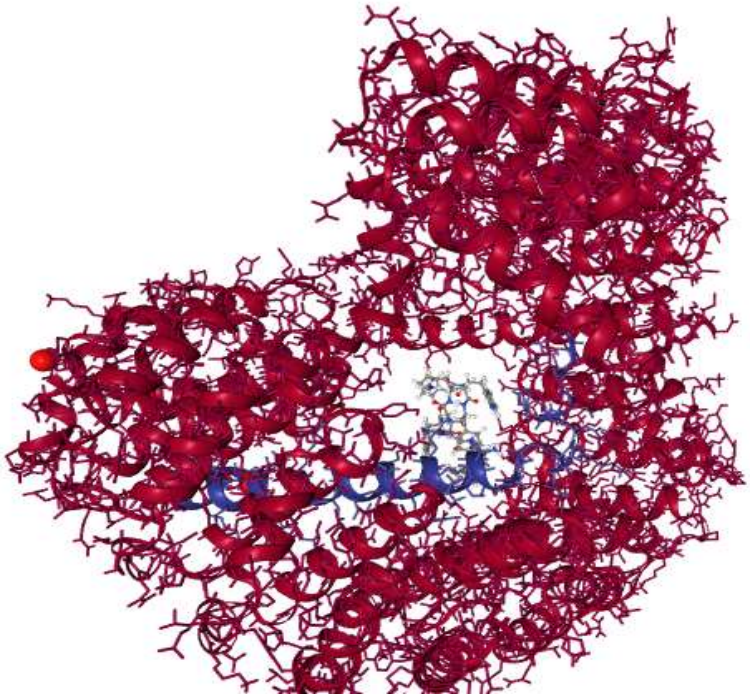
Figura 14 – Estrutura química do composto TP-11



Fonte: O Autor (2022)

As proteínas da classe das integrinas são compostos comuns como constituintes de membrana para todas as linhagens testadas neste estudo. Foram realizadas diversas análises computacionais entre o ligante (TP-11) e a proteína eleita (Figura 15).

Figura 15 – Composto TP-11 se ligando ao sítio de ligação da proteína



Fonte: O Autor (2022)

Para o processo de ligação foi observado que existe uma alta quantidade de energia gasta, o que demonstra que existe certa dificuldade de ligação, porém quando a ligação é efetivada o composto permanece ligado, demonstrando assim uma alta estabilidade.

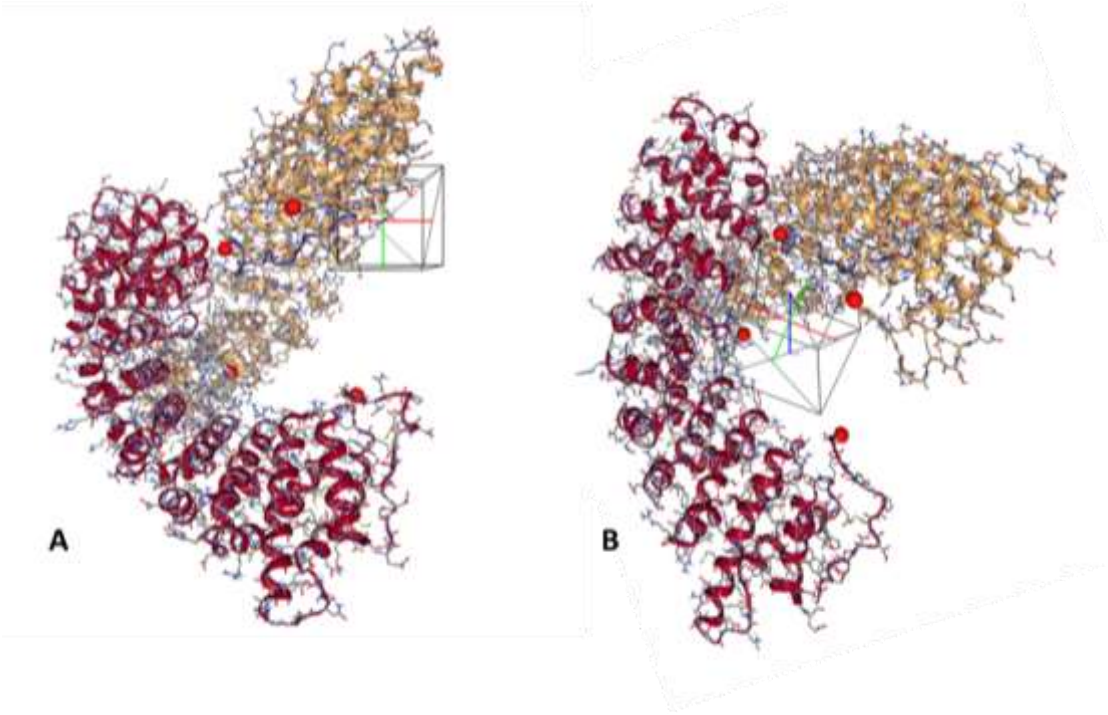
Após o evento de dockagem foi possível realizar 274 simulações computacionais, dentre as conformações moleculares analisadas foi possível observar o modo de ligação conforme apresentado na Figura 15, essa ligação representou uma média do $\otimes G_{ligação}$ calculada em -1264,47 kcal/mol, o que demonstra que o processo de ligação pode ocorrer como um processo espontâneo, assim como quando analisamos a condição de temporalidade pode-se perceber uma estabilidade. Este dado sustenta a hipótese de que a natureza da cadeia lateral e o tamanho do sítio de ligação desempenham um fator importante no reconhecimento molecular, uma vez que ambos são parâmetros importantes que auxiliam no reconhecimento do alvo pelo composto (CORBEIL, 2012; HUBBARD, 2006).

Como dito anteriormente, quanto menor a energia de ligação necessária para que uma molécula se ligue a um determinado alvo biológico, mais fácil ocorrerá seu encaixe e assim, teoricamente, melhor será a atividade biológica desse composto. A figura 15 mostra a ligação entre o composto TP-11 e o sítio de ligação da molécula

alvo, que é uma proteína da classe das integrinas, de acordo as análises realizadas a quantidade de energia gasta foi relativamente alta como observado no quadro 1, entretanto a ligação se mostrou estável, essa estabilidade possivelmente está relacionada a posição da cadeia lateral e do tamanho do seu sítio de ligação.

Dentre a caracterização das possibilidades as formas geométricas empregadas mais frequentemente em simulações por docking estão relacionadas a uma estratégia denominada condições periódicas de contorno apresentada na Figura 16. Estas formas permitem que uma caixa de simulação seja replicada em todas as suas dimensões, de forma periódica. Estas réplicas são idênticas à caixa construída, de forma que um movimento molecular em uma será idêntico ao movimento da mesma molécula na outra.

Figura 16 – Possíveis sítios de ligação para o composto TP-11 em proteína integrina.



Fonte: O Autor (2022)

Neste momento da simulação a caixa está em contato com o solvente, isso faz com o que haja uma constância no número de moléculas representando assim uma continuidade do processo de simulação e nos aproximando de condições experimentais.

A quantidade de energia necessária para que uma molécula se ligue a um determinado alvo molecular reflete na atividade biológica desta molécula, pois quanto

mais fácil for a interação entre o composto e o alvo, ou seja, quanto mais estável for o complexo formado, menor será a energia necessária para que esta interação ocorra.

Os melhores resultados obtidos para as conformações virtuais testadas para as energias de ligação entre a TP-11 e a proteína integrina, estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1 – Valores de energias de ligação obtidos para a TP-11

Simulações	**Score**	**T. Energia**	**I.Energia**	**vdW Energia**	**Energia Eletrostática**
ligand_bc1589	-8,428	25,823	-61,012	-19,388	-41,624
ligand_74433f3219	-8,384	102,679	-44,725	-17,962	-26,763
ligand_35499320ed	-8,293	105,654	-42,859	-18,973	-23,886
ligand_e2a4ca59c8	-8,284	15,344	-77,225	-13,902	-63,323
ligand_5288dee10c	-8,264	106,177	-42,287	-18,621	-23,666
ligand_b5720637b9	-8,256	54,648	-14,262	-17,712	3,450
ligand_15747a507e	-8,180	20,331	-72,549	-9,698	-62,851
ligand_82f2a9577a	-8,171	28,297	-65,057	-18,399	-46,658
ligand_9e1585be96	-8,164	72,161	-51,987	-15,243	-36,744
ligand_4dfbc83a9d	-8,160	53,063	-15,630	-20,912	5,282
ligand_7b06862027	-8,157	52,019	-15,731	-18,454	2,723
ligand_94033f4839	-8,109	129,938	-28,152	-14,621	-13,531
ligand_b3eda71	-8,067	102,087	-43,418	-16,955	-26,463
ligand_0ff880a855	-8,048	102,869	-42,688	-16,842	-25,846
ligand_2caac52491	-8,021	76,493	-27,192	-20,998	-6,194

Fonte: O Autor (2022)

Foram realizados ensaios em três "modelos" de algoritmos diferentes para testar a possibilidade do quanto o composto é solúvel em água, e computacionalmente foi considerado solúvel, esses valores refletem isso 7.08 e -02 mg/Ml; 2.64 e -04 mol/L, pois são considerados de moderado a alta para este parâmetro. A solubilidade aquosa de um composto afeta significativamente suas características de absorção e distribuição. Normalmente, uma baixa solubilidade acompanha uma má absorção e, portanto, o objetivo geral é evitar compostos pouco solúveis (LIPINSKI, 2014). Tal valor pode sofrer variações a depender dos parâmetros e do algoritmo utilizado para

a análise, em nosso estudo utilizamos 3 bases distintas; ESOL, Ali, e SILICOS-IT onde nosso composto foi considerado solúvel em todos.

Diante dos indícios apresentados do composto TP-11 e da possibilidade de obtenção de novos análogos estruturais, empregando-se como estratégia a utilização de 2-piridil- 1,3-tiazol optou-se por desenvolver estudos para a síntese e posterior avaliação das possíveis atividades biológicas de tais análogos.

Os resultados deste trabalho destacam as estratégias de docking e design racional de fármacos como uma ferramenta de entendimento sobre as características de ligação entre o composto e o alvo molecular. Essas ferramentas têm sido aplicadas na compreensão da ação de novos compostos bioativos.

Desta forma, no panorama atual da descoberta de medicamentos. As estratégias *in silico* são alternativas que economizam tempo e dinheiro, o docking molecular tem sido capaz de trazer uma maior e melhor compreensão em relação a ação de compostos que podem representar soluções futuras em áreas críticas da saúde humana.

6 CONCLUSÃO

Dentre todos os compostos testados neste estudo pode-se evidenciar que as moléculas TAP-04 e TP-11 foram as que apresentaram melhor atividade anticâncer em ao menos três linhagens de células testadas. Porém, devido a baixa toxicidade às células da linhagem Vero, a TP-11 se mostra como uma melhor candidata, indicando segurança nas concentrações testadas. No ensaio de morfologia por meio de panótico rápido, a TP-11 causou morte por apoptose em células da linhagem HeLa. De acordo com os achados em lâmina foi possível observar a degradação da membrana plasmática dessas células sugerindo assim interação direta entre o composto com as proteínas de membrana.

Na imunomodulação foi possível observar uma diminuição nos perfis de expressão das IL-6 e IL-17, apresentando assim uma redução do processo inflamatório das células tumorais, sugerindo um perfil anti-inflamatório para TP-11. No ensaio de dockagem molecular foi observado por meio das 274 simulações computacionais, que o composto TP-11 apresenta estabilidade no processo de ligação entre o ligante e a proteína de membrana. Além disso, foi possível observar que a TP-11 é lipossolúvel em água, que é um parâmetro importante para biodistribuição de compostos, evidenciando que eles podem ser considerados como protótipos para o desenvolvimento de novos agentes anticâncer.

REFERÊNCIAS

ALLEY, M. C. et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Research**, v. 48, p. 589- 601, 1988.

AL-OMARY, F. A. M. *et al*. Substituted thiazoles V. Synthesis and antitumor activity of novel thiazolo[2,3- b]quinazoline and pyrido[4,3-d]thiazolo[3,2-a]pyrimidine analogues. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 65-72, 2012.

BARBOSA, R. F. M. *et al*. Incidência de neutropenia induzida por quimioterapia no tratamento do câncer colorretal. **Rev Rene (Online)**, v. 20, n. 1, p. e33884-e33884, 2019.

BHATIA, M. S. Synthesis and QSAR analysis of 5-substituted (arylmethylene)pyridin2-amine derivatives as potential antibacterials‖, **International Journal of Drug Discovery**, ISSN: 0975–4423, Volume 1, N. 1, pp-1-9, 2009.

BLANEY, J. A very short history of structure-based design: How did we get here and where do we need to go? J. **Comput. Aided Mol. Des**. 2012, 26, 13–14.

CANDIDO, Eduardo Batista. Avaliação do perfil da resposta imune Th1, TH2 e Th17 em mulheres com cancer epitelial dos ovários. **Eur. J. Med.** 2011.

CARDOSO, M. V. O. *et al*. 2-Pyridyl thiazoles as novel anti- Trypanosoma cruzi agents: structural design, synthesis and pharmacological evaluation. **Eur. J. Med. Chem**., v. 86, p.48–59, 2014.

Chang SH, Dong C. Uma nova citocina heterodimérica que consiste em IL-17 e IL-17F regula as respostas inflamatórias. **Res da Célula** (2007)17(5):435–40.

CHAO, J. *et al*. A phase I and pharmacokinetic study oral 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP, NSC #663249) in the treatment of advanced-stage solid cancers: A California Cancer Consortium Study. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, 69(3), 835–843, 2012.

CHAUBEY, A. *et al*. Pyridine a versatile nucleuse in pharmaceutical field. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**. Vol. 04, N. 04, 2011.

CORBEIL, C.R.; WILLIAMS, C.I.; LABUTE, P. Variability in docking success rates due to dataset preparation. J. Comput. Aided Mol. Des. 2012, 26, 775–786. 54. Foloppe, N.;

COSTA, P. M. *et al*. Improvement of in vivo anticancer and antiangiogenic potential of thalidomide derivatives, **Chem. Biol. Interact**. 239. p. 174– 183, 2015.

COSTA-LOTUFO, L. V. *et al*. Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**. v. 2(1), p. 47-58, 2010.

COUTINHO, N. H. M. K. Métodos de Química Teórica E Modelagem Molecular. 1. ed. São Paulo: **Livraria da Física**, 2007.

DA SILVA FIGUEREDO, et al. Expressão de citocinas relacionadas à resposta th17 nos tecidos gengival e intestinal de pacientes com periodontite e doença inflamatória intestinal. **Braz J Periodontol-March**, v. 27, n. 01, 2017.

DE SANTANA, Temistocles Italo et al. Synthesis, anticancer activity and mechanism of action of new thiazole derivatives. **European journal of medicinal chemistry**, v. 144, p. 874-886, 2018.

DOS SANTOS, Thiago André R. et al. Antitumor and immunomodulatory activities of thiosemicarbazones and 1, 3-Thiazoles in Jurkat and HT-29 cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 82, p. 555-560, 2016.

GOMES et al. Ácido Valerênico e seu potencial ansiolítico por meio da interação com receptores do tipo GABAA: um estudo in silico. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 13, p. e07101320677-e07101320677, 2021.

GENG, Ying et al. Four new CuI/AgI-based coordination compounds containing 2-mercapto-5-methyl-1, 3, 4-thiadiazole: Synthesis, crystal structures and fluorescence properties. **Inorganica Chimica Acta**, v. 528, p. 120596, 2021.

GLOBOCAN 2018. Disponível em <globocan.iarc.fr/>. Acesso em: 01 mar. 2019.
GOHLKE, H.; KLEBE, G. Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors. **Angewandte Chemie International Edition**, [s.l.],v. 41, p. 2644–2676, 2002.

HASSAN, A. A. *et al*. A convenient and efficient synthesis of thiazolidin-4-ones via cyclization of substituted hydrazinecarbothioamides. **Arabian Journal of Chemistry**, p. 0–5, 2013

HUBBARD, R. Towards predictive ligand design with free-energy based computational methods? **Curr. Med. Chem**. 2006, 13, 3583–3608.

International Agency for Research on Cancer (IARC); 2020.Available from: https://www.iarc.who.int/faq/latest-global-cancer-data-2020.

Instituto Nacional de Câncer (INCA). **Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2018.

Instituto Nacional de Câncer (INCA). **Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2019.

Instituto Nacional de Câncer (INCA). **Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2020.

IVASECHKO I, *Et al*., Development of Novel Pyridine-Thiazole Hybrid Molecules as Potential Anticancer Agents. **Molecules**. 2022 Sep 21;27(19):6219. doi: 10.3390/molecules27196219. PMID: 36234755; PMCID: PMC9570594.

KARIM, N. et al. Molecular docking and antiamnesic effects of nepitrin isolated from Rosmarinus officinalis on scopolamine-induced memory impairment in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, n. June, p. 700–709, 2017.

KASHYAP, S. J. *et al*. Thiazoles: having diverse biological activities. **Medicinal Chemistry Research**. v. 21, n. 8, p. 2123-2132, 2012.

KLATT, E. C. **The Internet Pathology Laboratory for Medical Education**. 2017. Disponível em < http://library.med.utah.edu/WebPath/NEOHTML/NEOPL101.html>.

KORN T, BETTELLI E, OUKKA M, KUCHROO VK. Células IL-17 e Th17.Annu **Rev Immunol**(2009)27:485–517. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132710

KNAPP, B; FRANTAL, S; CIBENA, M; SCHREINER, W; BAUER, P. Is an Intuitive Convergence Definition of Molecular Dynamics Simulations Solely Based on the Root Mean Square Deviation Possible? **Journal of Computational Biology**, v. 18, n. 8, p. 997-1005, 2011.

LAGORCE, D; SPERANDIO, O; BAELL, J. B; MITEVA, M. A; VILLOUTREIX, B. O. FAF-Drugs3: a web server for compound property calculation and chemical library design. **Nucleic Acids Research**, v. 43, p. W200-W207, 2015.

LEFRANC, F. *et al*. 4-Bromo-2-(piperidin-1-yl)thiazol-5-yl-phenyl methanone (12b) inhibits Naþ/KþATPase and Ras oncogene activity in cancer cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 63, p. 213-223, 2013.

LIANG SC, *Et al*. A interleucina (IL)-22 e IL-17 são coexpressas por células Th17 e aumentam cooperativamente a expressão de peptídeos antimicrobianos.J **Exp Med**(2006) 203(10):2271-9. doi:10.1084/jem.20061308.

LIPINSKI, C.A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv. Drug Deliv. Rev**. 2012, 64, 4–17.

MASUYA et al. Discovery of novel oestrogen receptor α agonists and antagonists by screening a revisited privileged structure moiety for nuclear receptors. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.

MANDAL, S.; MOUDGIL, M.N.; MANDAL, S.K. RATIONAL DRUG DESIGN. **Eur. J. Pharmacol**. 2009, 625, 90–100.

MESHRAM, H. M. *et al*. Convenient and simple synthesis of 2-aminothiazoles by the reaction of α-halo ketone carbonyls with ammonium thiocyanate in the present of N-methylimidazole. **Tetrahedron Letters**, v. 53, p. 5265-5269, 2012.

MILLER, K. D. *et al*. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. CA: **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 66, n. 4, p. 271–289, jul. 2016.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA). **Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2020.

MITELMAN, Adriana K. et al. Quantificação das citocinas séricas Th1/Th2 por citometria de fluxo no linfoma de Hodgkin clássico. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, p. 260-266, 2009.

MORIGI, R. *et al*. Recent patents on Thiazole derivatives endowed antitumor activity. **Recent Pat. Anticancer**. Drug. v. 10, p. 280–297, 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

MORVAN, Maelig G.; LANIER, Lewis L. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 1, p. 7-19, 2016.

MOREIRA, L. K., DE BRITO, A. F., FONTANA, C., DE CARVALHO, F. S., SANZ, G., VAZ, B. G., ... & COSTA, E. A. Neuropharmacological assessment in mice and molecular docking of piperazine derivative LQFM212. ***Behavioural Brain Research***, *394*, 112827, 2020.

MURUGESAN, V. *et al*. Rational design and synthesis of novel thiazolidin-4-ones as non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 22, n. 12, p. 3159–70, 2014.

OLIVEIRA, Arsênio Rodrigues et al. Synthesis, anticancer activity and mechanism of action of new phthalimido-1, 3-thiazole derivatives. **Chemico-Biological Interactions**, v. 347, p. 109597, 2021.

OMS. **Cancer [NMH fact sheet], Geneva**, 2017.

OMS. **Cancer [NMH fact sheet], Geneva**, 2020.

ONCOGUIA. **Quiomioterapia para o câncer de mama**. 22 jun 2017. Disponível em: http://www.oncoguia.org.br/conteudo/quimioterapia-para-cancer-de-mama/1405/265. Acesso em: 05 mar 2019.

OZDEMIR, A. *et al*. Synthesis and the selective antifungal activity of 5,6,7,8-tetrahydroimidazo[1,2-a]pyridine derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**. Volume 45 ,Pg. 2080-2084, 2010.

PORTELLA, et al. A novel high-content screening-based method for anti-Trypanosoma cruzi drug discovery using human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. **Stem cells international**, v. 2021, 2021.

SCHÜTZLER et al. Estudo comparativo entre os métodos de coloração panótico rápido e giemsa dentro de uma rotina laboratorial. **Revista de extensão e iniciação científica da UNISOCIESC**, v. 9, n. 2, 2022.

SANTANA DE OLIVEIRA, Mozaniel et al. Chemical composition, antimicrobial properties of siparuna guianensis essential oil and a molecular docking and dynamics molecular study of its major chemical constituent. **Molecules**, v. 25, n. 17, p. 3852, 2020.

SAMET, J. M. et al. The IARC Monographs: updated procedures for modern and transparent evidence synthesis in cancer hazard identification. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 112, n. 1, p. 30-37, 2020.

SANTANA, T. I. *et al*. Synthesis, anticancer activity and mechanism of action of new thiazole derivatives. **European journal of medicinal chemistry**, v. 144, p. 874-886, 2018.

SANTOS, A. R. T. *et al*. Antitumor and immunomodulatory activities of thiosemicarbazones and 1, 3-Thiazoles in Jurkat and HT-29 cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 82, p. 555-560, 2016.

SERS, C., K. HUSMANN, et al. The class II tumour suppressor gene H-REV107-1 is a target of interferon-regulatory factor-1 and is involved in IFNgamma-induced cell death in human ovarian carcinoma cells. **Oncogene** 21(18): 2829-39, 2002.

SILVA, S. D. T. *et al*. Anti-liver cancer activity in vitro and in vivo induced by 2-pyridyl 2, 3-thiazole derivatives. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 329, p. 212-223, 2017.

SIQUEIRA, P. R. L. *et al*. Multi-target compounds acting in cancer progression: Focus on thiosemicarbazone, thiazole and thiazolidinone analogues. **European journal of medicinal chemistry**, 2019.

TAVARES, et al. Caracterização das reações adversas a quimioterápicos em um hospital filantrópico. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 2, p. 2317-2326, 2020.

TROTT, O; OLSON, A. J. Software News and Update AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.

VASCONCELOS, et al. Study of acute oral toxicity of the thiazole derivative N-(1-methyl-2-methyl-pyridine)-N-(p-bromophenylthiazol-2-yl)-hydrazine in a Syrian hamster. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 31, n. 3, p. 197-204, 2021.

VERÇOZA, G. L. *et al*. Síntese e avaliação da atividade antimicrobiana de novas 4-tiazolidinonas obtidas a partir de formilpiridina tiossemicarbazonas. **Quim. Nova**, v. 32, n. 6, p. 1405-1410, 2009.

WHO - World Health Organization. **Cancer (Fact sheets)**. 12 set 2018. Disponível em: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en. Acesso em: 14 mai 2019.

WÜRTH, R. et al. Drug-repositioning opportunities for cancer therapy: novel molecular targets for known compounds. **Drug Discovery Today**, out. 2015.

ZARGARAN, Fatemeh Nemati et al. B cell epitopes of four fimbriae antigens of Klebsiella pneumoniae: a comprehensive in silico study for vaccine

development. **International journal of peptide research and therapeutics**, v. 27, n. 2, p. 875-886, 2021.

ZHANG et al. Screening and characterization of aldose reductase inhibitors from Traditional Chinese medicine based on ultrafiltration-liquid chromatography mass spectrometry and in silico molecular docking. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 264, p. 113282, 2021.