



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

NARA DE MELO SANTOS

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICÂNCER *IN VITRO* E PREDIÇÃO
TOXICOLÓGICA DE COMPOSTOS 2-AMINO-TIOFENOS FRENTE A CÂNCER DE
MAMA HUMANO**

**RECIFE
2024**

NARA DE MELO SANTOS

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICÂNCER *IN VITRO* E PREDIÇÃO TOXICOLÓGICA
DE COMPOSTOS 2-AMINO-TIOFENOS FRENTE A CÂNCER DE MAMA HUMANO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Bacharelado
em Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Pernambuco, como requisito
parcial para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Teresinha Gonçalves da Silva
Coorientador: Prof. Me. José Rivaldo de Lima

RECIFE
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Santos, Nara de Melo.

Investigação da atividade anticâncer in vitro e predição toxicológica de compostos 2-amino-tiofenos frente a câncer de mama humano / Nara de Melo Santos. - Recife, 2024.

61 p. : il., tab.

Orientador(a): Teresinha Gonçalves da Silva

Coorientador(a): José Rivaldo de Lima

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas - Bacharelado, 2024.

Inclui referências.

1. Antineoplásicos. 2. Química Medicinal. 3. 2-amino-tiofênico. 4. Reação de Gewald. 5. Neoplasias da mama. I. Silva, Teresinha Gonçalves da. (Orientação). II. Lima, José Rivaldo de. (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

NARA DE MELO SANTOS

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICÂNCER *IN VITRO* E PREDIÇÃO
TOXICOLÓGICA DE COMPOSTOS 2-AMINO-TIOFENOS FRENTE A CÂNCER DE
MAMA HUMANO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Bacharelado
em Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Pernambuco, como requisito
parcial para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 30/08/2024

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Teresinha Gonçalves da Silva (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Me. George Tôrres de Lima
Universidade Federal de Pernambuco

Me. Rodrigo Ribeiro Alves Caiana
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Meykson Alexandre da Silva (Suplente)
Secretaria de Educação de Riacho das Almas

Mãe, dedico este trabalho a você, que sempre me encorajou a buscar a minha melhor versão.

AGRADECIMENTOS

À frente, gostaria de agradecer em especial minha orientadora, Teresinha Gonçalves da Silva, pelo apoio contínuo ao meu Estágio e Trabalho de Conclusão de Curso, e por seu imenso conhecimento. Sua orientação me auxiliou em todo o tempo de pesquisa e redação desta monografia.

Expresso minha sincera gratidão ao meu coorientador, José Rivaldo de Lima, pelo seu incentivo, comentários perspicazes e paciência. Muito obrigada por ser um conselheiro incrível. Você constantemente me ajudou a colocar as coisas em perspectiva e a me preparar para o futuro.

Grata ao Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Júnior por ter cedido os derivados 2-amino-tiofênicos, fundamentais para o desenvolvimento deste Trabalho de Conclusão de Curso.

Obrigada aos meus colegas do Laboratório de Prospecção Farmacotóxica de Produtos Bioativos (BIOFARMATOX), pelas discussões estimulantes e por toda a diversão que tivemos. Em particular, gratidão a George Tôres de Lima, por me esclarecer o primeiro olhar da pesquisa, sendo um grande mentor. Outro membro que foi imprescindível para a realização deste trabalho acadêmico foi Rodrigo Ribeiro Alves Caiana, por me introduzir aos estudos *in silico* e sempre ser solícito às minhas dúvidas.

Meus amigos e familiares merecem enorme reconhecimento por seu amor e apoio inabalável durante todo esse processo. A presença deles tornou essa jornada não apenas possível, mas significativa:

À minha família: aos meus pais Nadna Melo e Nelson Santos, e à minha irmã mais velha, Natália Melo, por me apoiarem espiritualmente ao longo da minha vida. Agradeço à minha cachorrinha de estimação, Oli, pelo apoio emocional.

Às minhas amigas e amigos de infância e adolescência, e às amizades cultivadas durante a minha graduação: Ana Luiza Pires, Ariely Tomaz, Beatriz Zolin, Débora Leitão, Giovanna Cardoso, Kallyne Melo, Lui de Brito, Maria Júlia Maciel, Mariana Melo e Rebeca Ximenes, e aos amigos Bernardo Ribemboim, Gabriel Carvalho, Hebert Sabino, João Felipe Sobral e Marley Santos. Sou feliz pelas risadas e pelos bons momentos que compartilhamos juntos, suas amizades são um verdadeiro tesouro para mim.

A mim mesma. Mesmo quando eu caio e me machuco, corro em direção aos meus sonhos.

Obrigada!

RESUMO

O câncer de mama é um problema de saúde global, que afeta predominantemente as mulheres, com menor incidência nos homens. Atualmente, a resistência à quimioterapia e os efeitos colaterais dos fármacos antineoplásicos são obstáculos no tratamento de pacientes com câncer de mama. Assim, surge a necessidade de novos fármacos com maior potencial terapêutico e baixos efeitos tóxicos. Neste cenário, os 2-amino-tiofênicos são promissores, por serem objeto de diversos estudos devido às suas atividades antitumorais. O presente estudo teve por finalidade avaliar o potencial anticâncer contra linhagem de células de câncer de mama e realizar predições toxicológicas de sete derivados 2-amino-tiofênicos. Inicialmente, foi avaliado o efeito citotóxico e índice de seletividade dos sete derivados contra a linhagem tumoral de adenocarcinoma mamário (MCF-7) e normal (L-929). Em seguida, foram feitas análises morfológicas, ensaio clonogênico e ensaio de migração celular por meio de abordagens *in vitro*, a fim de evidenciar alterações celulares, capacidade das células de inibir a formação de colônias e a capacidade de inibir a migração celular, respectivamente. Posteriormente, a predição das propriedades toxicológicas dos compostos foi analisada *in silico* através da plataforma ProTox. Os resultados demonstraram que os compostos 5CN09 e TN5 apresentaram atividade antitumoral frente à linhagem tumoral MCF-7. O composto TN5 apresentou IC₅₀ de 4,08 µg/mL e SI de 6,1, enquanto o 5CN09 teve uma IC₅₀ de 8,68 µg/mL e SI de 2,9. Após as análises morfológicas, TN5 gerou abundante multinucleação nas células nas concentrações testadas e 5CN09 induziu a formação de micronúcleos e brotos celulares. Os compostos TN5 e 5CN09 apresentaram efeitos na inibição da proliferação celular no ensaio clonogênico, e diminuição da migração celular na linhagem MCF-7. Nos estudos *in silico*, as moléculas 5CN09 e TN5 mostraram baixa toxicidade aguda, contudo foi alertado acerca da possível hepatotoxicidade, e/ou toxicidade clínica. Portanto, nossos resultados demonstram que 5CN09 e TN5 apresentaram citotoxicidade para MCF-7, com alterações morfológicas indicativas de danos ao DNA, estresse oxidativo e/ou parada do ciclo celular, além de diminuir a formação de colônias e migração celular. Os compostos apresentaram seletividade para MCF-7. Apesar da previsão de hepatotoxicidade, mais estudos são necessários para avaliar sua segurança clínica e elucidar os mecanismos de ação desses compostos.

Palavras-chave: Tiofeno; Genotoxicidade; Antitumoral; Migração celular.

ABSTRACT

Breast cancer is a global health problem, predominantly affecting women, with a lower incidence in men. Currently, chemotherapy resistance and the side effects of antineoplastic drugs are major obstacles in the treatment of breast cancer patients. Thus, there is a need for new drugs with greater therapeutic potential and lower toxic effects. In this context, 2-amino-thiophenes are very promising, as they have been the subject of several studies due to their antitumor activities. The present study aimed to evaluate the anticancer potential against a breast cancer cell line and the toxicological predictions of seven 2-amino-thiophene derivatives. Initially, the cytotoxic effect and selectivity index of the seven derivatives against breast adenocarcinoma (MCF-7) and normal (L-929) cell lines were evaluated. Then, morphological analyses, clonogenic assay, and cell migration assay were performed through *in vitro* approaches to highlight cellular changes, the ability of cells to inhibit colony formation, and the ability to inhibit cell migration, respectively. Subsequently, the prediction of the toxicological properties of the compounds was analyzed *in silico* using the ProTox platform. The results showed that compounds 5CN09 and TN5 exhibited antitumor activity against the MCF-7 tumor cell line. Compound TN5 showed an IC_{50} of 4.08 $\mu\text{g/mL}$ and a SI of 6.1, while 5CN09 had an IC_{50} of 8.68 $\mu\text{g/mL}$ and a SI of 2.9. After morphological analysis, TN5 caused abundant multinucleation in cells at the tested concentrations, and 5CN09 induced the formation of micronuclei and cell budding. Compounds TN5 and 5CN09 showed effects in inhibiting cell proliferation in the clonogenic assay and reducing cell migration in the MCF-7 cell line. Regarding *in silico* studies, the molecules 5CN09 and TN5 showed low acute toxicity; however, potential hepatotoxicity and/or clinical toxicity were cautioned. Therefore, our results demonstrate that 5CN09 and TN5 exhibited cytotoxicity to MCF-7, with morphological changes indicative of DNA damage, oxidative stress, and/or cell cycle arrest, in addition to reducing colony formation and cell migration. The compounds showed selectivity for MCF-7. Despite the prediction of hepatotoxicity, further studies are needed to assess their clinical safety and elucidate the mechanisms of action of these compounds.

Keywords: Thiophene; Genotoxicity; Antitumor; Cell migration.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	09
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	11
2.1. Câncer.....	11
2.1.1. Evasão da morte celular.....	12
2.1.2. Autossuficiência em sinais de crescimento.....	13
2.1.3. Proliferação ilimitada e resistência à sinais antiproliferativos.....	13
2.1.4. Angiogênese.....	14
2.1.5. Invasão e metástase.....	14
2.1.6. Desregulação energética.....	15
2.1.7. Não destruição imunológica.....	15
2.1.8. Instabilidade genética e mutações.....	16
2.1.9. Inflamação promotora de tumor.....	17
2.2. Câncer de mama.....	17
2.2.1. Características do câncer de mama.....	20
2.2.2. Diagnóstico e tratamento do câncer de mama.....	22
2.2.3. Potencial anticâncer de tiofenos.....	24
2.2.4. Desvendando derivados 2-amino-tiofenos no combate do câncer.....	25
3. OBJETIVOS.....	27
3.1. Objetivo Geral.....	27
3.2. Objetivos Específicos.....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1. Moléculas.....	28
4.2. Linhagem celular e condições de cultivo.....	29
4.3. Ensaio de citotoxicidade em células normais e cancerosas.....	29
4.4. Índice de Seletividade.....	30
4.5. Análises morfológicas.....	30
4.6. Ensaio clonogênico.....	31
4.7. Ensaio de migração celular.....	31
4.8. Avaliação das propriedades toxicológicas <i>in silico</i>	32
4.9. Análises estatísticas.....	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
6. CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS.....	49

1. INTRODUÇÃO

Globalmente, em 2022, o câncer de mama atingiu 2,3 milhões de mulheres e resultou em 670.000 mortes (OMS, 2024). No Brasil, o câncer de mama feminino é o segundo mais prevalente entre os tipos de câncer, com exceção da região Norte, onde o câncer do colo do útero é o mais prevalente. Em termos de letalidade, essa neoplasia se destaca como a principal causa de morte por câncer entre mulheres em todo o Brasil. Além disso, entre 2023 e 2025, estima-se cerca de 73.610 novos casos anuais, resultando em uma incidência de 41,89 casos por 100.000 mulheres (INCA, 2022).

Dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) apontam que o câncer de mama é mais frequente em mulheres mais velhas, entre 50 a 69 anos, com a maioria dos diagnósticos ocorrendo após os 50 anos. Embora raro, homens também são afetados, representando aproximadamente 1% dos casos de câncer de mama (INCA, 2019).

O tratamento do câncer de mama é feito de forma abrangente, envolvendo diferentes estratégias para controlar a doença. Por exemplo, a cirurgia e a radioterapia são essenciais para tratar o câncer localizado, enquanto a quimioterapia, terapia hormonal, terapia direcionada e imunoterapia são usadas para combater possíveis metástases (Harbeck *et al.*, 2019). No entanto, esses tratamentos podem causar efeitos colaterais, como cardiotoxicidade, dor, linfedema, entre outros (Tommasi *et al.*, 2022). Dessa forma, os pesquisadores buscam melhorar terapias, de forma que sejam eficazes e menos tóxicas, visando o bem-estar do paciente.

Na busca pelo desenvolvimento de medicamentos mais eficazes e menos tóxicos, cientistas têm estudado diversos compostos contendo o anel tiofênico (Archana; Pathania; Chawla, 2020). Estas substâncias têm despertado interesse por seu potencial como fármacos ou componentes-chave na área da química medicinal, além de serem úteis como ferramentas de pesquisa na biologia química. O tiofeno, presente em muitos fármacos contra o câncer disponíveis no mercado, atua em diferentes vias relacionadas ao combate da doença (AlSaid *et al.*, 2011; Gulipalli *et al.*, 2019).

Por sua vez, os 2-amino-tiofenos (2-ATs), classe de compostos orgânicos contendo um anel tiofênico (Shah; Verma, 2018), servem como componentes importantes na síntese orgânica. Atualmente, existe o interesse em análogos de 2-ATs, tais como tiofenos substituídos em 2-N, devido às suas amplas propriedades biológicas e farmacológicas (Duvauchelle *et al.*, 2022). Entre as ações farmacológicas reconhecidas dos 2-ATs, podemos citar o seu potencial como compostos anticancerígenos (Romagnoli *et al.*, 2014; Thomas *et al.*, 2017), antimicrobianos (Aly *et al.*, 2011) e antivirais (Nasr *et al.*, 2014), reafirmando a perspectiva favorável da estrutura heterocíclica (Bozorov *et al.*, 2017).

Nesse contexto, a predição toxicológica *in silico* é aplicada para aumentar a segurança dos medicamentos ao prever os estágios iniciais de seu desenvolvimento. Técnicas de inteligência artificial e aprendizado de máquina realizam previsões precisas de interações fora do alvo e auxiliam na identificação de potenciais reações adversas a medicamentos (Liu *et al.*, 2024). A incorporação de previsões *in silico* juntamente com dados experimentais melhora a precisão das avaliações de toxicidade, promovendo assim a conformidade com os princípios dos 3Rs (substituir, reduzir, refinar) (Yamada, 2022; Cross *et al.*, 2022). As estruturas visuais oferecidas pelas metodologias *in silico* facilitam a avaliação de alvos toxicológicos, aprimorando os processos de tomada de decisão relacionados à segurança dos medicamentos (Cross *et al.*, 2022).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo investigar a atividade anticâncer frente a câncer de sete derivados 2-ATs (5CN05, 5CN06, 5CN09, TN5, 6CN05, 6CN10 e 6CN11) em linhagem de câncer de mama humano.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

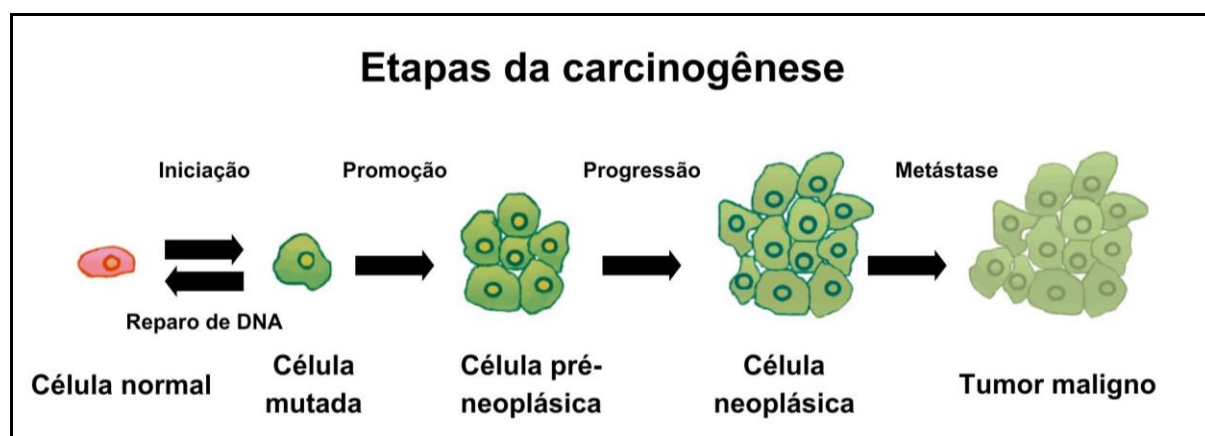
2.1. Câncer

O corpo humano, composto por cerca de 30 trilhões de células, funciona como um sistema complexo e interligado, com células regulando o crescimento umas das outras (Hatton *et al.*, 2023). As células saudáveis se dividem sob a orientação das células vizinhas, mantendo o tamanho e a estrutura adequados dos tecidos para atender às suas necessidades (Bianconi *et al.*, 2013).

Por outro lado, as células cancerígenas perturbam essa harmonia, uma vez que ignoram os controles normais do crescimento, prosseguindo o seu ciclo celular (Hanselmann *et al.*, 2022). Assim, o câncer pode ser descrito como um conjunto de doenças caracterizadas pela proliferação desregulada de células, que, ao ignorarem os sinais do organismo para interromper seu crescimento, multiplicam-se descontroladamente, formando tumores invasivos e com perda de diferenciação celular (Brown *et al.*, 2023).

A formação do câncer, processo chamado de carcinogênese (**Figura 1**), ocorre em múltiplas fases que constituem as etapas de iniciação, promoção e progressão (Rashid, 2017). A carcinogênese é um processo complexo que induz a ativação de oncogenes, a inativação de genes supressores tumorais e a alteração de vias bioquímicas com fenômenos que incluem danos ao DNA (Oliveira *et al.*, 2007).

Figura 1. Processo de múltiplas etapas envolvido na carcinogênese que transforma uma célula normal em um tumor maligno.



Fonte: Adaptado de Siddiqui *et al.* (2015).

A iniciação ocorre por agentes carcinogênicos e dá origem a mutações genéticas capazes de evoluir para potencial neoplásico (Stewart, 2019). Os estágios subsequentes de promoção e progressão incluem ativação de oncogenes e desativação de genes supressores de tumor, resultando em hiperproliferação celular e malignização (Dakal *et al.*, 2024).

Além disso, na oncologia, o conceito das “marcas” do câncer foi estabelecido por dois importantes cientistas, Robert Weinberg e Douglas Hanahan, delineando seis características fundamentais adquiridas pelas células cancerígenas para crescer e proliferar, incluindo evasão da morte celular, autossuficiência em sinais de crescimento, capacidade de proliferação ilimitada, estimular o crescimento de novos vasos sanguíneos (processo também conhecido como angiogênese), resistência à sinais antiproliferativos, e desencadear invasão, se espalhando para outras partes do corpo, caracterizando a metástase (Hanahan; Weinberg, 2000).

Posteriormente, ambos os cientistas introduziram duas características adicionais, como a desregulação energética e a não destruição imunológica, enfatizando que essas características são facilitadas por dois fatores subjacentes, através da instabilidade genética e mutações, e a inflamação que promove o crescimento do tumor (Hanahan; Weinberg, 2011).

A seguir, será abordado mais sobre cada uma dessas marcas do câncer e suas características, discutindo os mecanismos celulares e moleculares envolvidos que contribuem para o seu desenvolvimento.

2.1.1. Evasão da morte celular

Os principais mecanismos de escape do câncer envolvem vários processos celulares que permitem às células tumorais superarem as restrições de crescimento e contornar os mecanismos de controle (Kim; Cho, 2022). Esses mecanismos incluem adaptação à hipóxia, mutações genéticas no gene p53 (conhecido como guardião do genoma), evasão de apoptose, modulação do sistema imunológico e alterações nos pontos de verificação do ciclo celular (Rivera *et al.*, 2014). Os tumores podem restabelecer a neovascularização sob condições hipóxicas, enquanto as mutações no gene p53 podem levar ao crescimento descontrolado, anulando as suas funções supressoras de tumor (Kortlever, 2008). Além do mais, a evasão do apoptose e vigilância do sistema imunológico são inegáveis para a sobrevivência e progressão do tumor (Bhatia; Kumar, 2014). Toda essa interação

entre proliferação celular, diferenciação e respostas imunes contribui para o mecanismo de escape tumoral (Tchernev, 2009).

2.1.2. Autossuficiência em sinais de crescimento

O crescimento do câncer é influenciado pelos sinais celulares que governam vários processos necessários para o crescimento e progressão dos tumores (Sever; Brugge, 2015). No que diz respeito ao funcionamento do câncer, a autossuficiência refere-se ao fato de uma célula tumoral poder ela própria induzir e segregar fatores de crescimento, que encorajam o seu maior crescimento e sobrevivência (Sinha *et al.*, 2024). Vários caminhos de comunicação célula a célula, como fator de crescimento, citocinas e comunicação intercelular mediada por vesículas extracelulares, apoiam processos como angiogênese, evasão imunológica e resistência a medicamentos, todos contribuem para a progressão do câncer e metástase (Maacha *et al.*, 2019). Em outras palavras, o câncer explora vias de sinalização para contribuir com seu próprio crescimento e sobrevivência.

2.1.3. Proliferação ilimitada e resistência à sinais antiproliferativos

As células cancerígenas são capazes de evitar a senescência replicativa, um estado de parada irreversível do crescimento que atua como um mecanismo de supressão de tumores, limitando o potencial proliferativo das células (Kong *et al.*, 2011). Os telômeros são sequências de DNA localizadas nas extremidades dos cromossomos e têm uma função crítica na senescência celular e no câncer (Lee; Pellegrini, 2022). No entanto, com a ativação da telomerase, enzima que mantém o comprimento dos telômeros, as células cancerígenas podem então contornar a senescência e continuar a proliferar indefinidamente (Trybek *et al.*, 2020).

A resistência aos sinais antiproliferativos é um processo complexo no qual ocorrem diferentes mecanismos (Mansoori *et al.*, 2017). Nesse contexto, o surgimento da resistência através da alteração dos alvos dos medicamentos, da ativação de vias pró-sobrevivência, da redução da morte celular e da ativação de mecanismos de *bypass* permite que as células cancerígenas resistam ao efeito antiproliferativo dos medicamentos alvo-específicos (Mohammad *et al.*, 2015). Os mecanismos de resistência a sinais antiproliferativos podem ser intrínsecos ou adquiridos. A resistência intrínseca impede uma resposta bem-sucedida à

quimioterapia inicial, e a resistência adquirida desenvolve-se após um tratamento inicial bem-sucedido (Holohan *et al.*, 2013).

A proliferação ilimitada que muitas vezes caracteriza uma célula cancerosa leva à formação e progressão de um tumor (Feitelson *et al.*, 2015). Por outro lado, a resistência aos sinais antiproliferativos envolve a capacidade das células de escapar aos sinais que normalmente resultam na inibição do seu crescimento, também contribuindo para o desenvolvimento do tumor e para os desafios associados ao tratamento (Ravi *et al.*, 2022).

2.1.4. Angiogênese

A angiogênese atua na progressão do câncer através do desenvolvimento de novos vasos sanguíneos para oxigenar e nutrir os tumores (Liu *et al.*, 2023). Os fatores angiogênicos incluem o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) e os Fatores Induzíveis por Hipóxia (HIFs) (Lugano *et al.*, 2020). É um processo importante no microambiente tumoral através da promoção do crescimento tumoral, metástase e resistência à terapia (Schiffmann *et al.*, 2022).

Os tumores dependem do desenvolvimento de novos vasos sanguíneos para fornecer-lhes os nutrientes, oxigênio e caminhos necessários para a disseminação metastática (Dzobo *et al.*, 2023). A vasculatura tumoral resultante da angiogênese é anormal e leva à hipóxia, acidez e alta pressão do líquido intersticial dentro do microambiente tumoral, aumentando ainda mais a agressividade do tumor e a resistência ao tratamento (Majdipoor; Mortezaee, 2021). Assim, a promoção da angiogênese no microambiente tumoral contribui para o avanço de doenças malignas, incluindo o câncer da mama, em que o aumento da angiogênese está correlacionado com uma menor sobrevivência dos pacientes (Madu *et al.*, 2020).

2.1.5. Invasão e metástase

A invasão e a metástase são dois processos que permitem a disseminação de células malignas e são responsáveis pelas principais causas de mortalidade por câncer (Fares *et al.*, 2020). A metástase é um processo gradual que inclui eventos de invasão celular local, intravasamento de células na vasculatura, sobrevivência na corrente sanguínea, parada em locais distantes, extravasamento para novos tecidos

e colonização para formar metástases macroscópicas (Meirson *et al.*, 2020; Dhanisha; Chandrasekharan, 2023).

2.1.6. Desregulação energética

A desregulação energética no câncer é uma característica fundamental da tumorigênese, pois ocorre a reprogramação metabólica para obter aumento de energia para as células malignas (Jang; Kim; Lee, 2013). Essas alterações compreendem a desregulação nas principais vias bioenergéticas celulares, como a glicólise aeróbica, baixos níveis de fosforilação oxidativa e aumento de intermediários biossintéticos (Tetik, 2022).

O efeito Warburg, caracterizado pelo aumento da glicólise aeróbica e pela deficiência da fosforilação oxidativa nas células cancerígenas, é uma das manifestações mais importantes da desregulação energética no câncer (Pascale *et al.*, 2020). Essa reprogramação metabólica permite que as células cancerígenas satisfaçam uma elevada procura de energia para o seu crescimento, proliferação e sobrevivência, mesmo quando há oxigênio suficiente (Liberti; Locasale, 2016).

A mudança na glicólise em direção a esta via de produção de energia, em vez da fosforilação oxidativa, é uma marca registrada da maioria dos cânceres e é caracterizada por metabolismo alterado, na forma de aumento da produção de lactato e dependência de citrato para a biossíntese lipídica (Xian Zhang *et al.*, 2019).

A interação do metabolismo celular com a epigenética pode atuar sinergicamente para impulsionar e aumentar ainda mais os estados tumorigênicos (Isa, 2022). Aliás, a reprogramação metabólica das células cancerosas está intimamente ligada à regulação das células imunes no microambiente tumoral, onde os macrófagos possuem fenótipos metabólicos distintos na modulação da progressão tumoral (Bassal, 2023).

2.1.7. Não destruição imunológica

A evasão da destruição imunológica no câncer se refere aos mecanismos usados pelas células cancerígenas para escapar da vigilância e destruição imunológica (Dutta *et al.*, 2023). O microambiente tumoral (MAT) influencia o desenvolvimento do tumor através de processos de imunoeedição (Vinay *et al.*, 2015).

O MAT está ativamente envolvido em todas as fases da carcinogênese, influenciando o início do câncer, a progressão e a invasão dos tumores (Anderson; Simon, 2020). Por exemplo, as células neoplásicas evitam a detecção imunológica criando colônias, vasos sanguíneos para nutrição e metástase para outros órgãos (Massagué; Obenauf, 2016). Além do que, a composição do microambiente tumoral favorece a evasão do sistema imunológico, pois é enriquecida com linfócitos e células estromais associadas ao câncer (Neophytou *et al.*, 2021).

Um dos mecanismos de evasão se dá pela secreção de vesículas extracelulares que expressam receptores como CD47 e CD24, que ajudam a evitar a fagocitose, mantendo assim a sua longevidade e favorecendo a supressão imunológica e a metástase (Altevogt *et al.*, 2020). Durante a progressão do câncer, a inflamação e os sinais linfocíticos podem ser silenciados, resultando na falta de detecção do câncer nos estágios iniciais, o que permite a transição epitelial-mesenquimal (TEM) e subsequentemente facilita sua dispersão para novos tecidos (Ribatti; Tamma; Annese, 2020). Adicionalmente, em cada estágio, a interação dinâmica entre as células cancerígenas e o MAT molda o comportamento e a progressão do tumor (Wang *et al.*, 2017).

2.1.8. Instabilidade genética e mutações

A instabilidade genômica é um processo nos quais diferentes mecanismos desempenham um papel na promoção do acúmulo de mutações no genoma, conduzindo à tumorigênese (Moon *et al.*, 2019). As células cancerosas empregam estratégias para suprimir a fidelidade do reparo do DNA, levando à instabilidade do genoma (Das *et al.*, 2021). A principal característica da instabilidade genética é a segregação incorreta dos cromossomos, ocasionando a aneuploidia, que é uma marca registrada das células cancerosas (Jilderda *et al.*, 2021). As fontes endógenas de instabilidade do genoma incluem o estresse de replicação e a dinâmica perturbada da cromatina, que desempenham papéis decisivos na evolução do câncer (Mehrotra; Mittra, 2020). Mutações em genes de reparação de DNA, juntamente com sistemas de reparação de incompatibilidades de DNA defeituosos, que contribuem para a instabilidade genética, proporcionam a oportunidade para instabilidade de microssatélites e aumento da imunogenicidade tumoral (Palmieri *et al.*, 2020).

2.1.9. Inflamação promotora do tumor

A inflamação promotora de tumores atua no desenvolvimento do câncer, pois cria um microambiente que ajuda a impulsionar o crescimento e a metástase do tumor (Hibino *et al.*, 2021). A inflamação contínua, decorrente de condições pré-existentes, como infecção, tabagismo e obesidade (Greten; Grivennikov, 2019), ou induzida pelo próprio tumor, age como indutor e promotor de neoplasias malignas (Shalapour; Karin, 2015). A inflamação associada a tumores envolve populações de células imunes, como células supressoras derivadas de mieloides e macrófagos associados a tumores, que, por sua vez, promovem a tumorigênese, aumentando a angiogênese e acelerando a metástase (Zhao *et al.*, 2021).

2.2. Câncer de mama

Atualmente, existem mais de 100 tipos diferentes de câncer, com características próprias, opções de tratamento e prognóstico (Hanahan; Weinberg, 2000; *National Cancer Institute*, 2019). Dentre os diversos tipos de cânceres, o câncer de mama é a forma mais comum de câncer em todo o mundo (OMS, 2024).

O câncer de mama é a principal causa de mortalidade por câncer em mulheres (James *et al.*, 2018) e uma causa não negligenciável de morte por câncer em homens (Giordano, 2018). Desde meados da década de 2000, a taxa de incidência do câncer de mama feminino tem aumentado gradualmente em 0,5% ao ano, principalmente devido ao diagnóstico de doença em estágio localizado e com receptor hormonal positivo (Giaquinto *et al.*, 2022).

O câncer de mama com receptor hormonal positivo (HR+) é responsável por uma grande parte dos casos de câncer de mama e é fundamental para o diagnóstico e tratamento (Sebastian *et al.*, 2023). Até 2050, espera-se que o número de novos casos de câncer da mama feminino mundialmente se aproxime dos 3,2 milhões ao ano (Tao *et al.*, 2015).

A incidência do câncer da mama nos países desenvolvidos é mais elevada, enquanto a mortalidade relativa é maior nos países menos desenvolvidos (Ghoncheh *et al.*, 2016). Nos países desenvolvidos, há maior acesso aos serviços

de saúde, incluindo programas de rastreio e programas de diagnóstico precoce para uma detecção mais rápida do câncer da mama (Da Costa Vieira *et al.*, 2017).

Além disso, há uma maior conscientização sobre a importância do autoexame e dos exames regulares (Shulman *et al.*, 2010). Nos países menos desenvolvidos, pelo contrário, a falta de acesso aos serviços de saúde, poucos recursos para diagnóstico precoce, tratamento adequado e questões socioeconômicas contribuem para as elevadas taxas de mortalidade relativa (Francies *et al.*, 2020).

A epidemiologia do câncer de mama no Brasil revela tendências variadas em diferentes regiões, e estudos mostram aumento nas internações e nas taxas de mortalidade, sendo as regiões Sul e Sudeste as mais afetadas (Justo *et al.*, 2023). O câncer de mama continua sendo um problema de saúde pública no Brasil, com taxas de incidência crescentes e desafios no diagnóstico precoce e no acesso ao tratamento (Ferreira *et al.*, 2023). A expectativa para o triênio de 2023-2025 é que o país registre cerca de 73.610 novos casos anualmente (INCA, 2022).

A **Tabela 1** mostra a estimativa de casos de câncer de mama para o Brasil, com taxa bruta de 66,54 e taxa ajustada de 41,89. A região Sudeste do Brasil é responsável pelo maior número de casos e uma das maiores taxas brutas de incidência, o que pode ser devido à maior densidade populacional e à melhor capacidade de diagnóstico e registro de doenças (Engler *et al.*, 2021). Por outro lado, no Norte, o número de casos é o mais baixo, mas apresenta taxas brutas e ajustadas notáveis, o que indica fortes variações regionais na distribuição e impacto do câncer de mama (Dantas de Araújo Camargo *et al.*, 2021).

Tabela 1. Taxas brutas e ajustadas* de incidência e número de casos por neoplasia maligna da mama, por 100 mil mulheres, estimadas para cada ano do triênio 2023-2025, no Brasil, regiões e Unidades da Federação.

Região / Unidade da Federação	Nº de casos	Taxa bruta	Taxa ajustada*
Região Norte	2.410	24,99	27,73
Acre	100	22,21	26,20
Amapá	80	16,58	20,04
Amazonas	500	22,77	28,34
Pará	1.020	22,83	23,88
Rondônia	320	35,33	36,99
Roraima	70	22,09	27,73
Tocantins	320	38,58	35,72
Região Nordeste	15.690	52,20	42,11
Alagoas	690	39,23	34,89
Bahia	4.230	54,35	43,28
Ceará	3.080	63,92	54,13
Maranhão	1.060	28,76	28,29
Paraíba	1.180	55,40	41,37
Pernambuco	2.880	56,58	46,40
Piauí	860	50,31	41,89
Rio Grande do Norte	1.140	61,61	50,11
Sergipe	570	46,42	42,11
Região Centro-Oeste	4.950	57,28	47,30
Distrito Federal	1.030	62,70	49,76
Goiás	1.970	52,74	45,63
Mato Grosso	1.040	57,70	47,51
Mato Grosso do Sul	910	62,22	47,10
Região Sudeste	39.330	84,46	52,83
Espírito Santo	900	42,20	32,94
Minas Gerais	7.670	69,80	49,28
Rio de Janeiro	10.290	111,83	70,57
São Paulo	20.470	84,43	56,37
Região Sul	11.230	71,44	41,06
Paraná	3.650	60,76	41,06
Rio Grande do Sul	3.720	62,67	36,60
Santa Catarina	3.860	102,12	74,79
Brasil	73.610	66,54	41,89

Legenda: (*) Taxas ajustadas pela população mundial padrão.

Fonte: Adaptado do INCA (2022).

2.2.1. Características do câncer de mama

O câncer de mama é um tipo específico de câncer que geralmente começam nos lóbulos mamários e nos dutos de leite (Feng *et al.*, 2018) e suas condições patológicas associadas são altamente heterogêneas nos níveis celular e molecular (Sharma *et al.*, 2010). Morfologicamente, o câncer de mama é categorizado em dois tipos principais: o carcinoma ductal invasivo (CDI) e o carcinoma lobular invasivo (CLI), baseando-se na capacidade do carcinoma de formar túbulos ou dutos e coesão celular (Roy *et al.*, 2023).

Na clínica, as amostras histopatológicas podem ser submetidas à análise imunohistoquímica para reconhecer os subtipos moleculares desse tipo de câncer (Blows *et al.*, 2009). O câncer de mama converge fenotipicamente nos seguintes subtipos: I. luminal A; II. luminal B; III. superexpressão do HER2; IV. basalóide; e V. triplo-negativo não-basalóide (Cirqueira *et al.*, 2011). Atualmente, a abordagem predominante envolve a classificação do carcinoma de mama mediante uma avaliação morfológica integrada com estudos imunohistoquímicos (Sun; Ding; Sahin, 2023).

A imunohistoquímica fornece, combinada com os anticorpos apropriados contra biomarcadores, informações relacionadas ao padrão de expressão associado ao receptor de estrogênio, receptor de progesterona, receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano, entre outros (**Tabela 2**).

Tabela 2. Perfis imunofenotípicos para a classificação molecular por imunoistoquímica dos tumores de mama.

Subtipo molecular	Classificação com o índice de Ki-67* de 14%
	Padrão de imunomarcacão
Luminal A	RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 <14%
Luminal B	RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 ≥ 14% RE+ e/ou RP+, HER2+ (luminal HER2)
Superexpressão de HER2	RE-, RP- e HER2+
Basalóide	RE-, RP-, HER2-, CK5+ e/ou EGFR+
Triplo-negativo não basalóide	RE-, RP-, HER2-, CK5- e EGFR-

Legenda: receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2); receptor tipo 1 do fator de crescimento epidérmico (EGFR); receptor de estrogênio (RE); receptor de progesterona (RP); citoqueratina 5 (CK5).

*O Ki-67 (ou MIB-1) é um marcador usado na avaliação imunohistoquímica do câncer de mama para medir a proliferação celular. Como esta proteína é expressa durante a divisão celular, tumores com alta taxa de crescimento apresentam níveis elevados de Ki-67.

Fonte: Adaptado de Cirqueira *et al.* (2011).

Os subtipos luminais (I e II) são assim chamados porque as células neoplásicas nesses grupos se assemelham, em vários graus, às células normais da mama que estão em contato direto com o lúmen dos dutos mamários, chamadas de células luminais (Sotiriou *et al.*, 2003). O câncer de mama luminal é dividido em subtipos luminal A e luminal B, cada um com subgrupos imunológicos distintos, que são identificados através de perfis de metilação do DNA e transcriptomas (Zhang *et al.*, 2022). Além disso, usando um ponto de corte de 14% para Ki-67, descobriu-se que os tumores luminais B são o segundo maior subtipo molecular (35% dos tumores positivos para receptores hormonais e negativos para HER2) e estão associados a taxas mais altas de recidiva local e regional (Voduc *et al.*, 2010).

A superexpressão do subtipo HER2 denota a manifestação de grandes quantidades da oncoproteína HER2 nas células cancerígenas (Iqbal; Iqbal, 2014). No entanto, ao contrário de outros subtipos de câncer de mama, como luminal A e luminal B, as células cancerígenas com superexpressão de HER2 geralmente não expressam receptores hormonais, como os receptores de estrogênio (ER) e progesterona (PR) (Weigelt; Baehner; Reis-Filho, 2010).

O subtipo basalóide é caracterizado pela expressão de genes normalmente encontrados em células basais ou mioepiteliais (Badowzka-Kozakiewicz; Budzik, 2016). Histologicamente, o tipo basalóide é de alto grau, com alto índice mitótico, áreas de necrose central e infiltrado linfocitário proeminente (Oramas; Bell; Middleton, 2020). É negativo para receptores hormonais e superexpressão de HER2 (Cirqueira *et al.*, 2011).

Tumores triplo-negativos não basalóides referem-se a um subconjunto de cânceres de mama triplo-negativos que não apresentam características semelhantes às basais (Prat *et al.*, 2013). Incluindo marcadores imunoistoquímicos como citoqueratina 5 ou 5/6 e EGFR nos perfis de tumores triplo-negativos, sugere-se que é possível estimar fenotipicamente um perfil genético para o subtipo basalóide (Cirqueira *et al.*, 2011).

A ênfase na necessidade de diagnosticar subtipos de câncer de mama é ser capaz de adaptar as estratégias de tratamento do tumor às características moleculares do tumor, resultando em resultados melhores para o paciente (Masood, 2016).

2.2.2. Diagnóstico e tratamento do câncer de mama

O câncer de mama apresenta características diversas no desenvolvimento da doença e na sobrevivência de cada paciente. Essa diversidade é influenciada por muitos elementos, como a taxa de crescimento tumoral, a propensão à disseminação metastática e outros processos relacionados à saúde imunológica, hormonal e nutricional do paciente (Buitrago *et al.*, 2011).

De acordo com as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas para Carcinoma de Mama no Brasil de 2022, a biópsia é recomendada para casos suspeitos de câncer de mama após exame físico. O objetivo principal da biópsia é obter material adequado para o diagnóstico, priorizando técnicas minimamente invasivas para examinar a histopatologia. A escolha do método de biópsia depende de vários fatores, como tamanho da massa, localização, preferências do paciente e recursos disponíveis. Após a confirmação do carcinoma, o relatório inicial da biópsia deve incorporar análise imunohistoquímica (IHQ) avaliando receptores de estrogênio (RE), receptores de progesterona (PR) e receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER2).

Fatores de risco, apresentação clínica, características histológicas, resultado e resposta à terapia sistêmica variam entre os subtipos distintos de tumores de mama (Desmedt *et al.*, 2009; Blows *et al.*, 2010; Reis-Filho *et al.*, 2010). Para prognóstico, previsão e seleção de tratamento, os marcadores imunohistoquímicos (IHQ) têm sido utilizados em conjunto com fatores clinicopatológicos, como tamanho do tumor, grau do tumor, envolvimento nodal, tipo histológico e margens cirúrgicas (Vallejos *et al.*, 2010).

As opções de tratamento do câncer de mama incluem uma abordagem local que envolve cirurgia do tumor primário, radioterapia e avaliação do envolvimento axilar e uma abordagem sistêmica, que envolve terapia hormonal e quimioterapia (Wang *et al.*, 2023). A abordagem sistêmica pode ser administrada após o tratamento local adjuvante ou profilático ou antes dele. Estas podem ser uma terapia local ou sistêmica isolada ou combinações desses tratamentos para seus objetivos paliativos ou curativos. O tratamento pode ser parcial, envolvendo a cirurgia de preservação da mama, ou drástico, envolvendo a mastectomia (De Lemos *et al.*, 2019).

O tratamento do câncer de mama envolve várias terapias medicamentosas adaptadas a subtipos moleculares específicos. Para terapia endócrina, os principais medicamentos incluem inibidores da função ovariana, como goserrelina e leuprorrelina; inibidores da aromatase, como anastrozol e letrozol; e moduladores do receptor de estrogênio, como tamoxifeno e fulvestranto (Wang; Minden, 2022). No câncer de mama HER2-positivo, as terapias direcionadas incluem anticorpos monoclonais, como trastuzumabe e pertuzumabe, bem como conjugados anticorpo-fármaco, como T-DM1 (Castillo-Tobías *et al.*, 2023). A quimioterapia continua sendo fundamental para o câncer de mama triplo-negativo, utilizando agentes como doxorrubicina e ciclofosfamida (Obidiro; Battogtokh; Akala, 2023). Apesar dos avanços, desafios como resistência aos medicamentos e efeitos colaterais persistem, necessitando de pesquisas contínuas para tratamentos mais eficazes (Zhu *et al.*, 2023).

O manejo do câncer de mama envolve várias terapias, cada uma associada a efeitos adversos. Os eventos adversos incluem linfedema, dor, alterações anatômicas pós-operatórias, dermatite por radiação, pneumonia, lesões cardíacas e pulmonares pós-radioterapia, cardiotoxicidade induzida por antraciclina pós-quimioterapia, sintomas vasomotores, musculoesqueléticos e vulvovaginais após a terapia endócrina, e eventos adversos relacionados ao sistema imunológico com inibidores do ponto de controle imunológico (Maksymowicz *et al.*, 2023). A quimioterapia comumente leva a toxicidades como neutropenia febril, náuseas e vômitos (D'Arienzo *et al.*, 2023).

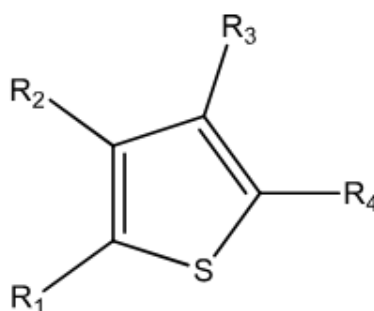
Além disso, são necessárias abordagens terapêuticas novas e direcionadas que não só aumentem a eficácia, mas também visam minimizar as toxicidades relacionadas com o tratamento, enfatizando a importância de equilibrar os

benefícios terapêuticos com os riscos potenciais para o bem-estar geral dos pacientes.

2.2.3. Potencial anticâncer de tiofenos

Atualmente, mais de 72% dos fármacos que podem ser prescritos em ambientes clínicos possuem pelo menos um anel heterocíclico (Martins *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2020; Heravi; Zadsirjan, 2020). O anel tiofênico é uma estrutura heterocíclica bem conhecida de cinco membros que contém enxofre e possui uma ampla gama de atividades, podendo interagir com diversos alvos biológicos, como enzimas, receptores e transportadores (**Figura 2**).

Figura 2. Anel tiofênico.



Fonte: A autora (2024).

Devido às múltiplas aplicações farmacêuticas, os compostos tiofênicos estão presentes em diversos medicamentos comercializados, incluindo olanzapina (Zyprexa®), dorzolamida, duloxetine (Cymbalta®), sertaconazol e raltitrexede (Tomudex®), antineoplásico utilizado para tratar câncer colorretal (Brault *et al.*, 2005).

Ademais, o anel tiofênico vem sendo explorado como estrutura chave para descoberta de novos fármacos (Alalawy *et al.*, 2024). Dessa forma, busca-se encontrar e desenvolver agentes quimioterápicos potentes para o câncer, com baixa toxicidade e que combata a resistência das células tumorais (Kumar Singh; Silakari, 2019).

A utilização do anel tiofênico vem sendo usada como um dos principais *scaffolds* para terapias anticâncer (Dallemagne *et al.*, 2002; De Vasconcelos *et al.*, 2013; Schmitt *et al.*, 2014; Ashok *et al.*, 2017). Alguns derivados do tiofeno, como SB-44, SB-83 e SB-200, mostraram-se promissores em estudos *in vitro* em

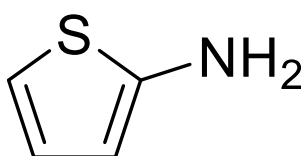
linhagens de câncer de próstata e adenocarcinoma cervical humanos. Os derivados SB-44, SB-83 e SB-200 foram citotóxicos para as células cancerígenas, inibindo formação de clones e apoptose, ao mesmo tempo em que mostram um efeito marcante sobre o ciclo celular, aumentando a população sub-G1 e minimizando as fases S/G2/M (Da Silva *et al.*, 2023).

Além disso, em um estudo *in vivo*, o derivado cloridrato de 2-(4-amidinofenil)-5-(4-clorofenil)tiofeno demonstrou atividade anticancerígena, sensibilizando as células cancerígenas colorretais à irradiação gama através de uma via anti-inflamatória e pró-apoptótica, sugerindo que os compostos à base de tiofeno possuem potencial terapêutico no tratamento do câncer (ElBakary *et al.*, 2022).

2.2.4. Desvendando derivados 2-amino-tiofenos no combate do câncer

Os 2-amino-tiofenos (2-ATs) são membros conhecidos da família tiofênica (**Figura 3**). Os 2-ATs apresentam diversas aplicações farmacológicas, como agentes ansiolíticos, anticancerígenos, anti-inflamatórios, antifúngicos, antimicrobianos, antioxidantes e antipsicóticos (Celebioglu *et al.*, 2021; Ratnani *et al.*, 2022).

Figura 3. 2-amino-tiofênico.



Fonte: A autora (2024).

Exemplos de medicamentos que apresentam em sua estrutura o 2-AT são o bentazepam e brotizolam. O bentazepam apresenta atividade ansiolítica, anticonvulsivante, sedativo e relaxante muscular esquelético. Por sua vez, o brotizolam é um medicamento sedativo-hipnótico (Chaturbhuj *et al.*, 2023).

Os 2-ATs são de fácil obtenção através da reação de Gewald. Essa reação é reconhecida há mais de cinquenta anos e permite a fácil geração de compostos biologicamente ativos através da combinação de α -cianoacetatos, compostos carbonílicos e enxofre elementar (Gewald, 1965).

A reação de Gewald é marcada pelo seu dinamismo, com muitas abordagens sintéticas e aplicações práticas em diversas áreas, como da química dos corantes ao *design* de medicamentos e dispositivos de biodiagnóstico (Puterová; Krutošíková; Végh, 2010). Há 15 variações do método Gewald, cada uma explorando diferentes condições de reação. Essas variações envolvem substratos com diversos grupos funcionais e substitutivos, incluindo alquil, aril e heteroaril. Curiosamente, em vez de utilizar bases orgânicas, alguns desses métodos empregam bases inorgânicas como Na_2CO_3 , NaOH , NaHCO_3 e K_3PO_4 (Puterová; Krutošíková; Végh, 2010). A resposta dos derivados 2-ATs é importante para estudos anticâncer, pois apresenta uma forma adaptável de produzir 2-amino-tiofenos substituídos que apresentam atividade antiproliferativa (Nguyen *et al.*, 2021).

As atividades citotóxicas e anticancerígenas de vários derivados de 2-amino-tiofenos contra vários tipos de linhagens celulares de câncer foram demonstradas em células de próstata, colo do útero, melanoma, mama, cólon, ovário, carcinoma hepatocelular e carcinoma cervical (Da Silva *et al.*, 2023; El-Sharkaway *et al.*, 2023; Rogova *et al.*, 2023). Os 2-ATs mostram-se promissores, uma vez que inibem o crescimento de células cancerígenas de forma seletiva e induzem a via de apoptose (Abdelnaby *et al.*, 2022).

Estudos *in silico* sobre 2-amino-tiofenos mostraram atividades anticancerígenas favoráveis através de várias vias (Darwish *et al.*, 2024). Derivados de tioureia teoricamente concebidos por meio de modelagem computacional demonstraram uma potente atividade inibitória contra o receptor tirosina-quinase do fator de crescimento epidérmico (EGFR-TK), uma proteína crucial na progressão do câncer, indicando alta seletividade e propriedades medicamentosas (Roslan *et al.*, 2023). Ademais, em outro estudo, novos derivados de tiofeno-2-carboxamida exibiram atividade citotóxica contra várias linhas celulares de câncer, entre elas MCF-7, K562, HepG2 e MDA-MB-231, enfatizando o seu potencial como agentes anticancerígenos eficazes (Gullipalli *et al.*, 2019).

Essas descobertas enfatizam alguns dos mecanismos pelos quais os 2-amino-tiofenos desencadeiam a sua atividade antitumoral, estabelecendo possíveis novas abordagens para o tratamento específico do câncer.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar o potencial anticâncer frente a linhagem de células de câncer de mama (MCF-7) e predições toxicológicas de sete derivados 2-amino-tiofênicos.

3.2. Específicos

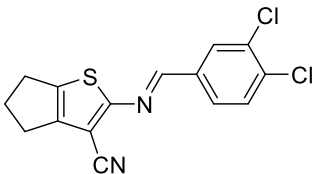
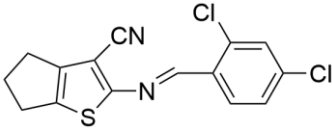
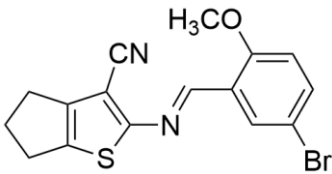
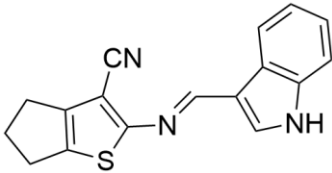
- Avaliar a citotoxicidade dos derivados 2-amino-tiofenos em linhagens de células cancerígena e normal;
- Analisar as alterações morfológicas causadas pelos derivados em células de câncer de mama;
- Analisar o potencial anti-clonogênico de derivados 2-amino-tiofenos em células câncer de mama;
- Avaliar a capacidade de inibição da migração de células de câncer de mama dos derivados em estudo;
- Analisar, por meio de estudos *in silico*, a toxicidade dos compostos, utilizando ferramentas computacionais de predição.

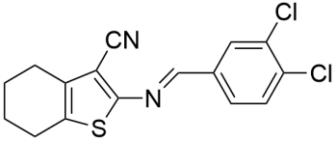
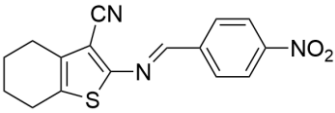
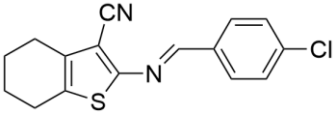
4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Moléculas

As substâncias foram previamente sintetizadas, caracterizadas e fornecidas pelo Prof. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Júnior, do Laboratório de Síntese e Vetorização Molecular (LSVM), da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). As moléculas com seus respectivos códigos, estruturas químicas, nomenclatura e peso molecular estão expostos na **Tabela 3**.

Tabela 3. As moléculas testadas foram sete compostos derivados 2-amino-tiofênicos sintéticos.

Código	Estrutura química	Nomenclatura (IUPAC)	Peso molecular (g/mol)
5CN05		2-[(3,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6-di-hidro-4 <i>H</i> -ciclopenta[<i>b</i>]tiofen o-3-carbonitrila	321,224
5CN06		2-[(2,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6-diidro-4 <i>H</i> -ciclopenta[<i>b</i>]tiofen o-3-carbonitrila	321,224
5CN09		(E)-2-((5-bromo-2-metoxibenzilideno) amino)-5,6-di-hidro-4 <i>H</i> -ciclopenta[<i>b</i>]tiofen o-3-carbonitrila	361,256
TN5		(E)-2-(((1 <i>H</i> -indol-3-il)metileno)amino)-5,6-di-hidro-4 <i>H</i> -ciclopenta[<i>b</i>]tiofen o-3-carbonitrila	291,370

6CN05		2-[(3,4-dicloro-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-benzo[<i>b</i>]tiofeno-3-carbonitrila	335,251
6CN10		2-[(4-nitrobenzilideno)amino]-4,5,6,7-tetraidro-4H-benzo[<i>b</i>]tiofeno-3-carbonitrila	311,358
6CN11		2-[(4-cloro-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-benzo[<i>b</i>]tiofeno-3-carbonitrila	300,806

Fonte: A autora (2024).

4.2. Linhagem celular e condições de cultivo

Para o teste de citotoxicidade foram utilizadas células da linhagem cancerígena MCF-7 (adenocarcinoma humano) e linhagem normal L929 (fibroblasto murino). As células foram obtidas no Banco de Células do Rio de Janeiro e mantidas no Laboratório de Prospecção Farmatológica de Produtos Bioativos (BIOFARMATOX) do Departamento de Antibióticos da UFPE. As células MCF-7 foram cultivadas em garrafas para cultura de células com meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* 1640 (RPMI-1640) e a linhagem L929 em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), suplementados com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de penicilina e estreptomicina. As células foram mantidas sob incubação em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C. O crescimento celular foi acompanhado até 100% da confluência em microscópio invertido (XD-202, Nexcope™, China).

4.3. Ensaio de citotoxicidade em células normais e cancerosas

A avaliação do efeito citotóxico das amostras foi realizada através do teste do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], que é um ensaio quantitativo *in vitro* para estimar a proliferação e a sobrevivência celular (Mosmann,

1983; Alley *et al.*, 1988). Este teste é baseado na capacidade da enzima succinato desidrogenase, ativa nas mitocôndrias de células viáveis, converter o sal tetrazólio (MTT) que é hidrossolúvel e de cor amarelada, em cristais de formazan, que são de cor púrpura. As células MCF-7 e L929 foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de 2×10^5 células/mL e incubadas *overnight* para aderência e formação da monocamada celular. Posteriormente, as amostras foram adicionadas nas concentrações de entre 0,781 – 25 µg/mL em diluições seriadas. As placas foram novamente incubadas por 48 horas após a exposição aos compostos. Foram adicionados 25 µL de solução do MTT (5 mg/mL) por 3 horas. Posteriormente, após o tempo de incubação, o sobrenadante foi aspirado e os cristais de formazan dissolvidos em 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich®, USA) para a leitura em leitor de microplacas (OD 570 nm). A viabilidade das células nos diferentes tratamentos, foram comparadas com o controle negativo a partir da seguinte fórmula: viabilidade celular (%) = média da absorbância dos tratados/média dos controles x 100, de acordo com De Andrade *et al.* (2022). A IC₅₀ (concentração que inibe 50% do crescimento celular em relação ao controle negativo) foi calculada a partir de regressão não linear no *software* GraphPad Prism 8.0 demo (<http://www.graphpad.com>). Os experimentos foram realizados em triplicata e em dois experimentos independentes.

4.4. Índice de seletividade

O Índice de Seletividade dos compostos foi expresso pela relação entre a IC₅₀ das células normais e cancerígenas. O IS foi utilizado para mostrar seletividade pelos compostos entre a linhagem normal, L929, e uma linhagem cancerosa, MCF-7. O IS é um parâmetro importante no uso terapêutico para futuros testes clínicos; portanto, a fórmula utilizada no cálculo do IS é:

$$IS = \frac{(IC_{50} \text{ linhagem normal})}{(IC_{50} \text{ linhagem tumoral})}$$

4.5. Análises morfológicas

As células MCF-7 foram semeadas em placas de 48 poços na concentração de 5×10^5 células por mL. Posteriormente, as células foram tratadas com os

compostos nas concentrações da IC_{50} e $2 \times IC_{50}$. Foi utilizado como controle positivo o paclitaxel e como controle negativo o meio de cultura com DMSO. Após o período de tratamento, o meio foi aspirado e as células foram fixadas com metanol e coradas com Panótico Rápido. As análises morfológicas foram conduzidas com o intuito de evidenciar alterações celulares, para ter indícios do tipo de morte celular que os compostos ativam. As microfotografias foram realizadas em microscópio invertido (XD-202, Nexcope™, China) nas objetivas de 40x e 400x de aumento.

4.6. Ensaio clonogênico

O ensaio clonogênico é um método usado para avaliar a capacidade das células de gerar colônias após a exposição a alguma substância. Consequentemente, serve como uma ferramenta na previsão do potencial anticâncer de compostos (Firmino *et al.*, 2019). Para isso, as células foram semeadas em placas de 48 poços com 2000 células por poço com meio de cultivo RPMI-1640 e posteriormente, foram incubadas para adesão celular. Após 24 h, as células foram tratadas com os compostos nas concentrações $\frac{1}{4} IC_{50}$, $\frac{1}{2} IC_{50}$ e IC_{50} . O meio de cultura foi utilizado como controle negativo e o paclitaxel foi utilizado como controle positivo. As células foram expostas por 24 h aos tratamentos. Em seguida, os poços foram lavados com PBS e foi adicionado meio de cultivo. O meio foi repostado a cada 3 dias. Após 7 dias, o meio foi aspirado, as células foram fixadas e coradas com cristal violeta. As fotografias foram feitas utilizando lupa. Para análise, foi utilizado o programa *ImageJ* versão 1.54i com o *plugin ColonyArea* para o processamento das imagens (Guzmán *et al.*, 2014). O software GIMP (versão 2.10.38) foi utilizado para calcular a porcentagem de área ocupada pelas colônias em cada poço. Os experimentos foram realizados em triplicata e em dois experimentos independentes.

4.7. Ensaio de migração celular

Para observar se as moléculas possuem a capacidade de inibir a migração celular, foi realizado o ensaio de migração celular. As células MCF-7 foram semeadas em placas de 48 poços na concentração de 5×10^5 células/mL e

cultivadas para se obter uma monocamada confluyente de células. Em seguida, foram realizadas “feridas” e as células desprendidas foram removidas com PBS (1x). Posteriormente, foi adicionado meio de cultura juntamente com as moléculas nas concentrações da $\frac{1}{2}$ IC₅₀ e IC₅₀. Para o controle negativo foi utilizado RPMI 1640 sem SFB, o controle positivo de migração foi utilizado RPMI com 10% de SFB. A ferida foi fotografada no mesmo ponto de vista em microscópio óptico invertido (XD-202, Nexcope™, China) na objetiva de 40x, nos tempos 0 e 48 h. A área das feridas foi mensurada através do programa *ImageJ* versão 1.54i. O cálculo do percentual de fechamento da ferida foi feito a partir da seguinte fórmula:

$$\% \text{ fechamento da ranhura} = [A(0) - A(t)/A(0)] \times 100$$

Onde a área da ferida no tempo zero (A0) e a área após 48h de incubação (At) foram utilizadas para calcular a porcentagem de fechamento, ou seja, migração celular (Treloar; Simpson, 2013).

4.8. Avaliação das propriedades toxicológicas *in silico*

A predição da toxicidade dos ligantes foi avaliada utilizando a plataforma ProTox 3.0, que é uma ferramenta *in silico* que combina similaridade molecular, farmacóforos, propensões a fragmentos e aprendizado de máquina para chegar a uma previsão precisa dos perfis de toxicidade de produtos químicos (Banerjee *et al.*, 2018). O carregamento das estruturas dos ligantes foram feitas usando o formato SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry System*).

4.9. Análises estatísticas

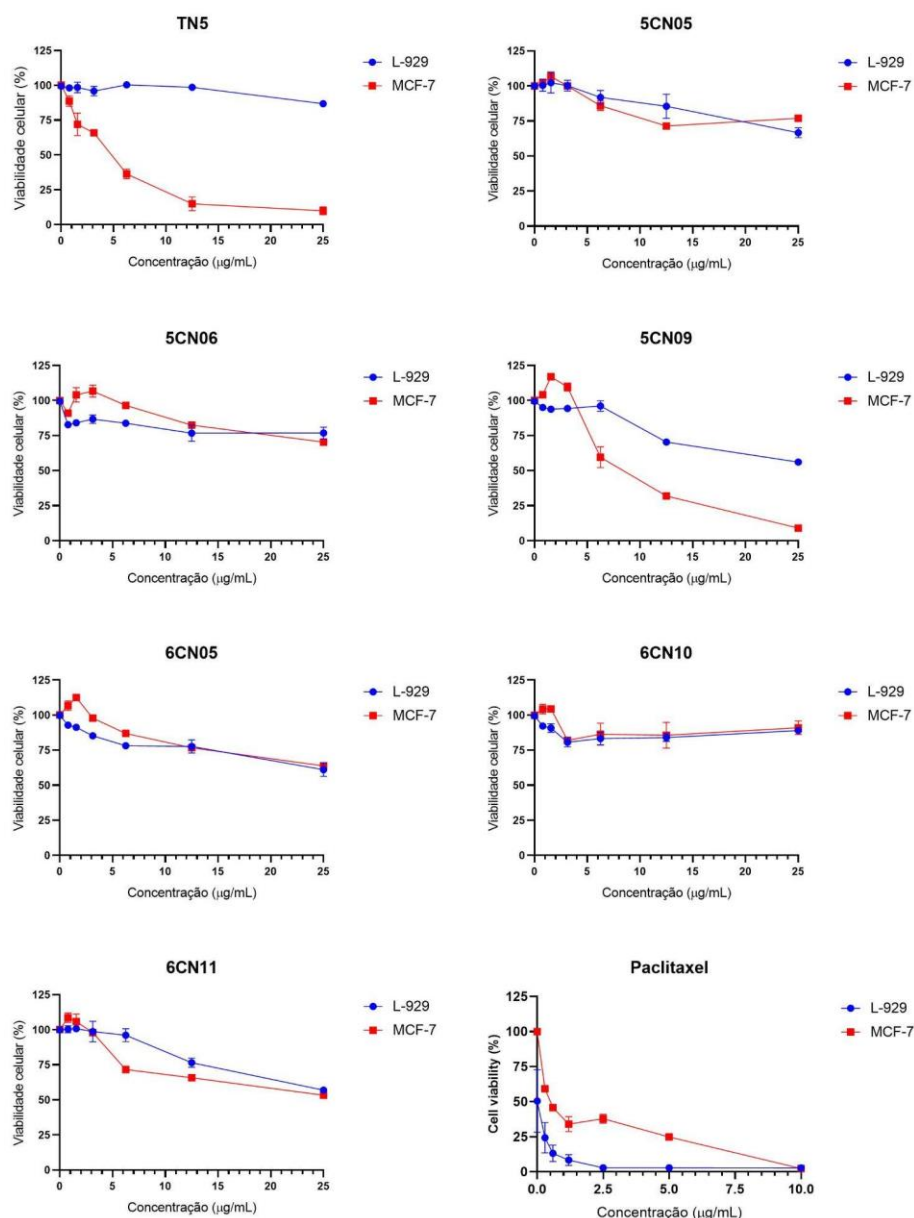
Para a análise dos resultados do ensaio de migração celular e clonogênico os dados dos grupos tratados foram comparados com o controle negativo através do teste ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey. Foi utilizado o *software* GraphPad Prism versão 8.0, e os dados foram considerados significativos para o valor de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Ensaio de citotoxicidade

A triagem citotóxica dos derivados 2-amino-tiofênicos frente às células MCF-7 e L929 foi avaliada em concentrações que variaram de 0,31 a 25 $\mu\text{g/mL}$, para determinar o percentual de inibição celular, conforme mostrado na **Figura 4**.

Figura 4. Percentual de viabilidade celular dos sete compostos em linhagem normal L929 e na linhagem tumoral MCF-7.



Legenda: Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média (SEM).

A partir dos resultados obtidos, foi possível determinar o Índice de Seletividade (IS) dos compostos (**Tabela 4**). Os dados mostram que os compostos 5CN09 e TN5 foram os mais ativos e apresentaram maior seletividade para a linhagem MCF-7, quando comparados com o padrão paclitaxel.

Tabela 4. Atividade citotóxica dos compostos em linhagem celular cancerígena (MCF-7) e normal (L929) e Índice de Seletividade. O paclitaxel foi usado como controle positivo. IS (índice de seletividade) e n.d (não determinado).

Composto	IC ₅₀ (µg/mL)		IS
	L929	MCF-7	
5CN05	>25	>25	n.d
5CN06	>25	>25	n.d
5CN09	>25	8,68 (R ² = 0,93)	2,9
TN5	>25	4,08 (R ² = 0,95)	6,1
6CN05	>25	>25	n.d
6CN10	>25	>25	n.d
6CN11	>25	24,83 (R ² = 0,87)	n.d
Paclitaxel	0,31 (R ² = 0,97)	0,55 (R ² = 0,85)	0,6

O composto 5CN09 apresentou IC₅₀ de 8,68 µg/mL (24 µM) frente à linhagem MCF-7, tendo um SI de 2,9, enquanto o derivado TN5 IC₅₀ de 4,04 µg/mL (14 µM) e SI de 6,1, sendo este mais ativo e seletivo. Segundo Weerapreeyakul *et al.* (2012), compostos que apresentam seletividade superior a 3 são considerados promissores para o tratamento de câncer, uma vez que essa seletividade indica que o composto é pelo menos três vezes mais eficaz em matar células tumorais do que células normais. Os compostos 5CN05, 5CN06, 6CN05 e 6CN10 não apresentaram citotoxicidade em ambas as linhagens celulares testadas, apresentando IC₅₀ acima de 25 µg/mL.

Derivados 2-ATs apresentam atividade anticâncer descrita na literatura e neste estudo reafirmamos o potencial de derivados da classe contra células de câncer de mama. Nossos resultados corroboram com os de Dos Santos *et al.* (2018), os quais observaram que derivados de 2-ATs 2-[(1*H*-indol-3-il-metilideno)-amino]-5,6,7,8-tetrahidro-4*H*-ciclohepta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila (SB-44) e 2-[(5-bromo-1*H*-indol-3-ilmetileno)-amino]-4,5,6,7-tetra-hidrobenzo[*b*]tiofeno-3-carbonitrila

(SB-83) não foram tóxicos para fibroblastos normais, com IC_{50} superior a 75 μ M. Da mesma forma, os derivados SB-44, SB-83 e SB-200 reduziram a viabilidade das células MCF-7, com IC_{50} menor que 30 μ M.

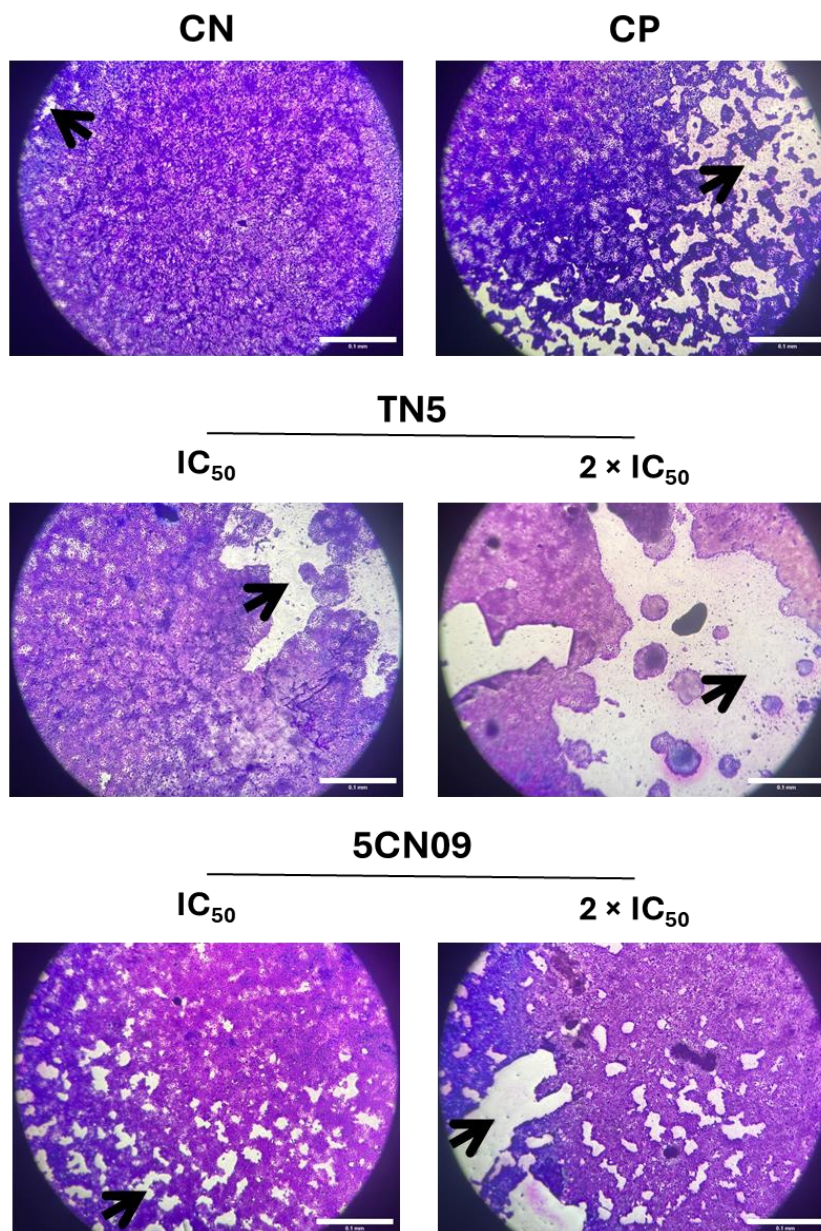
Nossos resultados também corroboram com o estudo conduzido por Doddagaddavalli *et al.* (2024) em híbridos de tiofeno, onde o composto tiofênico (Z)-5-(2,3-diclorobenzilideno)-3-((5-(tiofen-2-il)-1,3,4-oxadiazol-2-il)metil)tiazolidina-2,4-diona (TOT-14) demonstrou atividade antiproliferativa, com IC_{50} no valor de 4,8 μ g/mL, atribuído à captação celular aumentada e à geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células MCF-7.

5.2. Análises morfológicas

A morfologia celular foi analisada por microscopia óptica no tempo de 48h com o intuito de analisar efeitos das substâncias na morfologia das células cancerígenas MCF-7. O controle negativo (CN) apresentou alta densidade celular, células com morfologia típica da linhagem MCF-7, células em mitose, alguns debris celulares, células binucleadas, raras células com vacúolos ou com a presença de micronúcleos (**Figuras 5 e 6**).

Foi observado que as células tratadas com o composto TN5 apresentaram diminuição da confluência celular em todos os tratamentos em relação ao controle negativo. As células tratadas com o composto 5CN09 também apresentaram diminuição da confluência celular em todos os tratamentos (**Figura 5**).

Figura 5. Análise morfológica das células MCF-7, empregando um microscópio óptico invertido com aumento de 40x, para avaliar as alterações celulares induzidas pelo composto TN5.

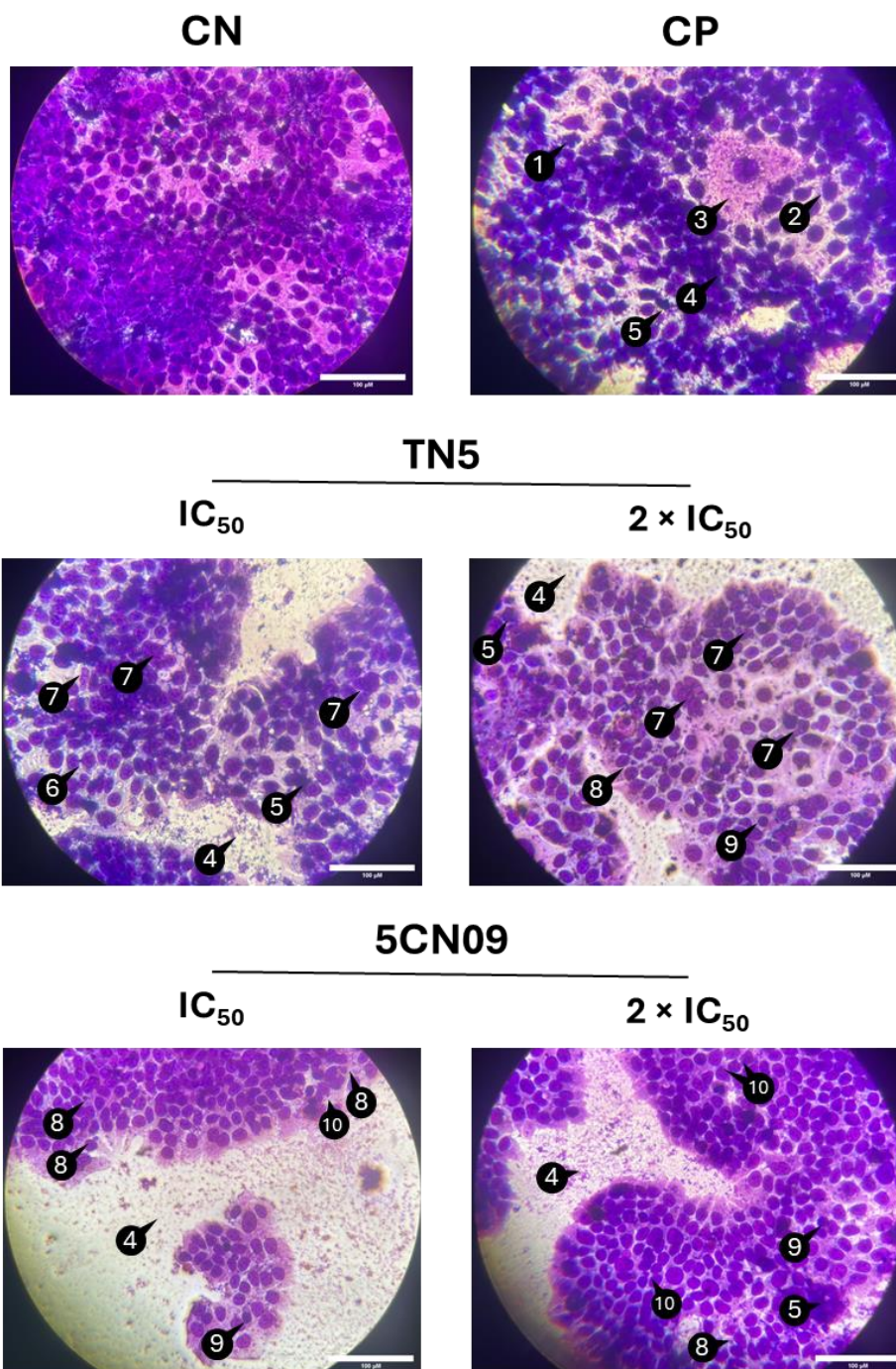


Legenda: As setas pretas indicam a diminuição da densidade celular no poço.

As células tratadas com o composto TN5 na concentração da IC_{50} apresentaram as seguintes alterações: restos celulares, debris, ponte nucleoplasmática e multinucleação. Além disso, alterações semelhantes foram observadas na concentração de $2 \times IC_{50}$, porém de forma mais acentuada. O composto 5CN09 apresentou as seguintes alterações: debris, micronúcleos, condensação de cromatina e brotos celulares, que foram acentuadas com o aumento da concentração (**Figura 6**).

Figura 6. Análise morfológica das células MCF-7, empregando um microscópio óptico invertido com aumento de 400x, para avaliar as alterações celulares induzidas pelo

composto 5CN09.



Legenda: Fragmentação nuclear (1); Perda da estrutura da membrana (2); Célula senescente (3); Restos celulares (4); Debris (5); Ponte nucleoplasmática (6); Multinucleação (7); Micronúcleo (8); Condensação da cromatina (9); Broto celular (10).

De acordo com os resultados, o composto TN5 apresentou células multinucleadas em abundância nas concentrações testadas. Segundo dados da literatura, a multinucleação em células MCF-7 é decorrente da interferência no ciclo

celular ao induzir fusos mitóticos aberrantes, levando à segregação cromossômica prejudicada e à formação de múltiplos núcleos. Essa interrupção na mitose normal resulta em uma parada da fase G2/M, onde as células exibem fusos monopolares e não conseguem passar pelos movimentos de anáfase adequados, levando à geração de células com diversos núcleos unidos em vez de novos núcleos individualizados (Holy, 2002). Assim, o composto TN5 pode ter ação relacionada à interferência no ciclo celular que precisa ser elucidada.

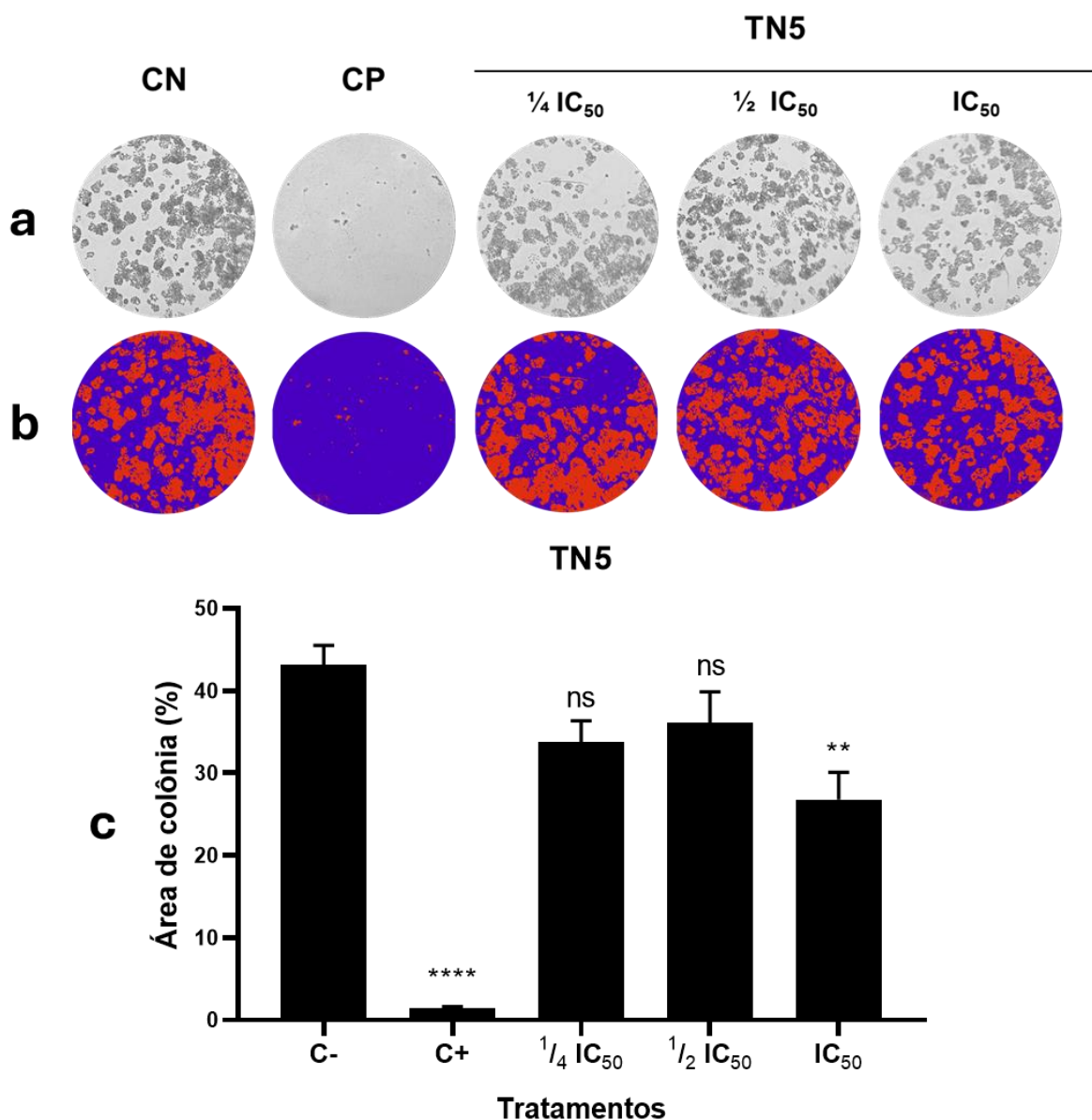
O composto 5CN09 apresentou a indução de micronúcleos e brotos celulares, o que é indicativo de ação genotóxica do composto. Assim, conforme relatado por Franco e colaboradores (2022), os tiofenos são reconhecidos como compostos mutagênicos e genotóxicos capazes de inibir o crescimento de células tumorais por meio de vários mecanismos, incluindo a parada do ciclo celular, principalmente pela inibição da polimerização da tubulina, bem como a indução de estresse oxidativo e danos ao DNA, levando à apoptose (Preya *et al.*, 2017).

Portanto, nossas descobertas ressaltam o potencial dessas moléculas em interferir no ciclo celular e/ou induzir danos ao DNA. Ademais, os compostos possivelmente podem desencadear a via de morte celular por apoptose, entretanto, estas evidências devem ser investigadas em estudos futuros.

5.3. Ensaio clonogênico

No ensaio clonogênico foi verificada a capacidade dos compostos TN5 e 5CN09 em inibir a formação de colônias na linhagem MCF-7. Após 7 dias de tratamento, foi observado $45,3 \pm 2,4\%$ de área de colônias no controle negativo (CN). O composto TN5 inibiu a formação de colônias apenas na concentração da IC_{50} ($4,08 \mu\text{g/mL}$) em relação ao CN, com cerca de $25,6 \pm 3,7\%$ de área formadora de colônias ($p < 0,05$). Enquanto isso, as concentrações $\frac{1}{4} IC_{50}$ ($1,02 \mu\text{g/mL}$) e $\frac{1}{2} IC_{50}$ ($2,04 \mu\text{g/mL}$) não inibiram a formação de clones e apresentaram $30,8 \pm 2,7$ e $37,1 \pm 4,2$ de área formadora de colônia, respectivamente (**Figura 7**).

Figura 7. Representação do ensaio clonogênico do composto TN5.

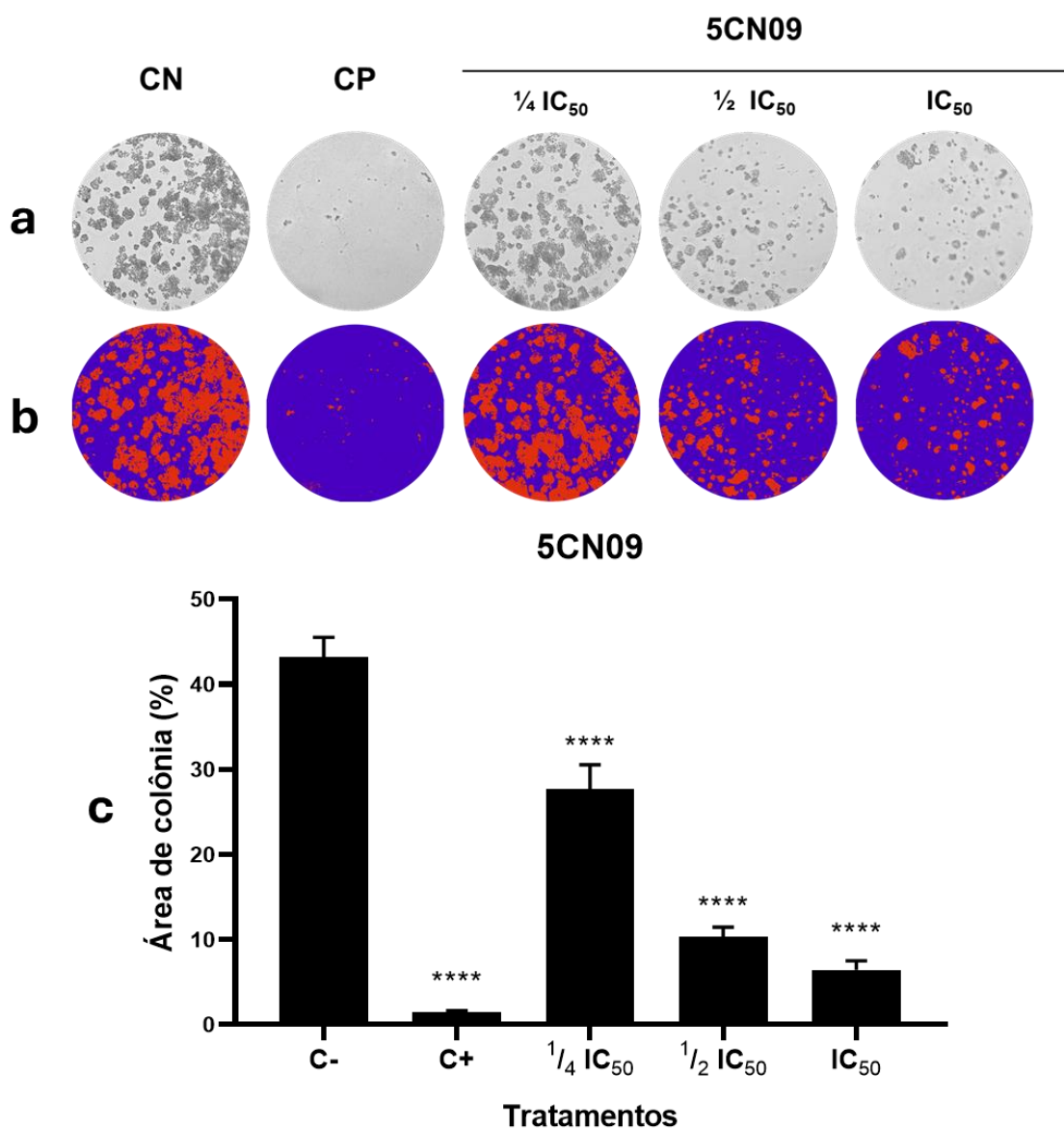


Legenda: As células MCF-7 foram tratadas com o CN (meio de cultura RPMI 1640), CP (0,55 µg/mL de paclitaxel) e TN5 nas concentrações de $\frac{1}{4}$ IC₅₀, $\frac{1}{2}$ IC₅₀ e IC₅₀. (a) representa a formação de colônias. (b) demonstra a quantificação da área de colônia pela cor vermelha. (c) apresenta os percentuais da área de colônia obtidos nos experimentos. Os valores do gráfico estão expressos em média \pm SEM (n=6). Os dados foram comparados com o CN considerando $p < 0,05$ significativo. **** ($p < 0,0001$). ** ($p < 0,05$). ns (não significativo).

O composto 5CN09 inibiu a formação de colônias de forma dose dependente nas concentrações testadas, em relação ao CN ($p < 0,0001$). Nas concentrações de $\frac{1}{4}$ IC₅₀ (2,17 µg/mL), $\frac{1}{2}$ IC₅₀ (4,34 µg/mL) e IC₅₀ (8,68 µg/mL) foram obtidos os seguintes valores de área de formação de colônia $26,9 \pm 3,2$, $10,3 \pm 1,3$ e $6,25 \pm$

0,8, respectivamente (**Figura 8**).

Figura 8. Representação do ensaio clonogênico do composto 5CN09.



Legenda: As células MCF-7 foram tratadas com o CN (meio de cultura RPMI 1640), CP (0,55 μ g/mL de Paclitaxel) e 5CN09 nas concentrações de $\frac{1}{4} IC_{50}$, $\frac{1}{2} IC_{50}$ e IC_{50} . (a) representa a formação de colônias. (b) demonstra a quantificação da área de colônia pela cor vermelha. (c) apresenta os percentuais da área de colônia obtidos nos experimentos. Os valores do gráfico estão expressos em média \pm SEM (n = 6). Os dados foram comparados com o CN considerando $p < 0,05$ significativo. **** ($p < 0,0001$).

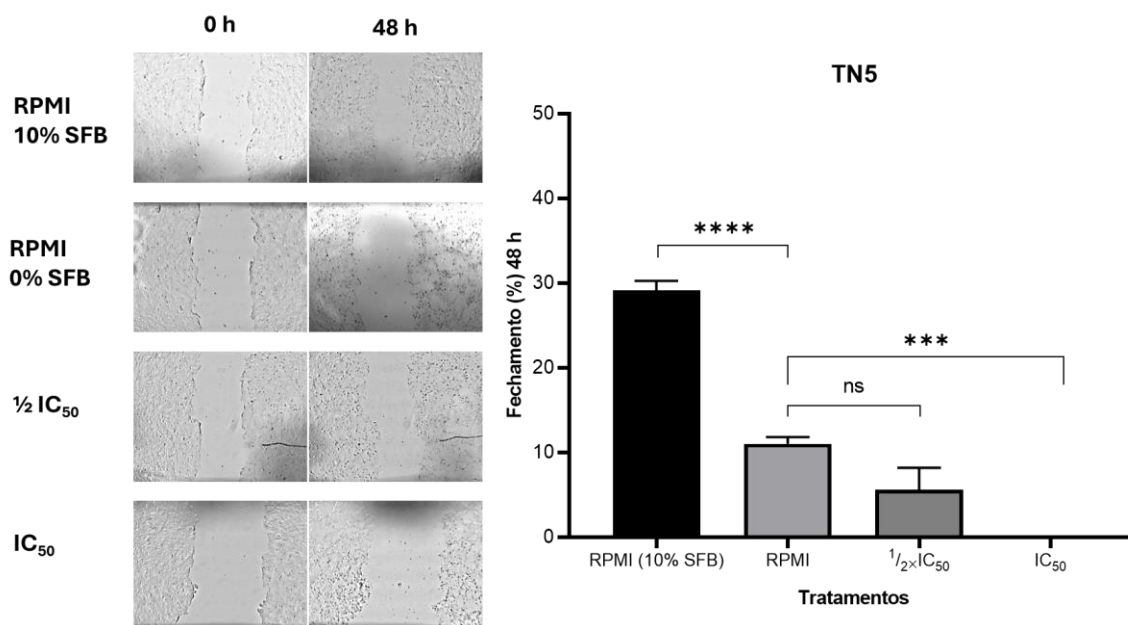
Os 2-amino-tiofenos, TN5 e 5CN09 apresentaram efeitos na inibição da proliferação celular em ensaios clonogênicos, com destaque para o 5CN09. Nossos

resultados corroboram com a investigação feita por Franco *et al.* (2022), que demonstrou compostos tiofênicos apresentam efeitos citotóxicos em várias linhagens celulares de câncer, como MCF-7 e MDA-MB-231, e reduziram a formação de colônias nas linhagens cancerígenas TOv-21G e RKO-AS45-1. Além disso, derivados tiofênicos como o tiofeno-3-carboxamida mostraram potencial como inibidores de VEGFR-2 com propriedades antiangiogênicas no tratamento do câncer de mama. A inibição de VEGFR-2, envolvido na angiogênese, é crucial para o crescimento tumoral, sendo relevante para o ensaio clonogênico. Bloquear VEGFR-2, como no caso do tiofeno-3-carboxamida, limita o suprimento de nutrientes e oxigênio, reduzindo a formação de colônias tumorais e impactando a proliferação celular no ensaio. Por exemplo, o composto 4-(4-clorofenil)-2-{3-[4-(pirrolidin-1-il)butil]ureido}tiofeno-3-carboxamida (14d) mostrou atividade antiproliferativa no ensaio de formação de colônias, apresentando como mecanismo de ação a inibição da quinase VEGFR-2, bloqueando o ciclo celular, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), induzindo apoptose e ligando-se de forma estável ao sítio ativo do VEGFR-2 (Li *et al.*, 2024).

5.4. Ensaio de migração celular

Foi observado que o composto TN5 na concentração da IC_{50} inibiu a migração de células MCF-7 ($p = 0,0001$) em comparação com controle (tratado com meio RPMI com 0% de SFB) (**Figura 9**).

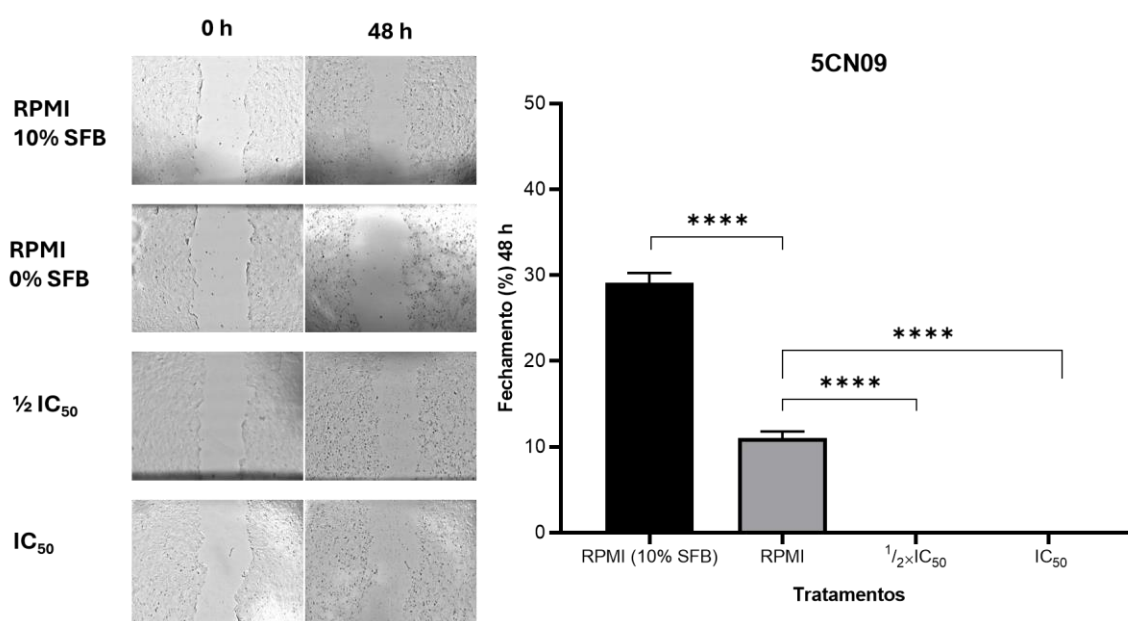
Figura 9. Avaliação da inibição da migração celular do composto TN5 em células da linhagem MCF-7 usando diferentes condições de tratamento. As imagens foram capturadas em duas condições de tempo: 0 horas e 48 horas após o início do tratamento.



Legenda: Os resultados estão apresentados em média \pm SEM. (****) $p < 0,0001$; (***) $p = 0,0001$; (ns) não significativo.

A **Figura 10** mostra o efeito do composto 5CN09 na migração das células MCF-7. A adição do composto 5CN09 em diferentes concentrações ($\frac{1}{2}$ IC₅₀ e IC₅₀) inibiu a migração celular ($p < 0,0001$) em comparação com as células tratadas apenas com o meio RPMI com 0% de SFB.

Figura 10. Avaliação da inibição da migração celular do composto 5CN09 em células da linhagem MCF-7. As imagens foram capturadas em duas condições de tempo: 0 horas e 48 horas após o início do tratamento.



Legenda: Os resultados estão apresentados em média \pm SEM. (****) $p < 0,0001$.

Nossos resultados corroboram com a literatura, visto que outros derivados 2-ATs, como o composto 2-[(5-bromo-1*H*-indol-3-ilmetileno)-amino]-4,5,6,7-tetra-hidrobenzo[*b*]tiofeno-3-carbonitrila (SB-83), na avaliação da migração celular, inibiu a migração das células MCF-7 (Dos Santos *et al.*, 2018). Ademais, nossos achados apontam semelhanças com o estudo realizado por Li *et al.* (2024), onde o derivado tiofênico 4-(4-clorofenil)-2-{3-[4-(pirrolidin-1-il)butil]ureido}tiofeno-3-carboxamida (14d) inibe a migração celular e formação de tubos em células HUVEC (células endoteliais de veia umbilical humana) de maneira dose-dependente.

Ibrahim *et al.* (2024) também observaram que o derivado tiofênico N-(4-Metoxifenil)-2-(4-(3-oxo-3-(tiofen-2-il)prop-1-en-1-il)fenoxi)acetamida (5c) inibiu a migração de células MCF-7, onde seus efeitos anti-proliferativos foram ligados à sua capacidade de diminuir a atividade das metaloproteinases da matriz (MMP-2 e MMP-9), que são cruciais para a migração e invasão celular.

Dessa forma, a inibição da migração celular em células de câncer de mama é, portanto, importante devido ao seu papel na redução da invasão e metástase, que é uma das principais causas de mortalidade (Cominetti; Alteij; Selistre-De-Araujo, 2019). Assim, segundo Chen *et al.* (2024), a inibição da migração celular pode levar à regulação negativa de enzimas pró-metastáticas, como metaloproteinases de matriz (MMPs) e à modulação de marcadores de transição epitelial-mesenquimal, impedindo assim que a metástase ocorra.

5.5. Predição de toxicidade *in silico*

Na avaliada a predição toxicológica dos compostos TN5 e 5CN09 através da plataforma ProTox 3.0, foi observado que ambos os compostos foram categorizados na classe 4 de toxicidade, com uma DL_{50} de 2000 mg/kg. Esta classificação abrange compostos com DL_{50} variando de 300 a 2000 mg/kg, em uma escala que vai da classe 1 (altamente tóxica – $DL_{50} \leq 5$ mg/kg) até a classe 6 (não tóxica – $DL_{50} > 5000$ mg/kg).

Uma DL_{50} de 2000 mg/kg indica um nível de toxicidade relativamente baixo

para uma substância, sugerindo que ela é mais segura para uso em humanos. A DL_{50} , ou a dose letal necessária para matar 50% de uma população, serve como uma referência na avaliação da eficácia química e segurança de um composto.

A **Tabela 5** mostra os resultados obtidos de análises *in silico* da predição de toxicidade aguda para os TN5 e 5CN09. Adicionalmente, as correspondências de TN5 e 5CN09 foram de 41,42% e 40,15%, respectivamente. A acurácia de ambos foi de 54,26%. É importante ressaltar que a precisão do modelo depende da correspondência entre o composto de entrada com compostos que tem DL_{50} estabelecida, ou seja, as baixas precisões obtidas, associadas a uma similaridade química relativamente baixa, poderiam ser explicadas pelo fato de esses compostos serem parcialmente novos na Química Medicinal.

Tabela 5. Resultados *in silico* de predição da toxicidade aguda, classificação de toxicidade e porcentagem de similaridade e acurácia de cada composto testado.

Molécula	DL_{50} (mg/kg)	Classificação da toxicidade	Similaridade (%)	Acurácia (%)
TN5	2000	4	41,42	54,26
5CN09	2000	4	40,15	54,26

A baixa toxicidade prevista para TN5 e 5CN09 foi apontada no nosso estudo e outros compostos tiofênicos também apresentam baixa toxicidade. Lisboa *et al.* (2019) observaram em experimentos com camundongos da linhagem *Swiss* que o composto 2-((6-cloro-2-metoxi-acridin-9-il)amino)-5,6,7,8-tetrahidro-4*H*-ciclohepta[*b*]-tiofeno-3-carbonitrila (ACS03), derivado 2-AT, apresenta toxicidade apenas na concentração de >5000 mg/kg, indicando baixa toxicidade. Além disso, Rodrigues *et al.* (2018) observaram que o composto tiofênico SB-83 apresenta uma DL_{50} de 2500 mg/kg, demonstrando a baixa toxicidade dos compostos dessa classe.

Acerca das previsões de toxicidade *in silico* foi avaliada em diversos alvos biológicos. A chance de ocorrer toxicidade varia de 0 (pouco provável) a 1 (provável). Valores acima de 0,7 estão significativamente ligados à atividade ou inatividade do composto, dependendo da sua classificação.

Na **Tabela 6**, é apresentado o relatório de toxicidade *in silico* do composto TN5, detalhando suas previsões de toxicidade em diversos alvos biológicos, junto

com a probabilidade associada a cada previsão. Foi observado que o composto TN5 apresentou indicativo de hepatotoxicidade, apesar disso, a probabilidade foi baixa (0.52), indicando que está associada a um perfil de segurança aceitável.

Tabela 6. Relatório de toxicidade *in silico* do composto TN5.

TN5		
Alvo	Predição	Probabilidade
Cardiotoxicidade	Inativo	0.85
Citotoxicidade	Inativo	0.67
Toxicidade clínica	Inativo	0.50
Carcinogenicidade	Inativo	0.61
Hepatotoxicidade	Ativo	0.52
Fosfoproteína (supressor de tumor) p53	Inativo	0.82

Sobre o composto 5CN09, foi visto que ele apresenta indicativo de toxicidade hepática e toxicidade clínica (**Tabela 7**).

Tabela 7. Relatório de toxicidade *in silico* do composto 5CN09.

5CN09		
Alvo	Predição	Probabilidade
Cardiotoxicidade	Inativo	0.61
Citotoxicidade	Inativo	0.55
Toxicidade clínica	Ativo	0.50
Carcinogenicidade	Inativo	0.54
Hepatotoxicidade	Ativo	0.54
Fosfoproteína (supressor de tumor) p53	Inativo	0.76

De acordo com as previsões *in silico*, nenhum dos compostos demonstrou ser ativo para carcinogênese, cardiotoxicidade, citotoxicidade e a fosfoproteína p53. Contudo, no que diz respeito à hepatotoxicidade e a toxicidade clínica, 5CN09, demonstrou atividade. O composto TN5 apenas apresentou hepatotoxicidade.

Apesar de os compostos testados terem demonstrado algum potencial de toxicidade, a probabilidade associada à atividade foi relativamente baixa (inferior a 0.70). Esse valor sugere que, embora os compostos possam apresentar algum efeito tóxico, a magnitude dessa atividade não foi alta, o que é um indicativo positivo em termos de segurança.

A citotoxicidade é importante a ser considerada no desenvolvimento de novos compostos antineoplásicos, onde se busca alta citotoxicidade em células cancerosas e baixa citotoxicidade em linhagens não-cancerosas, ou seja, seletividade. *In silico*, os compostos TN5 e 5CN09 não se mostraram citotóxicos. *In vitro*, os compostos apresentaram citotoxicidade, mas de forma seletiva para a linhagem tumoral, assim como observado em outros derivados tiofênicos de 1,3-tiazol, como 4-Metil-2-(((1-(tiofen-2-il)etilideno)hidrazineilideno]-5-((p-tolildiazenil)tiazol-3(2*H*))-amina (4b) e 1-[3-Amino-4-metil-2-((1-(tiofen-2-il)etilideno)hidrazineilideno]-2,3-di-hidrotiazol-5-il)etan-1-ona (13a), que apresentaram citotoxicidade seletiva para células tumorais MCF-7 (Gomha *et al.*, 2022), os compostos estudados neste trabalho também exibem uma relação de citotoxicidade seletiva, sugerindo um perfil de segurança em células normais, como L929, com IC₅₀ superiores a 25 µM.

Experimentos *in vitro* demonstraram que os derivados amino-tiofênicos apresentam efeitos citotóxicos, particularmente em células HepG2, com um aumento da citotoxicidade dependente do tempo e da dose observados (Broekman *et al.*, 2015). Nesse sentido, a linhagem HepG2 é utilizada como modelo preditivo para estudos de hepatotoxicidade devido à sua origem hepática e capacidade de manter várias funções metabólicas típicas dos hepatócitos (Arzumanian; Kiseleva; Poverennaya, 2021). Este modelo *in vitro* é uma ferramenta para avaliar a toxicidade hepática de novos compostos químicos em fase de desenvolvimento, devido à sua capacidade de refletir as respostas do fígado humano (Quintás; Castell; Moreno-Torres, 2023).

Em experimentos *in vivo*, Graham *et al.* (2008) fizeram a identificação do anel tiofeno do metapirileno como um novo toxicóforo hepático dependente de bioativação. A pesquisa demonstrou que o metapirileno é metabolizado em hepatócitos de ratos, formando intermediários reativos que causam citotoxicidade (Graham *et al.*, 2008).

Portanto, a hepatotoxicidade é um problema que outros pesquisadores já apontaram para derivados de tiofenos ou 2-ATs, assim como foi previsto para os compostos TN5 e 5CN09, sendo necessários estudos posteriores para avaliar a hepatotoxicidade desses compostos *in vitro* e *in vivo*.

Em relação à predição da toxicidade *in silico* do composto 5CN09, ainda são necessários testes em modelos animais para determinar a dose terapêutica ideal e a dose máxima tolerada. Portanto, estudos adicionais são essenciais para estabelecer a segurança e a eficácia dos derivados 2-amino-tiofênicos como potenciais agentes terapêuticos.

6. CONCLUSÃO

- Entre os compostos testados, os compostos 5CN09 e TN5 apresentam citotoxicidade e seletividade para a linhagem MCF-7.
- Os compostos 5CN09 e TN5 induzem alterações morfológicas em MCF-7, sugerindo danos ao DNA, indução de estresse oxidativo e interferência no ciclo celular.
- Os compostos 5CN09 e TN5 diminuíram a formação de colônias na linhagem MCF-7.
- Os compostos 5CN09 e TN5 reduziram a migração da linhagem MCF-7.
- Os estudos *in silico* predizem hepatotoxicidade para os compostos 5CN09 e TN5, portanto, estudos posteriores são indispensáveis para avaliar a segurança desses compostos.

REFERÊNCIAS

ABDELNABY, R. M. et al. In vitro anticancer activity screening of novel fused thiophene derivatives as VEGFR-2/AKT dual inhibitors and apoptosis inducers. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 6, p. 700, 2022.

AGARWAL, M. et al. Design and synthesis of new 2,5-disubstituted-1,3,4-oxadiazole analogues as anticancer agents. **Medicinal Chemistry Research: An International Journal for Rapid Communications on Design and Mechanisms of Action of Biologically Active Agents**, v. 25, n. 10, p. 2289–2303, 2016.

ALALAWY, A. I. et al. Synthesis, molecular modeling, and anticancer activity of new thiophene and thiophene-pyrazole analogues incorporating benzene-sulfonamide moiety as carbonic anhydrase isozymes (CA-IX and CA-XII). **Journal of Molecular Structure**, v. 1295, n. 136609, p. 136609, 2024.

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, n. 3, 1988.

ALSAID, M. S. et al. Anti-breast cancer activity of some novel 1,2-dihydropyridine, thiophene and thiazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 1, p. 137–141, 1 jan. 2011.

ALTEVOGT, P. et al. Perspective – Escape from destruction: how cancer-derived EVs are protected from phagocytosis. **Extracellular vesicles as biomarkers - in pathophysiology, physical education and home office?**, v. 2, n. 1, p. 60–64, 2020.

ALY, H. M. et al. Design and synthesis of some new thiophene, thienopyrimidine and thienothiadiazine derivatives of antipyrine as potential antimicrobial agents. **Eur J Med Chem**, v. 46, n. 9, p. 4566–4572, 1 set. 2011.

ANDERSON, N. M.; SIMON, M. C. The tumor microenvironment. **Current Biology: CB**, v. 30, n. 16, p. R921–R925, 2020.

ARCHNA; PATHANIA, S.; CHAWLA, P. A. Thiophene-based derivatives as anticancer agents: An overview on decade's work. **Bioorganic Chemistry**, v. 101, n. 104026, p. 104026, 2020.

ARZUMANIAN, V. A.; KISELEVA, O. I.; POVERENNAYA, E. V. The curious case of the HepG2 cell line: 40 years of expertise. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, p. 13135, 2021.

ASHOK, A. et al. 6,7-dimethoxy-quinazolin-4-yl-amino-thiophene-2-carboxamides as potent inhibitors of VEGF receptors 1 and 2. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 54, n. 2, p. 1065–1070, 2017.

BADOWSKA-KOZAKIEWICZ, A. M.; BUDZIK, M. P. Immunohistochemical characteristics of basal-like breast cancer. **Contemporary Oncology (Poznan, Poland)**, v. 6, n. 6, p. 436–443, 2016.

BANERJEE, P. et al. ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W257–W263, 2018.

BASSAL, M. A. The interplay between dysregulated metabolism and epigenetics in cancer. **Biomolecules**, v. 13, n. 6, p. 944, 2023.

BIANCONI, E. et al. An estimation of the number of cells in the human body. **Annals of Human Biology**, v. 40, n. 6, p. 463–471, 5 jul. 2013.

BHATIA, A.; KUMAR, Y. Cellular and molecular mechanisms in cancer immune escape: a comprehensive review. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 10, n. 1, p. 41–62, 2014.

BLOWS, F. M. et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: A collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. **PLoS Medicine**, v. 7, n. 5, p. e1000279, 2010.

BOZOROV, K. et al. 2-Aminothiophene scaffolds: Diverse biological and pharmacological attributes in medicinal chemistry. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 140, p. 465–493, 21 set. 2017.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2018**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2019.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2023**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2022.

BRAULT, L. et al. New thiophene analogues of kenpaullone: synthesis and biological evaluation in breast cancer cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, n. 8, p. 757–763, 2005.

BROEKMAN, M. M. T. J. et al. Allopurinol and 5-aminosalicylic acid influence thiopurine-induced hepatotoxicity in vitro. **Cell Biology and Toxicology**, v. 31, n. 3, p. 161–171, 2015.

BROWN, J. S. et al. Updating the definition of cancer. **Molecular cancer research: MCR**, v. 21, n. 11, p. 1142–1147, 2023.

BUITRAGO, F. et al. Prognostic factors in breast cancer. **Com. Ciências Saúde**, 22 Sup, v. 1, p. 69–82, 2011.

CASTILLO-TOBIÁS, I. et al. Fundamental considerations of targeted drug therapies for breast cancer. **Future Pharmacology**, v. 3, n. 4, p. 686–707, 2023.

CELEBIOGLU, H. U. et al. Cytotoxic effects, carbonic anhydrase isoenzymes, α -glycosidase and acetylcholinesterase inhibitory properties, and molecular docking studies of heteroatom-containing sulfonyl hydrazone derivatives. **Journal of Biomolecular Structure & Dynamics**, v. 39, n. 15, p. 5539–5550, 2021.

CIRQUEIRA, Magno Belém et al. Subtipos moleculares do câncer de mama. *Femina*, [s. l.], v. 39, n. 10, 2011. Disponível em: <<http://files.bvs.br/upload/S/0100-7254/2011/v39n10/a2965.pdf>>. Acesso em: 4 jun. 2024.

CHATURBHUIJ, G. U. et al. Truly catalytic Gewald synthesis of 2-aminothiophenes using piperidinium borate (pip borate), a conjugate acid–base pair. **SynOpen**, v. 07, n. 04, p. 674–679, 2023.

CHEN, Y. C. et al. Inhibition of tumor migration and invasion by fenofibrate via suppressing epithelial-mesenchymal transition in breast cancers. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 483, n. 116818, p. 116818, 2024.

COMINETTI, M. R.; ALTEI, W. F.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. Metastasis inhibition in breast cancer by targeting cancer cell extravasation. **Breast cancer (Dove Medical Press)**, v. 11, p. 165–178, 2019.

COSKUN, G. P. et al. Discovery of novel thiophene/hydrazones: In vitro and in silico studies against pancreatic cancer. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 5, p. 1441, 2023.

CROSS, K. P. et al. Use of in silico protocols to evaluate drug safety. Em: **QSAR in Safety Evaluation and Risk Assessment**. [s.l.] Elsevier, 2023. p. 339–349.

DA COSTA VIEIRA, R. A. et al. Breast cancer screening in developing countries. **Clinics (Sao Paulo, Brazil)**, v. 72, n. 4, p. 244–253, 2017.

DA SILVA, E. D. L. et al. Genotoxicity and anticancer effects of the aminothiophene derivatives SB-44, SB-83, and SB-200 in cancer cells. **Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 12, p. 1447–1456, 2023.

DAKAL, T. C. et al. Oncogenes and tumor suppressor genes: functions and roles in cancers. **MedComm**, v. 5, n. 6, 2024.

DALLEMAGNE, P. et al. Synthesis and biological evaluation of cyclopenta [c]thiophene related compounds as new antitumor agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 7, p. 2185–2191, 2002.

DANTAS DE ARAÚJO SANTOS CAMARGO, J. et al. Mortality due to breast cancer in a region of high socioeconomic vulnerability in Brazil: Analysis of the effect of age-period and cohort. **PloS One**, v. 16, n. 8, p. e0255935, 2021.

D'ARIENZO, A. et al. Toxicity profile of antibody-drug conjugates in breast cancer: practical considerations. **EClinicalMedicine**, v. 62, n. 102113, p. 102–113, 2023.

DARWISH, D. G. et al. A decade's overview of 2-aminothiophenes and their fused analogs as promising anticancer agents. **Archiv der Pharmazie**, v. 357, n. 6, 2024.

DAS, B. et al. Genomic instability and DNA repair in cancer. Em: BEHZADI, P. (Ed.). **DNA - Damages and Repair Mechanisms**. Londres, Inglaterra: IntechOpen, 2021.

DE ANDRADE, J. K. F. et al. Anticancer activity of β -Lapachone derivatives on human leukemic cell lines. **Chemico-biological interactions**, v. 365, n. 110057, p. 110057, 2022.

DE LEMOS, L. L. P. et al. Stage at diagnosis and stage-specific survival of breast cancer in Latin America and the Caribbean: A systematic review and meta-analysis. **PloS One**, v. 14, n. 10, p. e0224012, 2019.

DE VASCONCELOS, A. et al. Cytotoxic and apoptotic effects of chalcone derivatives of 2-acetyl thiophene on human colon adenocarcinoma cells. **Cell biochemistry and function**, v. 31, n. 4, p. 289–297, 2013.

DESMEDT, C. et al. Development and validation of gene expression profile signatures in early-stage breast cancer. **Cancer Investigation**, v. 27, n. 1, p. 1–10, 2009.

DHANISHA, S. S.; CHANDRASEKHARAN, G. Molecular principles of tissue invasion and metastasis. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 324, n. 5, p. C971–C991, 2023.

DODDAGADDAVALLI, M. A. et al. New thiophene-1,3,4-oxadiazole-thiazolidine-2,4-dione hybrids: Synthesis, MCF-7 inhibition and binding studies. **Bioorganic chemistry**, v. 143, n. 107003, p. 107003, 2024.

DOS SANTOS, F. A. et al. Anticancer properties of thiophene derivatives in breast cancer MCF-7 cells. **Anti-cancer drugs**, v. 29, n. 2, p. 157–166, 2018.

DUTTA, S. et al. Targets of immune escape mechanisms in cancer: Basis for development and evolution of cancer immune checkpoint inhibitors. **Biology**, v. 12, n. 2, p. 218, 2023.

DUVAUCHELLE, V. et al. Recent contribution of medicinally active 2-aminothiophenes: A privileged scaffold for drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, p. 114502, jun. 2022.

DZOBO, K. et al. The tumor microenvironment in tumorigenesis and therapy resistance revisited. **Cancers**, v. 15, n. 2, p. 376, 2023.

ELBAKARY, N. M. et al. New thiophene derivative augments the antitumor activity of γ -irradiation against colorectal cancer in mice via anti-inflammatory and pro-apoptotic pathways. **Discover. Oncology**, v. 13, n. 1, 2022.

EL-SHARKAWY, K. A. et al. New approaches for the synthesis N-alkylated Benzo[b]thiophene derivatives together with their antiproliferative and molecular docking studies. **Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 12, p. 1429–1446, 2023.

ENGLER, C. et al. Assessment of breast density in women from different regions of Brazil. **Heliyon**, v. 7, n. 6, p. e07198, 2021.

FARES, J. et al. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 5, n. 1, p. 1–17, 2020.

FEITELSON, M. A. et al. Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. **Seminars in cancer biology**, v. 35, n. Suppl, p. S25–S54, 2015.

FENG, Y. et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. **Genes & Diseases**, v. 5, n. 2, p. 77–106, jun. 2018.

FERREIRA, A. DE S. S. et al. Breast cancer survival and the health system in Brazil: an analysis of public and private healthcare. **Frontiers in Oncology**, v. 13, 2023.

FIRMINO, G. DOS S. S. et al. In vitro assessment of the cytotoxicity of Gallium (III) complexes with Isoniazid-Derived Hydrazones: Effects on clonogenic survival of HCT-116 cells. **Inorganica chimica acta**, v. 497, n. 119079, p. 119079, 2019.

FRANCIES, F. Z. et al. Breast cancer in low-middle income countries: abnormality in splicing and lack of targeted treatment options. **American Journal of Cancer Research**, v. 10, n. 5, p. 1568, 2020.

FRANCO, F. N. et al. Synthetic thiophenes induce chromosomal damage and trigger apoptosis in human cancer cell lines. **European Journal of Medicinal Chemistry Reports**, v. 4, n. 100033, p. 100033, 2022.

GEWALD, K. Heterocyclen aus CH-aciden Nitrilen, VII. 2-Amino-thiophene aus α -Oxo-mercaptanen und methylenaktiven Nitrilen. **Chemische Berichte**, v. 98, n. 11, p. 3571–3577, 1965.

GHONCHEH, M. et al. Incidence and mortality and epidemiology of breast cancer in the world. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP**, v. 17, n. sup3, p. 43–46, 2016.

GIAQUINTO, A. N. et al. Breast cancer statistics, 2022. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 72, n. 6, p. 524–541, 2022.

GIELATA, M. et al. Catulin reporter marks a heterogeneous population of invasive breast cancer cells with some demonstrating plasticity and participating in vascular mimicry. **Scientific reports**, v. 12, n. 1, 2022.

GIORDANO, S. H. Breast Cancer in Men. **New England Journal of Medicine**, v. 378, n. 24, p. 2311–2320, 14 jun. 2018.

GOMHA, S. et al. Synthesis, molecular docking study, and cytotoxic activity against MCF cells of new thiazole–thiophene scaffolds. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 27, n. 14, p. 4639, 2022.

GRAHAM, E. E. et al. Identification of the thiophene ring of methapyrilene as a novel bioactivation-dependent hepatic toxicophore. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 326, n. 2, p. 657–671, 2008.

GRETEN, F. R.; GRIVENNIKOV, S. I. Inflammation and cancer: Triggers, mechanisms, and consequences. **Immunity**, v. 51, n. 1, p. 27–41, 2019.

GULIPALLI, K. C. et al. Synthesis and Anticancer Activity of Thiophene-2-carboxamide Derivatives and In Silico Docking Studies. **Russian Journal of General Chemistry**, v. 89, n. 7, p. 1502–1512, jul. 2019.

GUZMÁN, C. et al. ColonyArea: An ImageJ plugin to automatically quantify colony formation in clonogenic assays. **PloS One**, v. 9, n. 3, p. e92444, 2014.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HANSELMANN, R. G. et al. Origin of Cancer: Cell work is the Key to Understanding Cancer Initiation and Progression. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, 1 mar. 2022.

HARBECK, N. et al. Breast cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, n. 1, 23 set. 2019.

HATTON, I. A. et al. The human cell count and size distribution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 120, n. 39, 2023.

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

HIBINO, S. et al. Inflammation-induced tumorigenesis and metastasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, p. 5421, 2021.

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

HOLY, J. M. Curcumin disrupts mitotic spindle structure and induces micronucleation in MCF-7 breast cancer cells. Mutation research. **Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 518, n. 1, p. 71–84, 2002.

IBRAHIM, N. S. et al. Synthesis, cytotoxicity, anti-inflammatory, anti-metastatic and anti-oxidant activities of novel chalcones incorporating 2-phenoxy-N-arylacetamide and thiophene moieties: induction of apoptosis in MCF7 and HEP2 cells. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, 2024.

IQBAL, N.; IQBAL, N. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in cancers: Overexpression and therapeutic implications. **Molecular Biology International**, v. 2014, p. 1–9, 2014.

ISA, A. Dysregulated metabolism in cancer. **Biomedical Research and Therapy**, v. 9, n. 8, p. 5201–5208, 2022.

JAMES, S. L. et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **Lancet**, v. 392, n. 10159, p. 1789–1858, 2018.

JANG, M.; KIM, S. S.; LEE, J. Cancer cell metabolism: implications for therapeutic targets. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 45, n. 10, p. e45–e45, 2013.

JILDERDA, L. et al. Understanding how genetic mutations collaborate with genomic instability in cancer. **Cells (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 2, p. 342, 2021.

JUSTO, A. F. O. et al. Malignant neoplasm of breast in Brazilian women: A cross-sectional study from 2008 to 2019. **Journal of the National Medical Association**, v. 115, n. 1, p. 38–45, 2023.

KIM, S. K.; CHO, S. W. The evasion mechanisms of cancer immunity and drug intervention in the tumor microenvironment. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, 2022.

KONG, Y. et al. Regulation of senescence in cancer and aging. **Journal of Aging Research**, v. 2011, p. 1–15, 2011.

KORTLEVER, R. M. **Escaping growth arrest in cancer**. [s.l.] Utrecht University, 2008.

KUMAR SINGH, P.; SILAKARI, O. *In silico* guided development of imine-based inhibitors for resistance-deriving kinases. **Journal of Biomolecular Structure & Dynamics**, v. 37, n. 10, p. 2593–2599, 2019.

LEE, J.; PELLEGRINI, M. V. **Biochemistry, Telomere And Telomerase**. [s.l.] StatPearls Publishing, 2022.

LI, T. et al. Discovery of novel thiophene-3-carboxamide derivatives as potential VEGFR-2 inhibitors with anti-angiogenic properties. **Bioorganic chemistry**, v. 147, n. 107358, p. 107358, 2024.

LIBERTI, M. V.; LOCASALE, J. W. The Warburg effect: How does it benefit cancer cells? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 3, p. 211–218, 2016.

LISBOA, T. et al. Toxicity and antitumor activity of a thiophene–acridine hybrid. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 1, p. 64, 2019.

LIU, J. et al. In silico off-target profiling for enhanced drug safety assessment. **Acta pharmaceutica Sinica**, B, v. 14, n. 7, p. 2927–2941, 2024.

LIU, Z. L. et al. Angiogenic signaling pathways and anti-angiogenic therapy for cancer. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 8, n. 1, p. 1–39, 2023.

LUGANO, R. et al. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. **Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS**, v. 77, n. 9, p. 1745–1770, 2020.

MAACHA, S. et al. Extracellular vesicles-mediated intercellular communication: roles in the tumor microenvironment and anti-cancer drug resistance. **Molecular Cancer**, v. 18, n. 1, 2019.

MADU, C. O. et al. Angiogenesis in breast cancer progression, diagnosis, and treatment. **Journal of Cancer**, v. 11, n. 15, p. 4474–4494, 2020.

MAJIDPOOR, J.; MORTEZAEE, K. Angiogenesis as a hallmark of solid tumors - clinical perspectives. **Cellular Oncology**, v. 44, n. 4, p. 715–737, 2021.

MAKSYMOWICZ, M. et al. Adverse effects in the management of breast cancer – recent studies. **Journal of Education, Health and Sport**, v. 37, n. 1, p. 11–24, 5 jun. 2023.

MANSOORI, B. et al. The different mechanisms of cancer drug resistance: A brief review. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 7, n. 3, p. 339–348, 2017.

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

MASOOD, S. Breast cancer subtypes: Morphologic and biologic characterization. **Women's health (London, England)**, v. 12, n. 1, p. 103–119, 2016.

MASSAGUÉ, J.; OBENAU, A. C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. **Nature**, v. 529, n. 7586, p. 298–306, 2016.

MEHROTRA, S.; MITTRA, I. Origin of genome instability and determinants of mutational landscape in cancer cells. **Genes**, v. 11, n. 9, p. 1101, 2020.

MEIRSON, T. et al. Invasion and metastasis: the elusive hallmark of cancer. **Oncogene**, v. 39, n. 9, p. 2024–2026, 2020.

MOHAMMAD, R. M. et al. Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, n. 0, p. S78–S103, 2015.

MOON, J. J. et al. Role of genomic instability in human carcinogenesis. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 244, n. 3, p. 227–240, 2019.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

NASR, T. et al. Design, synthesis, antimicrobial evaluation and molecular docking studies of some new thiophene, pyrazole and pyridone derivatives bearing sulfoxazole moiety. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 84, p. 491–504, set. 2014.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Cancer Types**. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/types>>. Acesso em: 2 abr. 2024.

NEOPHYTOU, C. M. et al. The role of tumor microenvironment in cancer metastasis: Molecular mechanisms and therapeutic opportunities. **Cancers**, v. 13, n. 9, p. 2053, 2021.

NGUYEN, T. B. et al. Base-catalyzed three-component reaction of α -cyanoacetates with chalcones and elemental sulfur: Access to 2-aminothiophenes unobtainable via the Gewald reaction. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 86, n. 14, p. 9418–9427, 2021.

OBIDIRO, O.; BATTOGTOKH, G.; AKALA, E. O. Triple negative breast cancer treatment options and limitations: Future outlook. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 7, 2023.

OLIVEIRA, P. A. et al. Chemical carcinogenesis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 4, p. 593–616, 2007.

ORAMAS, D. M.; BELL, D.; MIDDLETON, L. P. Sinonasal analogue HPV related breast multiphenotypic carcinoma, a report of a case with the first description in the breast. **Diagnostic Pathology**, v. 15, n. 1, 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Câncer de mama. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>>. Acesso em: 9 abr. 2024.

PALMIERI, G. et al. Genetic instability markers in cancer. Em: **Biomarkers for Immunotherapy of Cancer**. New York, NY: Springer New York, 2020. v. 2055p. 133–154.

PASCALE, R. M. et al. The Warburg effect 97 years after its discovery. **Cancers**, v. 12, n. 10, p. 2819, 2020.

PRAT, A. et al. Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. **The Oncologist**, v. 18, n. 2, p. 123–133, 2013.

PREYA, U. H. et al. The natural terthiophene α -terthienylmethanol induces S phase cell cycle arrest of human ovarian cancer cells via the generation of ROS stress. **Chemico-biological Interactions**, v. 272, p. 72–79, 2017.

PUTEROVA, Z.; KRUTOŠÍKOVÁ, A.; VÉGH, D. Gewald reaction: synthesis, properties and applications of substituted 2-aminothiophenes. **ARKIVOC**, v. 2010, n. 1, p. 209–246, 2010.

QUINTÁS, G.; CASTELL, J. V.; MORENO-TORRES, M. The assessment of the potential hepatotoxicity of new drugs by in vitro metabolomics. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, 2023.

RASHID, S. Carcinogenesis. Em: **Cancer and Chemoprevention: An Overview**. Singapore: Springer Singapore, 2017. p. 21–25.

RATNANI, S. et al. Applications of choline chloride-based deep eutectic solvents as sustainable media and catalyst in the synthesis of heterocyclic scaffolds. **Current Organic Chemistry**, v. 26, n. 8, p. 745–755, 2022.

RAVI, S. et al. An update to hallmarks of cancer. **Cureus**, v. 14, n. 5, 2022.

REIS-FILHO, J. S. et al. Molecular profiling: Moving away from tumor philately. **Science Translational Medicine**, v. 2, n. 47, 2010.

RIBATTI, D.; TAMMA, R.; ANNESE, T. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: A historical overview. **Translational Oncology**, v. 13, n. 6, p. 100773, 2020.

RIVERA, L. et al. Escape mechanisms from antiangiogenic therapy: An immune cell's perspective. Em: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. New York, NY: Springer New York, 2014. p. 83–99.

RODRIGUES, K. A. DA F. et al. SB-83, a 2-Amino-thiophene derivative orally bioavailable candidate for the leishmaniasis treatment. **Biomedecine & pharmacotherapie [Biomedicine & pharmacotherapy]**, v. 108, p. 1670–1678, 2018.

ROGOVA, A. et al. Synthesis of thieno[3,2-e]pyrrolo[1,2-a]pyrimidine derivatives and their precursors containing 2-aminothiophenes fragments as anticancer agents for therapy of pulmonary metastatic melanoma. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 254, n. 115325, p. 115–325, 2023.

ROMAGNOLI, R. et al. Design, synthesis and biological evaluation of 3,5-disubstituted 2-amino thiophene derivatives as a novel class of antitumor agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 18, p. 5097–5109, 1 set. 2014.

ROSLAN, N. et al. *In silico* study of thiourea derivatives as potential epidermal growth factor receptor inhibitors. **Journal of Computational Biophysics and Chemistry**, v. 22, n. 04, p. 453–472, 2023.

ROY, A. M. et al. A review of treatment options in HER2-low breast cancer and proposed treatment sequencing algorithm. **Cancer**, v. 129, n. 18, p. 2773–2788, 2023.

SCHIFFMANN, L. M. et al. Resistance mechanisms of the metastatic tumor microenvironment to anti-angiogenic therapy. **Frontiers in Oncology**, v. 12, 2022.

SCHMITT, C. et al. Design and synthesis of a library of lead-like 2,4-bisheterocyclic substituted thiophenes as selective Dyrk/clk inhibitors. **PloS One**, v. 9, n. 3, p. e87851, 2014.

SEBASTIAN, W. et al. Genetics, treatment, and new technologies of hormone receptor-positive breast cancer. **Cancers**, v. 15, n. 4, p. 1303, 2023.

SEVER, R.; BRUGGE, J. S. Signal transduction in cancer. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 5, n. 4, p. a006098–a006098, 2015.

SHAH, R.; VERMA, P. K. Therapeutic importance of synthetic thiophene. **Chemistry Central Journal**, v. 12, n. 1, 2018.

SHALAPOUR, S.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil. **The journal of clinical investigation**, v. 125, n. 9, p. 3347–3355, 2015.

SHARMA, G. N. et al. Various types and management of breast cancer: an overview. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 1, n. 2, p. 109, 1 abr. 2010.

SHARMA, S. et al. Recent advancements in the development of heterocyclic anti-inflammatory agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 200, n. 112438, p. 112438, 2020.

SHULMAN, L. N. et al. Breast cancer in developing countries: Opportunities for improved survival. **Journal of Oncology**, v. 2010, p. 1–6, 2010.

SIDDIQUI, I. A. et al. Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1348, n. 1, p. 20–31, 2015.

SINHA, S. et al. Growth signaling autonomy in circulating tumor cells aids metastatic seeding. **PNAS nexus**, v. 3, n. 2, 2024.

SOTIRIOU, C. et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 18, p. 10393–10398, 2003.

STEWART, B. W. **Mechanisms of carcinogenesis: from initiation and promotion to the hallmarks**. Oxford, England: International Agency for Research on Cancer, 2019.

SUN, H.; DING, Q.; SAHIN, A. A. Immunohistochemistry in the diagnosis and classification of breast tumors. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 147, n. 10, p. 1119–1132, 2023.

TAO, Z. et al. Breast cancer: Epidemiology and etiology. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 72, n. 2, p. 333–338, 2015.

TCHERNEV, G. Apoptotic pathways, cell cycle regulation and cancer progression: Review. **Turkiye Klinikleri Tip Bilimleri Dergisi**, 2009.

TETIK, S. Regulation of energy homeostasis in cancer. **Advances in Pharmacology & Clinical Trials**, v. 7, n. 3, 2022.

THOMAS, J. et al. Pronounced anti-proliferative activity and tumor cell selectivity of 5-alkyl-2-amino-3-methylcarboxylate thiophenes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 132, p. 219–235, 1 maio 2017.

TOMMASI, C. et al. Long-term effects of breast cancer therapy and care: Calm after the storm? **Journal of Clinical Medicine**, v. 11, n. 23, p. 7239, 2022.

TRELOAR, K. K.; SIMPSON, M. J. Sensitivity of edge detection methods for quantifying cell migration assays. **PloS One**, v. 8, n. 6, p. e67389, 2013.

TRYBEK, T. et al. Telomeres and telomerase in oncogenesis (Review). **Oncology Letters**, v. 20, n. 2, p. 1015–1027, 2020.

VALLEJOS, C. S. et al. Breast cancer classification according to immunohistochemistry markers: Subtypes and association with clinicopathologic variables in a Peruvian hospital database. **Clinical Breast Cancer**, v. 10, n. 4, p. 294–300, 2010.

VINAY, D. S. et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, p. S185–S198, 2015.

VODUC, K. D. et al. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 28, n. 10, p. 1684–1691, 2010.

WANG, F. et al. Predictors of breast cancer cell types and their prognostic power in breast cancer patients. **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, 2018.

WANG, Y.; MINDEN, A. Current molecular combination therapies used for the treatment of breast cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 19, p. 11046, 2022.

WEERAPREEYAKUL, N. et al. Evaluation of the anticancer potential of six herbs against a hepatoma cell line. **Chinese Medicine**, v. 7, n. 1, p. 15, 2012.

WEIGELT, B.; BAEHNER, F.L.; REIS-FILHO, J.S. The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. **The Journal of Pathology**, v. 220, n. 2, p. 263–280, 2010.

XIAN ZHANG, P. et al. Fundamentals of the Warburg effect in cancer. **Journal of Nutritional Oncology**, v. 4, n. 3, p. 108–114, 2019.

YAMADA, H. Computational toxicology in drug safety research. Nihon yakurigaku zasshi. **Folia pharmacologica Japonica**, v. 158, n. 1, p. 82–88, 2023.

ZHANG, M. et al. Classification of subgroups with immune characteristics based on DNA methylation in luminal breast cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 21, p. 12747, 2022.

ZHAO, H. et al. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, p. 1–46, 2021.

ZHU, S. et al. Combination therapy of Lox inhibitor and stimuli-responsive drug for mechanochemically synergistic breast cancer treatment. **Advanced healthcare materials**, v. 12, n. 21, 2023.