

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**MELISSA LÚCIA MELO**

**DERIVADO *N*-ACILIDRAZÔNICO (LASSBio-2029) MODULA A  
EXPRESSÃO DE CINASES MITÓTICAS E INIBE A PROLIFERAÇÃO  
DE CÉLULAS MCF-7**

**ALFENAS/MG**

**2022**

**MELISSA LÚCIA MELO**

**DERIVADO N-ACILIDRAZÔNICO (LASSBio-2029) MODULA A  
EXPRESSÃO DE CINASES MITÓTICAS E INIBE A PROLIFERAÇÃO  
DE CÉLULAS MCF-7**

Dissertação de Mestrado apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biociências Aplicadas à Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Marisa Ionta

**ALFENAS/MG**

**2022**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central

Melo, Melissa Lúcia.

Derivado N-acilidrazônico (LASSBio-2029) modula a expressão de cinases mitóticas e inibe a proliferação de células MCF-7 / Melissa Lúcia Melo. - Alfenas, MG, 2022.

70 f.: il. –

Orientador(a): Marisa Ionta.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2022.

Bibliografia.

1. Câncer de mama. 2. Inibição do ciclo celular. 3. Auroras A/B.
4. PLK-1. 5. p21. I. Ionta, Marisa, orient. II. Título.

MELISSA LÚCIA MELO

DERIVADO N-ACILIDRAZÔNICO (**LASSBio-2029**) MODULA A EXPRESSÃO DE  
CINASES MITÓTICAS E INIBE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS MCF-7

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a  
Dissertação apresentada como parte dos  
requisitos para a obtenção do título de Mestre  
Ciências pela Universidade Federal de Alfenas.  
Área de concentração: Biociências Aplicadas à  
Saúde.

Aprovada em: 22 de agosto de 2022  
Profa. Dra. Marisa Ionta  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas  
UNIFAL - MG

Profa. Dra. Graziela Domingues de Almeida Lima  
Instituição: Universidade Universidade  
Federal de Alfenas UNIFAL - MG

Profa. Dra. Flávia Da Ré Guerra  
Instituição: Universidade Universidade  
Federal de Alfenas UNIFAL - MG



Documento assinado eletronicamente por **Marisa Ionta, Professor do Magistério Superior**, em 22/08/2022, às 11:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flávia da Ré Guerra, Professor do Magistério Superior**, em 22/08/2022, às 11:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Graziela Domingues de Almeida Lima, Professor(a) Visitante**, em 22/08/2022, às 13:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0797804** e o código CRC **9574F43B**.

Dedico esta dissertação à Jesus, Nosso Criador, Salvador e Único Intercessor, que está prestes a voltar, com poder e grande glória, para fazer Sua justiça.

## AGRADECIMENTOS

À Deus – Pai, Filho e Espírito Santo – que em Sua imensa grandeza e majestade, é tão misericordioso e me privilegiou com a oportunidade de realizar esse mestrado. Tudo foi possível, graças ao Senhor Jesus Cristo. Este período, dois anos em meio à pandemia, foi de muitas provações e aprendizados. Pude ter uma concepção diferente de vida, caráter e conduta, tanto pessoal quanto profissional, e agradeço imensamente ao Senhor, por me permitir viver essa experiência.

Ao meu marido, Marcello, por todo apoio, carinho, dedicação, paciência e amor. Sem sua ajuda, nossas risadas e choros juntos, parceria, experiências únicas e comunhão com Cristo, seria impossível passar por essa etapa.

À minha família: minha mãe, Angelita, mulher batalhadora, forte, inteligente, íntegra, amorosa e abençoada. Um exemplo de caráter. Meu pai, Júlio; e minhas irmãs: Emily, Marine e Micheli, por todo amor.

Agradeço também meus cunhados, Matheus, Rodolfo e Rodrigo, e cunhadas, Roseara, Patrícia, Solange, sobrinhos, Rafael, Ísis, Saulo e Enzo; à minha sogra, Olívia, e meu sogro, Edvaldo; e aos demais familiares e amigos, que tanto me apoiaram e incentivaram.

Aos meus irmãos na fé, que sempre estiveram orando, se preocupando, participando das alegrias e aflições, com ensinamentos, apoio e um ombro amigo.

À Juliete Pereira, que me apresentou a pesquisa científica e me incentivou a trilhar esse caminho quando eu nem imaginava que isso existia; e à professora doutora Flávia Da Ré Guerra, que me acolheu desde o primeiro dia de graduação, me orientando e ensinando com muita paciência, firmeza e carinho. Vocês foram fundamentais para que eu chegasse até aqui, muito obrigada!

À minha orientadora, professora doutora Marisa Ionta, a quem tenho grande admiração. Obrigada pela dedicação, ensinamentos, paciência e por todo auxílio prestado para a realização deste trabalho.

Aos colaboradores deste trabalho: Rafael Fonseca Miranda, doutora Fernanda P. Pauli, professora doutora Ester Siqueira Caixeta e professor doutor Eliezer J. Barreiro.

Ao meu amigo de laboratório, Rafael Fonseca Miranda, pela paciência,

dedicação e disponibilidade em ajudar. Não tenho palavras para agradecer por tudo o que fez por mim. Sem você não seria possível a execução deste trabalho. Que Deus te abençoe muito e te conceda imensas vitórias!

Ao Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) pela oportunidade oferecida, aos professores do PPGB e à Adriana, secretária do programa, que está sempre à disposição para nos ajudar.

Aos meus colegas do Laboratório de Avaliação de Protótipos Antitumorais (LAPAN), por toda ajuda, paciência e dedicação.

A professora doutora Talita Sarah Mazzoni pelas risadas, companheirismo e apoio a todos do LAPAN.

A todos os outros colegas e professores do LABAInt, em especial à nossa técnica de laboratório, doutora Juliana Ramos Martins, pela integridade de caráter e conhecimentos compartilhados.

E a todos os que, mesmo não mencionados aqui, fizeram parte dessa jornada e contribuíram para que este trabalho pudesse ser concluído.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“[...] Deus deu o conhecimento e a inteligência  
em toda a cultura e sabedoria. [...]”

(BÍBLIA, Daniel 1:17)

## RESUMO

O câncer de mama representa a principal causa de morte por câncer entre as mulheres em todo o mundo. Cerca de 75% de todos os casos diagnosticados são hormônio-positivos, os quais são tratados com terapia hormonal. Entretanto, um percentual considerável dos pacientes mostra-se refratário ou adquire resistência aos fármacos utilizados nos protocolos terapêuticos. Nesse cenário, é muito importante identificar novas substâncias com potencial farmacológico frente ao câncer de mama. Em estudo prévio, uma série de derivados *N*-acilidrazônico foi sintetizada, cujo potencial antiangiogênico foi investigado. Dentre as substâncias testadas, 4 (**LASSBio-2027**, **2028**, **2029**, **2052**) inibiram significativamente a neovascularização em membrana corion-alantoica de embriões de galinha. Considerando que muitos agentes com atividade antiangiogênica mostram-se efetivas em inibir a proliferação de células tumorais, o presente estudo objetivou avaliar a influência dessas substâncias sobre o comportamento proliferativo de células MCF-7, as quais expressam receptores de estrogênio. Os resultados de viabilidade mostraram que **LASSBio-2029** foi o derivado mais ativo. Estudos subsequentes revelaram que essa substância inibe a proliferação de células MCF-7 por induzir bloqueio do ciclo celular. Houve aumento significativo da população G2/M em amostras tratadas com **LASSBio-2029**, com concomitante redução das populações G1 e S. A atividade antiproliferativa de **LASSBio-2029** foi associada à sua capacidade de modular genes que regulam a transição G2/M e progressão pela fase M. Foi observado redução significativa nos níveis de expressão de *CNNB1* (ciclina B), *CDK1*, *AURKA* (Aurora A), *AURKB* (Aurora B) e *PLK1*, enquanto a abundância relativa de RNAm de *CDKN1A* (p21) aumentou nos grupos tratados. **LASSBio-2029** alterou a mecânica do processo de divisão celular levando ao aparecimento de mitoses anormais e de células apoptóticas. Os níveis de expressão de *BCL-2* foram significativamente reduzidos em amostras tratadas com **LASSBio-2029** indicando o envolvimento da via intrínseca no processo de indução de apoptose. Dessa forma, os dados apresentados no presente estudo mostraram que **LASSBio-2029** é uma substância com promissora atividade antitumoral.

**Palavras-chave:** Câncer de mama; inibição do ciclo celular; Auroras A/B; PLK-1; p21.

## ABSTRACT

Breast cancer represents the leading cause of cancer death among women worldwide. Approximately 75% of all diagnosed cases are hormone-positive, which are treated with hormone therapy. However, a considerable percentage of patients are refractory or acquire resistance to drugs used in therapeutic protocols. In this scenario, it is very important to identify new substances with pharmacological potential against breast cancer. In a previous study, a series of *N*-acylhydrazone derivatives was synthesized, and its antiangiogenic potential was investigated. Among tested substances, 4 (**LASSBio-2027**, **2028**, **2029**, **2052**) significantly inhibited neovascularization in chorion-allantoic membrane of chicken embryos. Considering that many agents with antiangiogenic activity are effective in inhibiting the proliferation of tumor cells, the present study aimed to evaluate the influence of these substances on the proliferative behavior of MCF-7 cells, which express estrogen receptors. Results from viability assays showed that **LASSBio-2029** was the most active derivative. Subsequent studies revealed that this substance inhibits the proliferation of MCF-7 cells by inducing cell cycle arrest. There was a significant increase in the G2/M population in samples treated with **LASSBio-2029**, with a concomitant reduction in the G1 and S populations. The antiproliferative activity of **LASSBio-2029** on the MCF-7 cell line was associated with its ability to modulate genes that regulate the G2/M transition and M-phase progression. In MCF-7 cultures treated with **LASSBio-2029**, there was a significant reduction in the expression levels of *CNNB1* (cyclin B), *CDK1*, *AURKA* (Aurora A), *AURKB* (Aurora B) and *PLK1*, while the relative abundance of *CDKN1A* (p21) mRNA was increased in treated group. **LASSBio-2029** altered the mechanics of the cell division process leading to the appearance of abnormal mitoses and apoptotic cells. The expression levels of *BCL-2* were significantly downregulated in samples treated with **LASSBio-2029**, indicating the involvement of the intrinsic pathway in the apoptosis induction process. Thus, the data presented in the present study showed that **LASSBio-2029** is a substance with promising antitumor activity.

**Keywords:** Breast cancer; cell cycle inhibition; Auroras A/B; PLK-1; p21.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Classificação histológica do câncer de mama.....	23
Figura 2 –	Representação esquemática - regulação do ciclo celular.....	27
Figura 3 –	Modelo esquemático - mecanismos regulatórios da transição G2/M.....	28
Figura 4 –	Estruturas químicas das substâncias <b>LASSBio</b> .....	37
Figura 5 –	Viabilidade celular - curvas dose-resposta.....	43
Figura 6 –	Imagens ilustrativas - microscopia de contraste de fase.....	44
Figura 7 –	Análise do ciclo celular.....	45
Figura 8 –	Expressão de <i>CCNB1</i> determinada por qPCR e <i>western blotting</i> .....	46
Figura 9 –	Expressão relativa de <i>CDK1</i> e <i>CDKN1A</i> determinada por qPCR.....	47
Figura 10 –	Expressão de histona H3 fosforilada determinada por <i>western blotting</i> .....	47
Figura 11 –	Frequência de eventos mitóticos.....	48
Figura 12 –	Frequência de células multinucleadas e apoptótica.....	49
Figura 13 –	Abundância relativa de RNAm de <i>AURKA</i> , <i>AURKB</i> e <i>PLK1</i> .....	50
Figura 14 –	Frequência de apoptose determinada pelo ensaio de Anexina V..	51
Figura 15 –	Abundância relativa de RNAm de <i>BAX</i> e <i>BCL-2</i> .....	51
Figura 16 –	Expressão de p-ERK e ERK determinada por <i>western blotting</i> .....	52

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Estimativas de incidência mundial de câncer (2020) considerando o sexo feminino.....	19
Gráfico 2 – Estimativas de incidência mundial de câncer (2020) considerando o sexo masculino.....	20

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estimativas de incidência de câncer, no Brasil, considerando os sexos feminino e masculino.....	20
Tabela 2 – Estimativas de mortalidade por câncer, no Brasil, considerando os sexos masculino e feminino.....	21
Tabela 3 – Especificações dos anticorpos primários usados no estudo.....	40
Tabela 4 – Sequência de bases dos <i>primers</i> utilizados na PCR em tempo real.....	41
Tabela 5 – Valores de IC <sub>50</sub> (μM) de <b>LASSBio-2027, 2028, 2029 e 2052</b> .....	44

## LISTA DE SIGLAS

7-AAD	<i>7-Aminoactinomycin D</i>
A1	<i>Bcl-2 related gene A1</i>
AAL-993	<i>2-[(4-pyridinylmethyl)amino]-N-[3-(trifluoromethyl)phenyl]-benzamide</i>
AKT / PKB	<i>Serine/Threonine Protein Kinase B</i>
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated serine-protein kinase</i>
ATR	<i>Ataxia Telangiectasia and Rad3 related protein</i>
AURK-A	<i>Aurora cinase A</i>
AURK-B	<i>Aurora cinase B</i>
BAD	<i>Bcl-2-associated death promoter</i>
BAK	<i>Bcl-2 homologous antagonist/Killer</i>
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCL-X <sub>L</sub>	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BCL-W	<i>Antiapoptotic bcl-2 family membe</i>
BID	<i>BH3-interacting domain agonist</i>
BMF	<i>Bcl-2 - modifying factor</i>
BOD	<i>Bcl-2 - related Ovarian Death agonist</i>
BIK	<i>Bcl-2 - interacting killer</i>
BIM	<i>Bcl-2 - Interacting Mediator of cell death</i>
BMK-1	<i>Big MAP kinase 1</i>
BRCA-1	<i>Breast cancer type 1 susceptibility protein</i>
CAM	<i>Chroton-allantoic membrane</i>
CCNB1	<i>Cyclin B1</i>
CCND	<i>Cyclin D</i>
CCND1	<i>Cyclin D1</i>
CCNE	<i>Cyclin E</i>
CDC25C	<i>Cell division cycle 25C</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
CDK1/2/4/6	<i>Cyclin-dependent kinase 1/2/4/6</i>
CDI	<i>Carcinoma ductal invasivo</i>
CDIS	<i>Carcinoma ductal <i>in situ</i></i>
CHK1	<i>Checkpoint kinase 1</i>
CHK2	<i>Checkpoint kinase 2</i>
Cip/Kip	<i>CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein</i>
CKIs	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor</i>
CLI	<i>Carcinoma lobular invasivo</i>
CLIS	<i>Carcinoma lobular <i>in situ</i></i>
c-myc	<i>Cellular-myelocitomatosis oncogene</i>
CPC	<i>Chromosome passenger complex</i>
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-fenil-indol</i>
DMEM/F12	<i>Dulbecco's modified essential medium</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DP	<i>Desvio padrão</i>
E1	<i>Estrona</i>
E2	<i>Estradiol</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminescent reagent</i>

EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ER	<i>Estrogen receptor</i>
ERBB 1/2	<i>Growth-factor-binding ectodomain 1/2</i>
ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinases 1/2</i>
FAS	<i>Death Receptor</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FGFR1	<i>Fibroblast growth factor receptor 1</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FOXM1	<i>Forkhead Box M1</i>
GATA	<i>GATA binding protein</i>
HeLa S3	<i>Adenocarcinoma cervical</i>
HER-2	<i>Human epidermal growth factor receptor-type 2</i>
HRK	<i>Bcl-2 family member Harakiri</i>
IC <sub>50</sub>	<i>Inhibitory concentration by 50%</i>
IgG	<i>Immunoglobulin G</i>
JAK/STAT	<i>Janus kinase/signal transducer and transcriptional activator</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
K-RAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue</i>
Ki67	<i>Kiel 67th clone</i>
Ki8751	<i>Kiel 8751th clone</i>
LASSBio	<i>Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas</i>
LASSBio-2026	<i>N'-[3-(Trifluoromethyl)benzylidene]-2-[(3-hydroxy-4-methoxybenzyl)-amino]benzohydrazide</i>
LASSBio-2027	<i>N'-Benzylidene-2-[(3-hydroxy-4-methoxybenzyl)amino]benzo-hydrazide</i>
LASSBio-2029	<i>N'-(4-Chlorobenzylidene)-2-[(3-hydroxy-4-methoxybenzyl)amino]-benzohydrazide</i>
LASSBio-2052	<i>N'-[4-(Trifluoromethyl)benzylidene]-2-[(3-hydroxy-4-methoxybenzyl)amino]benzohydrazide</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCL-1	<i>Myeloid Cell Leukemia 1</i>
MEK 1/2	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 1/2</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MTS	<i>(3-(4,5-dimethyliazol-2-yl)-5-(3-carboximetoifenil)-2-(4-sulfofenil)-2-tetrazolium)</i>
Myt1	<i>Myelin transcription factor 1</i>
NAD+	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NAH	<i>N-acilidrazona</i>
NOXA	<i>Proapoptotic BH3-only member of Bcl-2</i>
p-ERK	<i>Phospho-ERK</i>
PBSA	<i>Phosphate-buffered saline without sodium and magnesium</i>
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>
PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>
PKD1	<i>Phosphoinositide-dependent kinase-1</i>
PI	<i>Propidium Iodide</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3-kinase</i>
PIK3CA	<i>Proapoptotic BH3-only member of Bcl-2</i>
PIP2	<i>Phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate</i>

PIP3	<i>Phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate</i>
PLK1	<i>Polo Like Kinase -1</i>
pRb	<i>Retinoblastoma protein</i>
PR	<i>Progesterone receptor</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homologue</i>
PUMA	<i>P53 upregulated modulator of apoptosis</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene flouride</i>
RAF	<i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma serine/threonine protein kinase</i>
RAS	<i>Rat sarcoma virus protein</i>
RE	<i>Estrogen receptor</i>
RE $\alpha$	<i>Alpha estrogen receptor</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation Assay buffer</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SP	<i>Standard deviation</i>
SRB	<i>Sulforhodamine B</i>
TAM	<i>Tamoxifen</i>
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TCA	<i>Trichloroacetic acid</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TP53	<i>Tumor protein p53</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TSA	<i>Trichostatin A</i>
TTBS	<i>Tween-Tris-buffered saline</i>
VEGF-A	<i>Vascular endothelial growth fator A</i>
VEGFR-2	<i>Vascular endothelial growth fator receptor 2</i>
VEGFs	<i>Vascular endothelial growth factors</i>

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	17
2	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	19
2.1	CÂNCER	19
2.2	CÂNCER DE MAMA	21
2.3	REGULAÇÃO DO CICLO CELULAR	25
2.4	APOPTOSE	29
2.5	VIAS DE SINALIZAÇÃO MAPK E PI3K/AKT	30
2.6	TRATAMENTOS	32
3	<b>OBJETIVOS</b>	35
3.1	OBJETIVO GERAL	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	36
4.1	LINHAGEM CELULAR E CONDIÇÕES DE CULTIVO	36
4.2	OBTENÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS E ESQUEMA DE TRATAMENTO	36
4.3	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	37
4.4	ANÁLISE DA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR	38
4.5	<i>IMMUNOBLOT</i>	38
4.6	RT-qPCR	39
4.7	ENSAIO DE ANEXINA V	41
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
5	<b>RESULTADOS</b>	43
5.1	VIABILIDADE CELULAR	43
5.2	ANÁLISE DE PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR	45
5.3	ANÁLISE DE APOPTOSE	49
5.4	ANÁLISE NO PERFIL DE EXPRESSÃO/ATIVAÇÃO DE <i>ERK</i>	51
6	<b>DISCUSSÃO</b>	52
7	<b>CONCLUSÃO</b>	57
	<b>REFERÊNCIAS</b>	58

## 1 INTRODUÇÃO

Com exceção das doenças cardiovasculares, o câncer é a principal causa de morte no mundo, sendo um grave problema de saúde pública. O câncer de mama é o mais frequente na população feminina, sendo que as estimativas de incidência e mortalidade para 2020 foram, respectivamente, 88.492 e 20.725, conforme dados divulgados pela Agência Internacional de Pesquisa em câncer (IARC, 2022).

Aproximadamente 75% dos cânceres de mama diagnosticados é positivo para receptores de estrogênio (RE+), os quais podem ser tratados pela terapia hormonal (RODRIGUEZ *et al.*, 2019; YAO *et al.*, 2017). Entretanto, cerca de 30-40% dos pacientes apresenta resistência intrínseca ou adquirem resistência ao longo do tratamento (RODRIGUEZ *et al.*, 2019). Dessa forma, é extremamente relevante entender os mecanismos moleculares associados à resistência à terapia endócrina, bem como identificar novas substâncias que possam ser úteis como agentes terapêuticos para o câncer de mama.

O tamoxifeno (TAM) é um modulador seletivo do RE $\alpha$  amplamente utilizado na terapia hormonal, especialmente em mulheres que estão na fase reprodutiva (MESTRES *et al.*, 2017). Estudos mostram que a falta de sensibilidade ao tamoxifeno pode ser decorrente de vários eventos, os quais incluem mutações no RE, mudanças no perfil de expressão e de ativação desse receptor, e ativação de vias alternativas de sinalização que estimulam proliferação e sobrevivência celular (HAYES; LEWIS-WAMBI, 2015; KATZENELLENBOGEN *et al.*, 2018; LUND *et al.*, 2015; RANGANATHAN *et al.*, 2019). Além disso, estudos mostram que há uma correlação inversa entre os níveis de expressão do fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA) e a sensibilidade de células tumorais ao tamoxifeno (AESOY *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2019; QUE *et al.*, 2008; RYDÉN *et al.*, 2005). A expressão de VEGFA pode ser regulada por diferentes mecanismos (CUZZIOL *et al.*, 2020), contudo é bem descrito que a ativação do receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2 (VEGFR2) e, por consequência, a ativação da via MAPK/ERK representa um importante mecanismo que estimula a transcrição de genes que regulam proliferação, invasão e angiogênese (CLAESSON-WELSH; WELSH, 2013; MILLER; SEWELL-LOFTIN, 2021; SADREMOMTAZ *et al.*, 2018). Assim sendo, substâncias capazes de inibir VEGFR2 podem ser úteis como agentes antitumorais.

Em um estudo prévio realizado pelo nosso grupo de pesquisa, uma série de

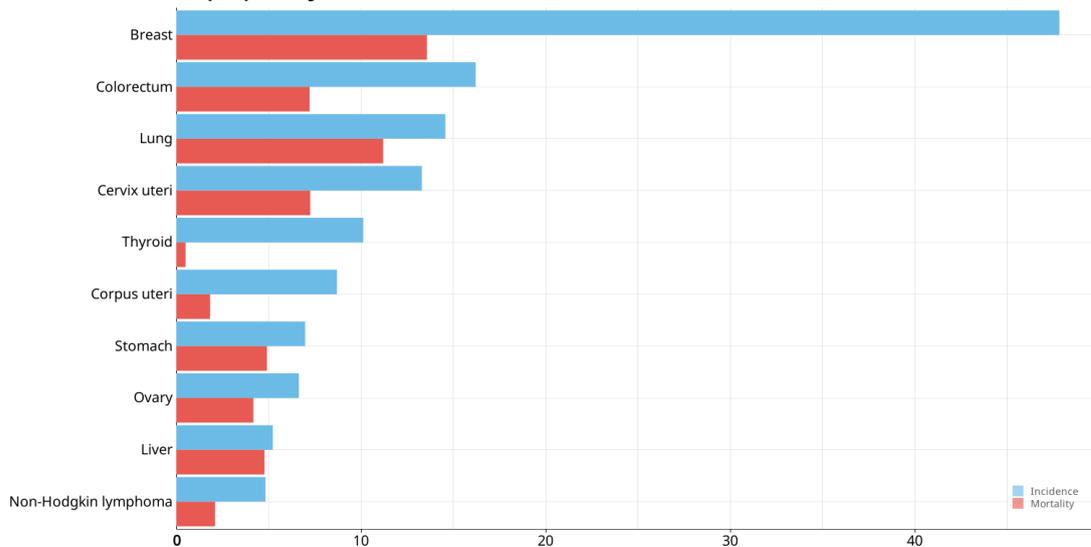
derivados *N*-acilidrazônicos foi planejada, considerando o arcabouço estrutural do AAL-993, um potente inibidor de VEGFR2 e VEGFR3. Ensaio enzimáticos *in vitro* foram realizados, mostrando que todas as substâncias sintetizadas podem inibir a atividade catalítica do VEGFR2, com maior ou menor intensidade. Entretanto, quando as substâncias foram testadas *in vivo*, foi possível notar que apenas quatro delas (**LASSBio-2027**, **LASSBio-2028**, **LASSBio-2029** e **LASSBio-2052**) foram capazes de inibir o eixo VEGFA-VEGFR2, uma vez que a neovascularização em membrana corion-alantóica de embriões de *Gallus gallus domesticus* foi drasticamente reduzida em embriões tratados concomitantemente com VEGFA e as substâncias-teste (PAULI *et al.*, 2020). Dando continuidade as nossas investigações, o presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos dessas substâncias sobre o comportamento proliferativo de células derivadas de câncer de mama (RE+).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CÂNCER

O câncer é a segunda maior causa de morte no mundo, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares, e constitui um problema de saúde pública mundial. De acordo com estimativa mundial mais recente, o câncer de mama ocupa a primeira posição no *ranking* das taxas de incidência e mortalidade na população feminina, seguido pelos cânceres colorretal e de pulmão (GRÁFICO 1); enquanto na população masculina, os cânceres de pulmão e de próstata são os mais incidentes, sendo que o câncer de pulmão é o tipo de câncer que mais faz vítimas nessa população (GRÁFICO 2) (WHO, 2020).

**Gráfico 1** – Taxas de incidência e de mortalidade estimadas no mundo na população feminina em 2020.



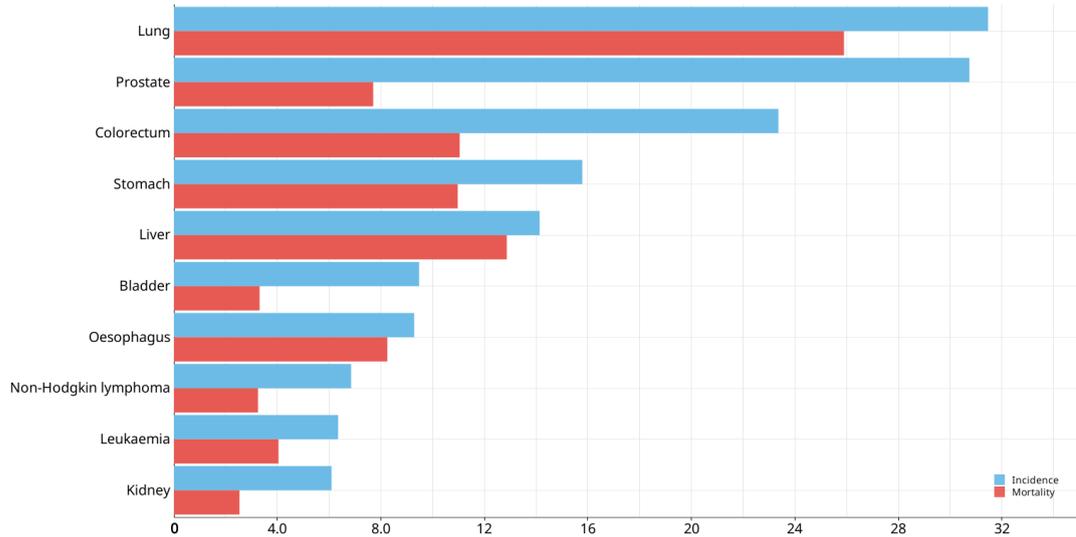
**Fonte:** GLOBOCAN 2020, *International Agency for reasearch on cancer* (IARC).

**Nota:** Barras azuis: Incidência; Barras vermelhas: Mortalidade. Os dados no eixo x são correspondentes a taxa ajustada por idade por 100.000 habitantes.

No Brasil, as estimativas divulgadas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) mostraram que, com exceção dos cânceres de pele do tipo não-melanoma, o câncer de pulmão é o mais incidente na população masculina, seguido pelos cânceres de próstata e cólon/reto, (TABELA 1) (INCA, 2020). Enquanto, na população feminina, os cânceres de mama, colón/reto e cólo de útero ocupam as primeiras posições nas estimativas de incidência (TABELA 1). Os cânceres que mais fazem vítimas no

Brasil são os cânceres de mama e pulmão, respectivamente, nas populações feminina e masculina (TABELA 2) (INCA, 2020).

**Gráfico 2** – Taxas de incidência e de mortalidade estimadas no mundo na população masculina em 2020.



**Fonte:** GLOBOCAN 2020, *International Agency for reasearch on cancer* (IARC).

**Nota:** Barras azuis: Incidência; Barras vermelhas: Mortalidade. Os dados no eixo x são correspondentes a taxa ajustada por idade por 100.000 habitantes.

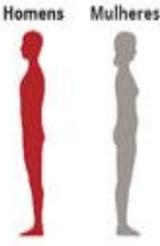
**Tabela 1** – Estimativa de incidência de câncer para 2020 nas populações feminina e masculina, excluindo os dados de câncer de pele do tipo não melanoma\*

Localização primária	Casos	%		Localização primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	<b>Homens</b>  <b>Mulheres</b> 	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e Reto	20.540	9,1%		Cólon e Reto	20.470	9,2%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.760	7,9%		Colo do útero	16.710	7,5%
Estômago	13.360	5,9%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.440	5,6%
Cavidade Oral	11.200	5,0%		Glândula Tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%		Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%		Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%		Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%		Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%		Sistema Nervoso Central	5.230	2,3%

**Fonte:** INCA, 2020.

**Nota:** \*Números arredondados para múltiplos de 10.

**Tabela 2** – Estimativa de mortalidade de câncer para 2020 nas populações feminina e masculina, excluindo os dados de câncer de pele do tipo não melanoma\*

Localização primária	Casos	%		Localização primária	Casos	%
Traqueia, Brônquios e Pulmões	16.009	13,6		Mama	17.825	16,5
Próstata	15.841	13,5		Traqueia, Brônquio e Pulmões	12.609	11,6
Cólon e Reto	9.889	8,4		Cólon e Reto	10.356	9,6
Estômago	8.772	7,5		Colo de útero	6.627	6,1
Esôfago	6.465	5,5		Pâncreas	6.011	5,5
Fígado e Vias biliares intra-hepáticas	6.093	5,2		Estômago	5.078	4,7
Pâncreas	5.882	5,0		Fígado e Vias Biliares intrahepáticas	4.670	4,3
Sistema Nervoso Central	4.787	4,1		Sistema Nervoso Central	4.567	4,2
Cavidade Oral	4.767	4,1		Ovário	3.921	3,6
Laringe	3.896	3,3		Leucemias	3.035	2,8

**Fonte:** INCA, 2020.

**Nota:** \*Números arredondados para múltiplos de 10.

De acordo com os dados do INCA, são estimados 66.280 casos novos de câncer de mama para 2022, o que representa uma taxa ajustada de incidência de 43,74 casos por 100 mil mulheres.

## 2.2 CÂNCER DE MAMA

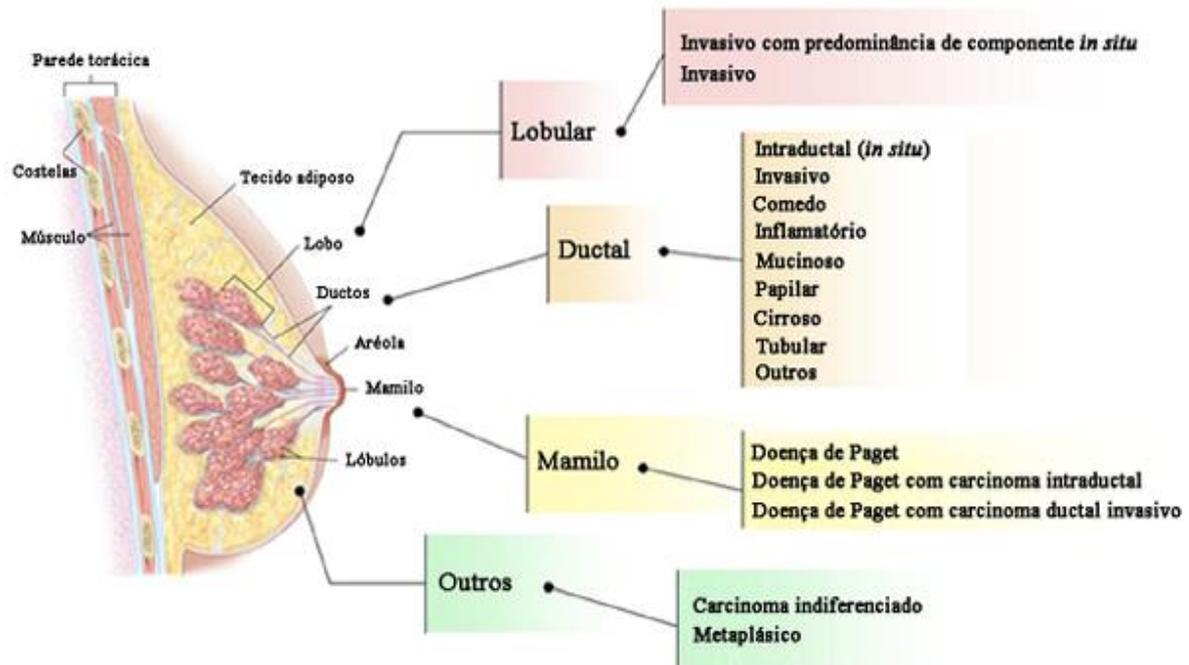
Estudos mostram que o câncer de mama atinge um número maior de mulheres do que de homens (FREEDMAN; PARTRIDGE, 2017). Existem múltiplos fatores que estão associados ao desenvolvimento do câncer de mama, contudo o envelhecimento representa o principal fator de risco. Aproximadamente metade de todos os casos ocorrem em mulheres com idade maior ou igual a 65 anos, e mais de 30% ocorrem em mulheres com mais de 70 anos (INAL *et al.*, 2013). Entretanto, mulheres jovens (idade entre 35 e 45 anos) podem ser acometidas pela doença. Nesse caso, em geral, os tumores exibem alta complexidade e são caracterizados pela alta agressividade (ANASTASIADI *et al.*, 2017; VILLARREAL-GARZA *et al.*, 2016).

O câncer de mama é uma doença complexa, heterogênea, com diversas classificações devido à diferentes características. A proliferação celular descontrolada e capacidade de migração/invasão decorrente de alterações genéticas e epigenéticas são comuns a todos os subtipos e comprometem o comportamento celular, favorecendo recidivas e aparecimento de metástases (HANAHAN; WEINBERG, 2000; HOLEN *et al.*, 2017).

As respostas clínicas frente a um determinado tipo de tratamento podem variar consideravelmente entre os pacientes com câncer de mama. Nesse sentido, muitos estudos têm sido desenvolvidos para entender a relevância clínica da heterogeneidade tumoral, seja referente às diferenças encontradas entre os pacientes que apresentam o mesmo tipo de tumor (heterogeneidade intertumoral) ou por diferenças existentes em tumores do mesmo paciente (heterogeneidade intratumoral) (BEDARD *et al.*, 2013).

A classificação dos diferentes subtipos de tumor de mama tem sido feita de acordo com protocolos bem estabelecidos (VURAL; WANG; GUDA, 2016) e incluem as análises histopatológica, imuno-histoquímica e a análise molecular. Na análise histológica são consideradas as características morfológicas do tumor que exibem diferentes tipos celulares e uma composição variada do estroma (FIGURA 1). Nos ensaios de imuno-histoquímica, as amostras são testadas quanto a presença ou ausência dos receptores de estrogênio, progesterona e HER2, que são considerados importantes marcadores de diagnóstico; e nas análises moleculares, o perfil de expressão gênica de um conjunto de genes, em nível de RNA mensageiro, associados com a regulação de proliferação, sobrevivência, migração e invasão (CSERNI, 2020). As diferenças no perfil de expressão gênica encontradas nos diferentes subtipos tumorais refletem as alterações que ocorreram ao longo do processo de transformação maligna e conferem significativa variação da resposta clínica no que diz respeito a sobrevida total e período livre de recorrência (JABER *et al.*, 2020).

**Figura 1** – Tipos histológicos de câncer de mama.



**Fonte:** LABRE; SANTOS; SADDI, 2018.

De acordo com critérios histopatológicos, os tumores de mama são classificados com base no aspecto morfológico e estrutural da glândula mamária. O tipo mais comum de tumor é o carcinoma ductal invasivo (CDI), sendo observado em cerca de 75% dos casos; enquanto o carcinoma lobular invasivo (CLI) representa 10% dos casos de tumor mama diagnosticados (LI; URIBE; DALING, 2005). Os tumores que apresentam alta atividade proliferativa do epitélio glandular, mas sem indícios de invasão, são classificados como carcinoma *in situ*, que podem ser ductal (CDIS) ou lobular (CLIS) dependendo de sua localização (BECKMANN *et al.*, 1997).

De acordo com os marcadores empregados em ensaios de imunohistoquímica, os tumores de mama têm sido classificados em: a) positivos para receptores estrogênio (RE+), b) positivos para o fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2+), e c) triplo negativo (HOLEN *et al.*, 2017; SUN *et al.*, 2017; WAKS *et al.*, 2019).

Os tumores RE+ são os mais prevalentes e representam cerca de 75-80% dos casos diagnosticados. Dessa forma, os receptores de estrogênio representam importantes alvos terapêuticos (THANG *et al.*, 2022). Os tumores HER+ são diagnosticados em cerca de 15 a 20% dos casos e se caracterizam por apresentarem níveis elevados de expressão de HER2, em relação aos demais

subtipos, e aumentada expressão de genes associados com proliferação (CEJALVO *et al.*, 2018; FERRARI *et al.*, 2016). A alta expressão de HER2 nesse subtipo de tumor está associada à eventos de amplificação do gene ErbB2 (HER2/neu) e/ou eventos epigenéticos que aumentam a taxa de expressão. Os tumores triplo-negativos são caracterizados pela ausência de expressão dos receptores de estrogênio e de progesterona e por não apresentarem superexpressão de HER2, e são tumores altamente invasivos (JIN; MU, 2015; KIM *et al.*, 2017; MAKKI, 2015; VUONG *et al.*, 2014).

As análises histopatológicas e a detecção de biomarcadores nos ensaios de imuno-histoquímica sem sido utilizados rotineiramente na prática clínica para definição de diagnóstico e prognóstico para o câncer de mama. Contudo, esses parâmetros são limitados e não permitem a predição da resposta clínica frente as propostas terapêuticas adotadas. Assim sendo, é necessário conhecer melhor as características moleculares das células malignas, as quais estão envolvidas com a ativação de vias oncogênicas. Assim sendo, a análise do perfil de expressão gênica permite coletar fornecer informações acerca das alterações moleculares que levam a ativação de vias oncogênicas. A análise molecular auxilia, portanto, a compreensão do comportamento clínico e resposta terapêutica dos diferentes tipos de tumor (GODOY-ORTIZ *et al.*, 2019).

A análise de expressão gênica revelou uma variedade maior de subtipos tumorais e representa a base da classificação intrínseca dos tumores de mama. De acordo com a análise molecular, os tumores são classificados em luminal A, luminal B, HER2+, *basal-like*, *claudin-low* e *normal-like*. O subtipo luminal A, expressa ER e PR e baixos níveis de expressão de Ki67, um marcador específico de proliferação celular. O subtipo luminal A é o mais prevalente e representa cerca de 50 a 70% dos cânceres de mama diagnosticados. Esse tipo de tumor é menos agressivo em relação aos demais subtipos e apresenta bom prognóstico. O subtipo luminal B expressa ER e PR, mas tem altos níveis de expressão de Ki67. Esse subtipo é mais agressivo em relação ao luminal A e representa cerca de 15 a 20%. Estudos mostram que há uma maior taxa de recorrência e menor sobrevida em pacientes portadores do subtipo luminal B em relação ao luminal A (PEROU *et al.*, 2000).

O subtipo *basal-like* se refere a um tumor extremamente agressivo, cujas células apresentam alta taxa de proliferação. As taxas de metástases são altas e, em geral os tecidos cerebral e pulmonar são colonizados (HOLEN *et al.*, 2017;

WEIGELT *et al.*, 2010). Aproximadamente 77% destes tumores não expressam os receptores de estrogênio, progesterona e HER2, contudo eles não podem ser considerados equivalentes aos tumores triplo negativos, uma vez que somente 71% dos tumores triplo-negativos tem características moleculares equivalentes ao subtipo *basal-like* que inclui elevada expressão de genes associados à transição epitélio-mesenquimal (ACS, 2019; HOLEN *et al.*, 2017; SUN *et al.*, 2017; WAKS *et al.*, 2019).

O subtipo *claudin-low* é derivado do subtipo *basal-like*, sendo caracterizado pela expressão das claudinas 3/4/7 (WEIGELT *et al.*, 2010). Os tumores que não se encaixam nos padrões descritos anteriormente são denominados de *normal-like* (PEROU *et al.*, 2000; SØRLIE *et al.*, 2001, 2003). Segundo Perou *et al.* (2000), este subtipo apresenta prognóstico intermediário, com elevada expressão de genes comuns às células basais e às células adiposas bem como baixa expressão de genes característicos de células epiteliais luminais. Em geral, os marcadores tumorais usuais não são observados neste tipo de tumor e o comportamento clínico é pouco compreendido (WAKS *et al.*, 2019; WEIGELT *et al.*, 2010).

Atualmente, é possível fazer a análise das características moleculares do tumor por microarranjos de DNA. Entretanto, esse método tem inconsistências que dificultam estratificar os diferentes tipos de tumor devido a variação natural da constituição gênica encontrada em cada indivíduo. Contudo esse método permite detectar mutações estáveis, o que pode ser útil em termos de diagnóstico/prognóstico, considerando que mutações somáticas são frequentemente encontradas nas células cancerosas (FURRUKH; QURESHI, 2018). As mutações frequentemente descritas em câncer de mama estão relacionadas aos genes *PIK3CA*, *AKT1*, *TP53* e *GATA*, *FGFR1* e *CCND1* (PEREIRA *et al.*, 2016; RAJENDRAN; DENG 2017; STEPHEN *et al.*, 2012).

### 2.3 REGULAÇÃO DO CICLO CELULAR

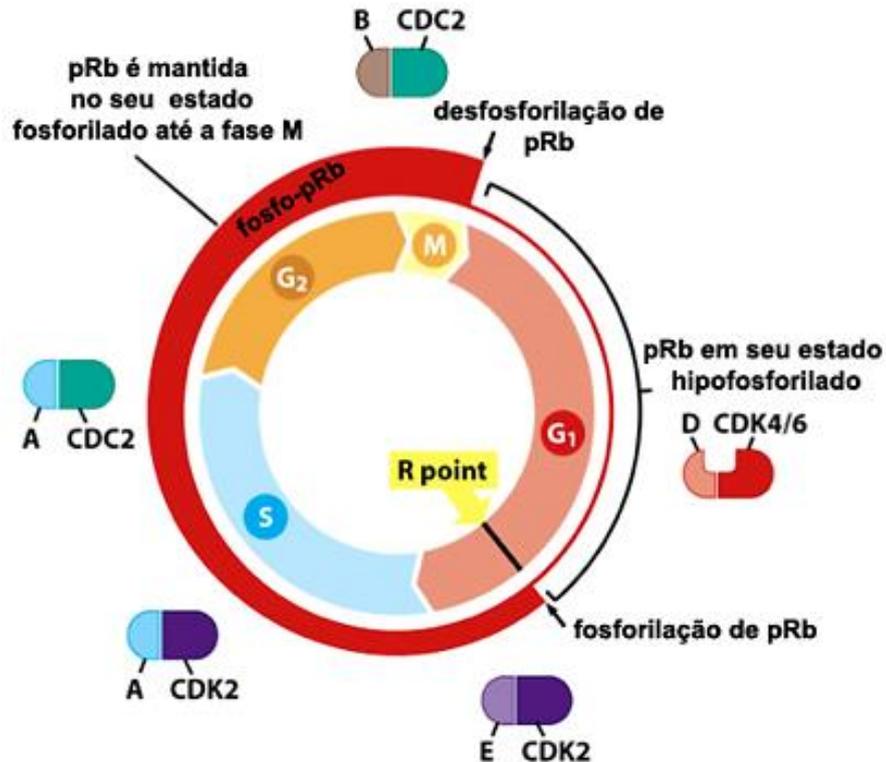
O ciclo celular é caracterizado por uma sucessão de eventos, os quais são altamente regulados. Ao longo do processo, o DNA é duplicado (fase S) e os cromossomos são equacionalmente segregados (mitose). A citocinese marca o término do processo de divisão e a formação das células filhas. As fases G1 e G2 do ciclo celular são caracterizadas por intensa síntese proteica e aumento do volume

celular. Na fase G1 ocorre a organização e integração dos sinais de crescimento e proliferação, enquanto na fase G2 a maquinaria celular se prepara para entrada na mitose (BARNUM; O'CONNEL, 2014; MATTHEWS *et al.*, 2022; MEDEMA; MACÛREK, 2012).

Em condições fisiológicas normais, a progressão do ciclo celular envolve a atividade orquestrada de proteínas cinases e fosfatases. Em resposta a sinais mitogênicos, complexos proteicos constituídos por ciclinas e cinases dependentes de ciclinas (CDKs) são ativados (MATTHEWS *et al.*, 2022; OKADA *et al.*, 2017; SHERR; ROBERTS; 1999). Os complexos ciclina D-CDK4/6 e E-CDK2 regulam a progressão de G1 e a transição G1/S, respectivamente. A progressão pela fase S é dependente da ativação de complexos ciclina A/CDK2, enquanto a progressão pela fase G2 e transição G2/M são eventos orquestrados pela ativação dos complexos ciclina A/B-CDK1 e outras proteínas cinases mitóticas, incluindo as Auroras cinases A/B e *polo-like kinase 1* (PLK-1) (MATTHEWS *et al.*, 2022) (FIGURA 2).

O aumento de expressão de ciclina D e a ativação dos complexos ciclina D-CDK4/6 tem um papel importante na integração de sinais mitogênicos, uma vez que as CDKs 4/6 fosforilam e inativam a proteína supressora de tumor Rb (retinoblastoma). Na sua forma ativa, a proteína pRB interage e sequestra fatores de transcrição da família E2F. Contudo, à medida que pRb é fosforilada há uma perda de afinidade pelos fatores de transcrição que, uma vez disponíveis, atuam na transcrição de uma série de genes necessários à progressão do ciclo celular, incluindo *c-myc* e *CCND* (ciclina D) e *CCNE* (ciclina E) (DIAZ-MORALLI *et al.*, 2013; HYDBRING; MALUMBRES; SICINSKI, 2016; LEE *et al.*, 2016). A pRb é mantida em seu estado hiperfosforilado (inativa) ao longo do ciclo celular devido a ativação sequencial das CDKs 4/6, CDK2 e CDK1 (MAHARJAN *et al.*, 2021) (FIGURA 2).

**Figura 2** – Representação esquemática - regulação do ciclo celular

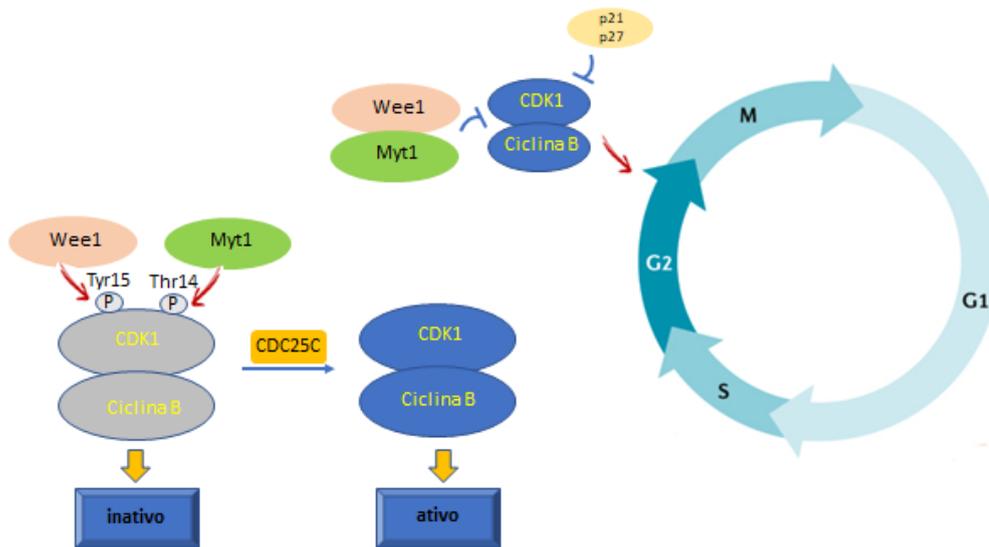


**Fonte:** Adaptado de Weinberg, 2008.

**Nota:** A progressão do ciclo celular é regulada positivamente pelos complexos CDK-ciclina. A ativação da CDK4/6, pela interação com a ciclina D na fase G<sub>1</sub>, leva a fosforilação e inativação da proteína retinoblastoma (pRb), a qual se mantém hiperfosforilada (estado inativo) ao longo do ciclo celular devido a ativação das CDKs2/1.

A transição G<sub>2</sub>/M requer a ativação dos complexos ciclina A/CDK1 e ciclina B/CDK1. A ciclina A é degradada no início da mitose, contudo a ciclina B mantém a CDK1 ativa até a metáfase (OTTO; SICINSKI, 2017). Os complexos ciclina B/CDK1 se acumulam durante a fase G<sub>2</sub>, contudo ficam inativos devido a fosforilação inibitória, mediada por Myt1 e Wee1, nos resíduos de tirosina 15 e treonina 14 da CDK1, respectivamente. A fosfatase CDC25C é responsável por remover a fosforilação inibitória e ativar os complexos ciclina/CDK1 na transição G<sub>2</sub>/M (FIGURA 3). A desorganização do envoltório nuclear, a fragmentação do aparelho de Golgi, a condensação dos cromossomos, a formação do fuso mitótico bipolar e o alinhamento dos cromossomos na placa metafásica da célula são eventos deflagrados pela ativação de CDK1 (MALUMBRES; BARBACID, 2009; MATTHEWS *et al.*, 2022).

**Figura 3** – Modelo esquemático - mecanismos regulatórios da transição G2/M



**Fonte:** Elaborado pelo autor (2022).

**Nota:** Modelo esquemático mostrando os mecanismos regulatórios da transição G2/M. Os complexos CDK1/ciclina B se acumulam em G2, contudo se mantém inativos devido a fosforilação inibitória mediada por Wee1 e Myt1.

As Auroras A/B e PLK-1 são proteínas conhecidas por cinases mitóticas, uma vez que atuam diretamente no processo de divisão. Na transição G2/M e início da mitose, a Aurora A se concentra na região do centrôssomo e desempenha papel crucial nos processos de maturação/separação dos centrôssomos e organização do fuso bipolar (DIAZ-MORALLI *et al.*, 2013; LIN *et al.*, 2020; MARUMOTO; ZHANG; SAYA, 2005). A Aurora B é um componente do complexo passageiro de cromossomos (CPC), cuja localização varia de acordo com o estágio do processo de divisão. Na transição G2/M e prófase, a Aurora B interage com os cromossomos, ao passo que nas fases de prometáfase e metáfase se concentra na região cinetocórica. Durante a anáfase/telófase e citocinese, a Aurora B interage com os microtúbulos centrais do corpo mediano, os quais derivam dos microtúbulos interpolares. A Aurora B está associada ao empacotamento do material genético, monitoramento da ligação das fibras do mitótico às regiões cinetocóricas dos cromossomos e citose (KRENN; MUSACCHIO, 2015; MANZIONE *et al.*, 2020). A PLK1 atua de forma cooperativa com as Auroras A e B para orquestrar os eventos que regulam a transição G2/M e progressão pelas fases subsequentes até que as células filhas sejam formadas no final do processo de divisão (CHOU *et al.*, 2015; COLICINO; HEHNLY, 2018; KETTENBACH *et al.*, 2018; WONG *et al.*, 2022).

Uma gama variada de estudos mostra que as Auroras A/B e PLK1 são

superexpressas em tumores, incluindo tumores de mama (MURGA-ZAMALLOA; INAMDAR; WILCOX, 2019; KAHL *et al.*, 2022; LIU *et al.*, 2020; RAAB *et al.*, 2021; ROUQUIER *et al.*, 2014). De modo que essas proteínas cinases têm sido consideradas importantes alvos terapêuticos (CHIAPPA *et al.* 2022; JADHAV *et al.*, 2021; NILSSON *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2021).

A atividade das CDKs, como mencionado anteriormente, pode ser negativamente regulada pelas cinases Wee1 e Myt1, contudo proteínas das famílias INK4 e KIP/CIP também podem inibir a atividade catalítica de CDKs (MALUMBRES; BARBACID, 2009; MATTHEWS *et al.*, 2022). As proteínas p15 (INK4b), p16 (INK4a), p18 (INK4c) e p19 (INK4d) pertencem a família INK4 e inibem especificamente as CDK4 e CDK6 (ROUSSEL, 1999). Ao passo que as proteínas p21 (WAF1, CIP1) e p27 (CIP2), da família KIP/CIP, inibem diferentes CDKs, incluindo a CDK1 (FISHER; KRASINSKA, 2022; HYDBRING; MALUMBRES; SICINSKI, 2016) (FIGURA 2). Em células tumorais a atividade proliferativa envolve a ativação de diferentes oncogenes, incluindo *c-myc* (DHANASEKARAN *et al.*, 2022; WANG; BOXER, 2005), um fator de transcrição que pode estimular ou reprimir a expressão de seus genes alvos. Estudos mostram que *c-myc* regula negativamente a expressão de p21 (NAYAK *et al.*, 2018; XU *et al.*, 2016). O silenciamento de *c-myc*, por RNA de interferência, reduziu a proliferação de células derivadas de mama (MCF-7) e inibiu o crescimento tumoral *in vivo* (WANG *et al.*, 2005). De forma que, substâncias capazes de reduzir os níveis de expressão de *c-myc* e atenuar a repressão de p21 representam promissores agentes antitumorais.

## 2.4 APOPTOSE

Apoptose trata-se de um processo altamente regulado e constitui um evento de fundamental importância para a homeostase dos organismos multicelulares, considerando que permite a eliminação de células desnecessárias, envelhecidas ou alteradas. As modificações que ocorrem ao longo do processo de transformação maligna conferem às células tumorais resistência aos sinais indutores de apoptose (ENGIN, 2021; FESIK, 2005; ROBERTS; WEI; HUANG, 2021).

Duas principais vias estão relacionadas à indução de apoptose, a via extrínseca e a intrínseca, sendo que pode haver a convergência dessas vias dependendo do estímulo apoptótico. A via extrínseca envolve a participação dos

receptores de morte incluindo os receptores para FAS e TRAIL, membros da superfamília de receptores TNF (Fator de Necrose Tumoral). A via intrínseca é mediada por membros da família BCL-2, que em resposta a estímulos pró-apoptóticos, promovem aumento na permeabilidade da membrana mitocondrial externa favorecendo a liberação de citocromo-c e de outros fatores pró-apoptótico. Ambas as vias levam à ativação de caspases iniciadoras (caspases 8/10 e 9) que, por vez, ativam as caspases executoras (3, 6 e 7) que degradam uma gama variedade de substratos levando a formação dos corpos apoptóticos (GHOBRIAL; WITZIG; ADJEI, 2005; LOO *et al.*, 2020; MAJI *et al.*, 2018). As caspases iniciadoras 8/10 e 9 são ativadas pelas vias extrínseca e intrínseca, respectivamente (SINGH; LETAI; SAROSIEK, 2019; WANG, 2014).

A família BCL-2 é constituída por duas classes de proteínas que atuam inibindo (membros anti-apoptóticos) ou favorecendo (membros pró-apoptóticos) o processo de apoptose. BCL-2, BCL-XL, MCL-1, BCL-W e A-1 constituem exemplos de membros anti-apoptóticos da família BCL-2, enquanto BAX, BAK, BAD, BID, NOXA e PUMA são exemplos de fatores pró-apoptóticos dessa família. O perfil diferencial de expressão e/ou ativação dos diferentes membros da família BCL-2 definem se haverá sobrevivência ou morte celular (BORNER, 2003; ELKHOLI *et al.*, 2014; SINGH; LETAI; SAROSIEK, 2019; THOMAS *et al.*, 2013).

É amplamente conhecido que a ativação de vias oncogênicas leva a resistência da célula tumoral aos sinais indutores de apoptose (ALCON *et al.*, 2021; KAWIAK; KOSTECKA, 2022; SÉVENO *et al.*, 2012). A superexpressão de *BCL-2* tem sido observada em células derivadas de câncer de mama. Cerca de 85% dos tumores positivos para receptor de estrogênio apresentam elevados níveis de expressão de *BCL-2* (MERINO *et al.*, 2015; RAHA *et al.*, 2015). A redução dos níveis de *BCL-2*, induzida pelo uso combinado de inibidor de histona desacetilase e tamoxifeno, induziu apoptose em células de câncer de mama resistentes ao tamoxifeno (RAHA *et al.*, 2015).

## 2.5 VIAS DE SINALIZAÇÃO MAPK/ERK E PI3K/AKT

A proliferação celular é um evento necessário em vários processos biológicos normais, incluindo renovação e reparo tecidual. Os estímulos indutores de proliferação atuam sobre receptores que superfície que fazem a transdução de sinal

e ativam vias intracelulares de sinalização. Contudo, os mecanismos que regulam proliferação, diferenciação e sobrevivência celular estão alterados em células transformadas (HANAHAN; WEINBERG, 2011), o que favorece o processo de progressão tumoral (GONZALEZ-ANGULO; BLUMENSCHNEIN, 2013; WANG *et al.*, 2017). A superexpressão e/ou hiperativação de receptores tirosino-cinases levam a ativação sustentada das vias MAPK/ERK (*mitogen activated protein kinase/extracelular signal-regulated kinase*) e PI3K/AKT, as quais estão frequentemente associadas à oncogênese, progressão tumoral e resistência das células tumorais à fármacos (AKULA *et al.* 2019).

A via MAPK/ERK é ativada por RAS, uma GTPase monomérica que, em geral, é ativada por receptores tirosina-cinase. RAS ativa RAF (ASATI *et al.*, 2016), uma serina-treonina cinase, que ativa MEK1/2. Na sequência, MEK ativa ERK1/2 que, por sua vez, modulam a atividade transcricional de *c-fos* e *c-myc* e induzem a expressão de ciclina D e BCL-2, importantes reguladores de proliferação e sobrevivência celular (GILTNANE; BALKO, 2014; DEGIRMENCI; WANG; HU, 2020; LAVOIE; GAGNON; THERRIEN, 2020).

Estudos mostram que a hiperativação na via MAPK em tumores de mama é decorrente de alterações em genes que codificam receptores tirosina-cinases incluindo receptores dos fatores de crescimento epidérmico (EGFR e HER-2, também conhecidos por ERBB1 e ERBB2, respectivamente), fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR). Níveis elevados de expressão desses receptores estão associados com maior agressividade do tumor e menor taxa de sobrevida. Os receptores HER-2 e EGFR são expressos em níveis elevados em aproximadamente 25% e 30% dos casos de câncer de mama e são correlacionados com pior prognóstico (KING; KRAUS; AARONSON, 1985; SLAMON *et al.*, 1987). Além disso, elevados níveis de expressão de VEGFR2 têm sido observados em tumores de mama (HASAN *et al.*, 2011) e correlacionados com pior evolução clínica (GHOSH *et al.*, 2008).

A hiperativação da via PI3K/AKT também é observada em diferentes tipos de cânceres incluindo os tumores de mama (MAYER; ARTEAGA, 2016). O comportamento agressivo das células tumorais e a resistência a fármacos são eventos associados à hiperativação da via PI3K/AKT/mTOR, de modo que substâncias capazes de inibir essa via são consideradas promissoras agentes antitumorais (GILTNANE; BALKO, 2014).

A família de proteínas PI3K constitui um grupo de enzimas que podem ser ativadas por receptores tirosina-cinases e receptores acoplados à proteína G. Essa família de enzimas catalisa reações de fosforilação em fosfatidilinosítídeos e, portanto, são proteínas cinases que atuam sobre substratos lipídicos. A família compreende 3 classes de proteínas (Classes IA e IB e Classe II), considerando sua estrutura e a especificidade aos diferentes alvos (ONO; KUWANO, 2006) A classe IA de PI3K é constituída por um dímero contendo as subunidades regulatória (p85) e catalítica (p110). A atividade enzimática de PI3K é responsável pela conversão de PIP2 (fosfatidilinosital 4,5-bifosfatato) em PIP3 (fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfatado), um evento importante para a ativação sequencial da AKT (também denominada de PKB). AKT fosforila diferentes alvos citoplasmáticos e nucleares regulando diferentes processos biológicos, os quais incluem proliferação, crescimento e sobrevivência celular. A atividade enzimática de PI3K é antagonizada pela fosfatase PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) que é catalisa a desfosforilação de PIP3 convertendo-o à PIP2 (MAYER; ARTEAGA, 2016).

A hiperativação da via PI3K/AKT em cânceres humanos, em geral, está associada a mutações ativadoras nos genes que codificam as diferentes subunidades de PI3K, perda de atividade de PTEN devido a alterações genéticas ou epigenéticas e ativação sustentada de receptores tirosina-cinases (PARSONS; SIMPSON, 2003; SONG; SALMENA; PANDOLFI, 2012).

Estudos mostram que a ativação de receptores tirosino-cinases e das vias MAPK/ERK e PI3K/AKT estão associadas à resistência ao tamoxifeno, um modulador seletivo de RE amplamente utilizado na terapia endócrina, a qual pode beneficiar pacientes portadores de câncer de mama que expressam receptores hormonais (HOSFORD; MILLER, 2014; YIN *et al.*, 2014).

## 2.6 TRATAMENTOS

Os tratamentos para o câncer de mama são individualizados e personalizados de acordo com o subtipo de tumor. Os cânceres HER-2 positivos, em geral, utilizam terapias alvo-dirigidas empregando anticorpos monoclonais como o trastuzumabe (*Herceptin*®), por exemplo, e inibidores de receptores tirosina-cinases; além da quimioterapia e radioterapia, de acordo com a necessidade individual de cada indivíduo. Em geral, os pacientes respondem bem inicialmente a terapia alvo-

dirigida, contudo, é comum observar progressão da doença após um determinado período de tratamento (LUQUE-CABAL *et al.*, 2016).

Os tumores triplo-negativos são de difícil tratamento por não apresentarem alvo terapêutico definido (YAO *et al.*, 2017) e, conseqüentemente, apresentam pior prognóstico. São tumores altamente agressivos que crescem rapidamente independentemente de estímulos hormonais (JIN; MU, 2015; MAKKI, 2015; KIM *et al.*, 2017; SUN *et al.*, 2017; VUONG *et al.*, 2014; WAKS *et al.*, 2019). Curiosamente, essa forma agressiva de tumor é comum em mulheres jovens e totalizam ao redor de 10% a 15% de todos os casos da doença (ACS, 2019). Os tratamentos para os tumores triplo-negativos envolvem terapia sistêmica e uso de substâncias citotóxicas (WAKS, 2019).

A terapia hormonal tem sido amplamente empregada no tratamento de tumores positivos para receptores de estrogênio (RE+). Os fármacos utilizados na terapia hormonal estão associados à inibição da via estrogênica e incluem inibidores de aromatase (letrozol, anastrozol e exemestano), os moduladores seletivos do receptor de estrogênio (tamoxifeno, raloxifeno e toremifeno) e os reguladores negativos dos receptores de estrogênio (fulvestranto) (FLACH *et al.*, 2020; POULARD *et al.*, 2019; YAO *et al.*, 2017).

A aromatase é codificada pelo gene *CYP19* e constitui um membro da família de citocromo P-450 que catalisa a conversão de androstenediona em estrona (E1), e de testosterona em estradiol (E2). Na fase pré-menopausa, E2 representa a principal forma de estrogênio, sendo sintetizado majoritariamente no ovário pelas células da granulosa e células do corpo lúteo. Após a menopausa, E1 é sintetizada a partir da aromatização da androstenediona em tecidos extra-glandulares, incluindo o tecido adiposo. E1 pode ser reversivelmente convertida em E2 em tecidos periféricos pela ação da enzima 17- $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase (FUENTES; SILVEYRA, 2019). Assim sendo, os inibidores de aromatase reduzem os níveis de estrogênio circulantes. Os moduladores seletivos de RE inibem a resposta celular aos efeitos do estrogênio nas células da mama, enquanto os reguladores negativos de RE impedem sua dimerização e, conseqüente ativação, induzindo a degradação desses receptores (BOÉR, 2017).

Apesar dos avanços no diagnóstico e nas propostas terapêuticas para o câncer de mama, a taxa de mortalidade ainda permanece alta (HOLEN *et al.*, 2017; KALIMUTHO *et al.*, 2015). O principal fator relacionado à ineficácia dos tratamentos

está associado ao desenvolvimento de resistência. Dessa forma, é importante identificar novos protótipos candidatos a fármacos para aumentar o arsenal terapêutico para o câncer de mama e entender os mecanismos associados à resistência das células aos fármacos usados atualmente para traçar novas estratégias terapêuticas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos de derivados *N*-acilidrazônicos sobre células derivadas de câncer de mama que expressam receptores de estrogênio (MCF-7).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar os efeitos de derivados *N*-acilidrazônicos sobre o comportamento proliferativo de células MCF-7 e selecionar o protótipo mais ativo;
- b) Avaliar os mecanismos moleculares associados à atividade antiproliferativa da substância selecionada, considerando seus efeitos sobre o perfil de expressão de proteínas que regulam a progressão do ciclo celular;
- c) Investigar a influência da substância selecionada sobre a via MAPK/ERK;
- d) Avaliar o potencial pró-apoptótico da substância avaliada.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 LINHAGEM CELULAR E CONDIÇÕES DE CULTIVO

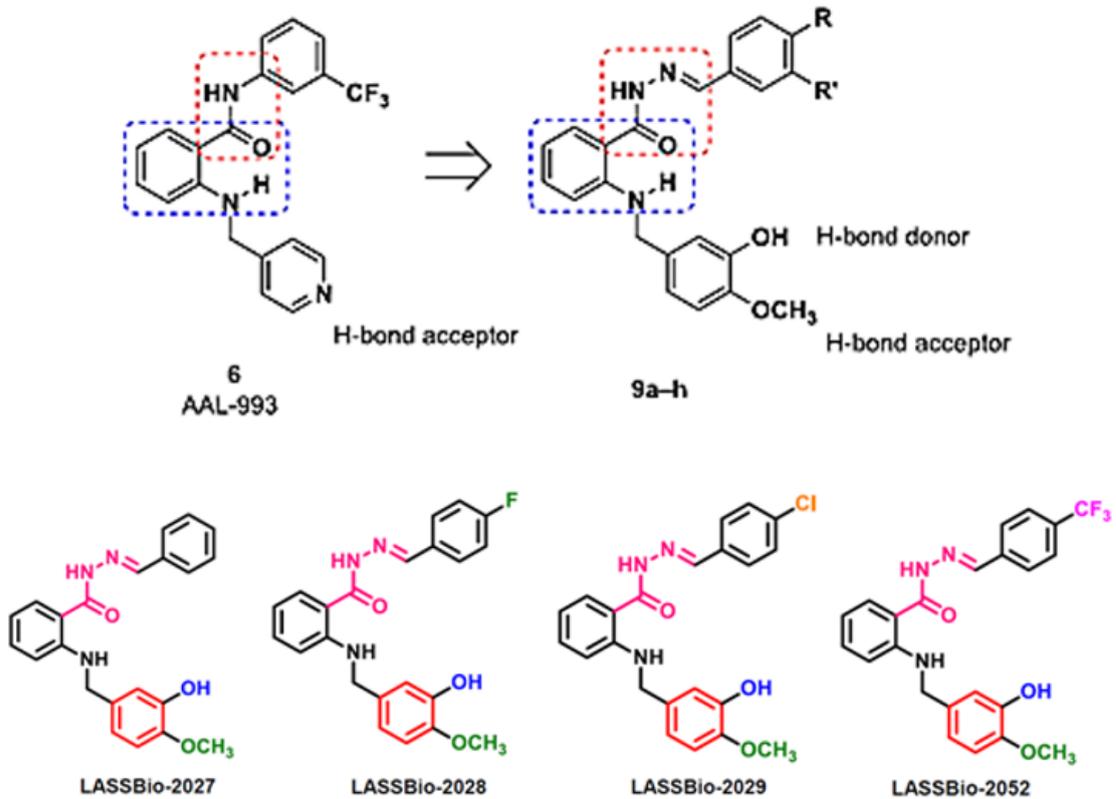
A linhagem MCF-7, derivada de câncer de mama, foi utilizada no presente estudo. Essa linhagem foi adquirida junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro e tem sido periodicamente testada para contaminação com micoplasma. Essa linhagem é representativa dos subtipos tumorais que expressam o receptor de estrogênio. Culturas primárias de fibroblastos (FBM) também foram incluídas no estudo, as quais foram gentilmente cedidas pelo prof. Dr. Angel Mauricio de Castro Gamero do Instituto de Ciências da Natureza da UNIFAL-MG. A cultura foi estabelecida a partir de pele humana coletada no centro cirúrgico do Centro de Oncologia da Casa de Caridade de Alfenas Nossa Senhora do Perpetuo Socorro (Hospital Santa Casa de Alfenas), após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Proc. 2.082.524, aprovado junto ao comitê de ética da UNIFAL-MG). A linhagem MCF-7 e os fibroblastos primários foram cultivados em meio DMEM/F12 (Meio Mínimo de *Eagle* modificado por *Dulbecco*, *Sigma*, CA, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Cultilab, SP, Brasil). As culturas foram mantidas em atmosfera controlada (37°C e 5% de CO<sub>2</sub>) e as subculturas foram realizadas periodicamente. Os estoques foram mantidos em nitrogênio líquido.

### 4.2 OBTENÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS E ESQUEMA DE TRATAMENTO

As substâncias **LASSBio-2027**, **LASSBio-2028**, **LASSBio-2029** e **LASSBio-2052** (FIGURA 3) foram sintetizadas no laboratório de Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas – LASSBio (PAULI *et al.*, 2020) e gentilmente cedidas pelo professor Dr. Eliezer J. Barreiro da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

As substâncias foram solubilizadas em DMSO para obtenção da solução-estoque (20 mM) e diluições foram realizadas em meio de cultura para obter as soluções de uso, imediatamente antes do uso. A concentração final de DMSO no meio de cultura não excedeu 0,01% (v/v).

**Figura 4** – Estruturas químicas das substâncias **LASSBio**.



**Fonte:** Adaptado de PAULI *et al.* (2020).

**Nota:** Painel superior: Modificações estruturais realizadas no protótipo AAL-993, um inibidor não seletivo de VEGFR2. Painel inferior a estrutura química dos derivados *N*-acilidrazônicos **LASSBio-2027**, **LASSBio-2028**, **LASSBio-2029** e **LASSBio-2052**.

#### 4.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi avaliada por SRB (sulforrodamina – B) com o objetivo de identificar e selecionar o protótipo mais ativo a fim de usá-lo nas análises subsequentes. Este ensaio é baseado na capacidade que o corante SRB possui em se ligar a elementos proteicos das células fixadas pelo ácido tricloroacético (TCA) 5%. Skehan e seus colaboradores (1990) afirmam que a sulforrodamina-B é uma aminoxantina de cor rosa brilhante unida a dois grupamentos sulfônicos que possui a habilidade de interagir com porções terminais de aminoácidos. A taxa de absorvância é diretamente proporcional ao número de células vivas. As células foram semeadas em placas de 96 poços, utilizando inóculo de  $1 \times 10^4$  células por poço. Após o período de tratamento (48 horas), as células foram fixadas com ácido tricloroacético (4°C), o qual foi adicionado ao meio de cultura em uma proporção 1:2 (concentração final de 5%). Após a fixação a placa foi lavada com 300uL de água destilada e mantida a temperatura ambiente por 24 horas para secagem. Após

secas, a coloração com SRB 0,4% foi realizada por 1 hora em temperatura ambiente, seguida por 3 lavagens com ácido acético 1% e deixada para secar em temperatura ambiente por no mínimo 12 horas. Os cristais foram solubilizados com uma solução Tris-NaOH (pH:10,0) por 30 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a uma absorvância de 540 nm com referência de 690 nm. Os valores de absorvância obtidos nas amostras tratadas foram comparados com os valores de absorvância das amostras controles. Os experimentos foram realizados em quadruplicata. Os dados representam a média  $\pm$  o desvio padrão (DP) de 3 experimentos independentes. Os valores de IC<sub>50</sub> foram obtidos utilizando o software *GraphPad Prism*® 5.0 (*GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA*).

#### 4.4 ANÁLISE DA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR

As células foram semeadas em placas de 35mm de diâmetro, utilizando inóculo de  $2 \times 10^5$  células por placa. Após tratamento, as células foram coletadas por digestão enzimática (*Trypsin-EDTA solution/Sigma Aldrich* LTDA, Brasil) e transferidas para tubos Falcon. O precipitado de células foi obtido por centrifugação (5 minutos a 1500 rpm) e na sequência as células foram fixadas com etanol gelado (75% em PBSA-Salina fosfato tamponada) por 30 minutos. Após nova centrifugação, as células foram coradas por 1 hora em uma solução contendo PBSA, RNAse (2,5 mg/mL) e Iodeto de Propídio (90  $\mu$ g/mL) (*Guava Technologies, Merck Millipore*). As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo (*Guava Mini EasyCyte, 8HT*) utilizando-se o *software GuavaSoft 2.7*. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  DP de 3 experimentos independentes.

#### 4.5 IMMUNOBLOT

As células foram homogeneizadas em tampão RIPA (NaCl 150mM, NP-40 1,0 %, ácido desoxicolato de sódio 1% em Tris-HCl 50 mM, pH= 7,5) contendo inibidores de proteases na concentração final de 2% (mix da *Sigma Aldrich* LTDA, Brasil). Após centrifugação a 12.000 g por 10 minutos o sobrenadante foi coletado e alíquotas foram separadas para quantificação pelo método BCA (*GE Healthcare*). A leitura da absorvância foi realizada por ELISA utilizando o comprimento de onda de 562 nm.

As amostras foram diluídas em tampão de amostra 4x (Tris 0,5 M – pH 6,8, 4

ml de glicerol, SDS 10%, azul de bromofenol 1% e beta-mercaptoetanol 1% em água deionizada) e aquecidas (100°C) por 5 minutos. O fracionamento das proteínas foi realizado em minigel de poliacrilamida 12% com SDS (2,5 horas a 100V). Em cada poço foi colocado 30 µg de proteína totais. A transferência para membrana de PVDF (*Amersham Pharmacia*) foi realizada por 2 horas a 200mA em tampão (Tris 0,025 M, glicina 0,192 M e metanol a 20% em água destilada).

Após a transferência das proteínas, a membrana foi corada em solução de *Ponceau* 0,5% por 3 minutos para verificar a eficiência da transferência. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes em TBS (solução salina tamponada com Tris) a 0,02 M (10 minutos cada lavagem). O bloqueio foi realizado com TBS a 0,02 M contendo leite desnatado (Molico – Nestlé) a 5% e *tween* 20 (*Sigma Aldrich* LTDA, Brasil) a 0,05% por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação.

Foram utilizados os seguintes anticorpos primários (TABELA 3), os quais foram diluídos em solução de bloqueio na concentração de 1:200 e a membrana incubada com os diferentes anticorpos, por 12 h, a 4°C sob agitação. Após sucessivas lavagens com TBS e TTBS (Tampão tris-salina acrescido de 0,1% de *tween* 20), a membrana foi incubada com anticorpos secundários anti-IgG de camundongo ou de coelho (1:1000) (*Kit ECL®*, *Amersham Pharmacia*), lavada novamente e revelada por quimioluminescência (*ECL®*, *Amersham Pharmacia*). Os resultados foram registrados em filme *Hyperfilm Amershan*. A quantificação das bandas foi realizada usando *ImageJ* (*Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA*).

**Tabela 3** – Especificações dos anticorpos primários usados no estudo.

ANTICORPO PRIMÁRIO	CÓDIGO	DILUIÇÃO	FABRICANTE
p-ERK	sc-7383	1:200	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
ERK 1	sc-94	1:200	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
p-Histone H3 (Ser10)	sc-8656-R	1:200	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
Cyclin B1	sc-245	1:200	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
α-Tubulin	T9026	1:1000	<i>Sigma-Aldrich</i>

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

#### 4.6 RT-qPCR

As células foram semeadas em placas de 35 mm de diâmetro a uma densidade de  $2,0 \times 10^5$  células por placa. As células foram coletadas por digestão

enzimática e após centrifugação (1000 rpm por 5 minutos a 4 °C), o precipitado de células foi homogeneizado em 350 µL de tampão de lise do kit *RNeasy Mini*<sup>®</sup> (Qiagen, Mississauga, Ontario, CA).

As amostras foram armazenadas a -80 °C até o momento da extração do RNA. O RNA total de cada grupo experimental (n = 4) foi extraído utilizando o kit *RNeasy Mini*<sup>®</sup> (Qiagen, Mississauga, Ontario, CA) de acordo com as instruções do fabricante e, então, eluído em 30 µL de água livre de RNase. A concentração de RNA total das amostras foi mensurada através do espectrofotômetro *NanoDrop*<sup>®</sup> ND 1000 (*NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA*). Em seguida 1 µg de RNA total foi incubado com DNase (1U; *Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil*) para eliminação de possível contaminação com DNA genômico e então submetido à reação de transcrição reversa (RT) utilizando *Randon primers* e *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*<sup>®</sup> (*Applied Biosystems, São Paulo, SP, Brasil*) de acordo com as instruções do fabricante. Os reagentes foram incubados a 25 °C por 10 min, 37 °C por 120 min e então, 85 °C por 5 min para a inativação da enzima.

A abundância de mRNA dos genes alvos (TABELA 4) foi investigada através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, utilizando o termociclador *ABI Prism7500*<sup>®</sup> (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*) e o protocolo de amplificação do kit *Power Syber Green Master Mix*<sup>®</sup> (*Applied Biosystems*). Os valores de expressão dos genes alvos foram normalizados pela expressão do gene constitutivo  $\beta$ -actina. A abundância relativa de RNAm de cada gene foi calculada utilizando o método  $\Delta\Delta Ct$  com correção da eficiência e utilizando uma amostra controle como calibradora (PFAFFL, 2001). Os valores médios de eficiência para cada gene foram calculados através do perfil de amplificação de cada amostra utilizando-se o programa *LinRegPCR* (RAMAKERS *et al.*, 2003). Foram realizados 4 experimentos independentes e os dados apresentados representam a média e o erro padrão.

**Tabela 4 – Primers utilizados nas reações de amplificação.**

GENE	SEQUÊNCIAS
<i>AURKA</i>	F 5'- TCTTCACAGGAGGCAAATCCA-3' R 5'-AATAAGTTACACACTCACTCAGGTA-3'
<i>AURKB</i>	F 5'-AAAGAGCCTGTCACCCCATC-3' R 5'-CGCCCAATCTCAAAGTCATC-3'
<i>CCNB1</i> (Ciclina B1)	F 5'- GTACCCTCCAGAAATTGGTGA-3' R 5'- GACTACATTCTTAGCCAGGTG-3'
<i>CDKN1A</i> (p21)	F:5'- CCATAGCCTCTACTGCCACCATC -3' R: 5'- GTCCAGCGACCTTCCTCATCCA – 3'
<i>BCL-2</i>	F:5'-CAGAAGTCTGGGAATCGATCTG-3' R:5'-AATCTTCAGCACTCTCCAGTTATAG-3'
<i>BAX</i>	F:5'-TTCCTTACGTGTCTGATCAATCC-3' R:5'-GGGCAGAAGGCACTAATCAA-3'
<i>PLK1</i>	F 5'-CCTGCACCGAAACCGAGTTAT-3' R 5'-CCGTCATATTCGACTTTGGTTGC-3'
<i>ACTB</i> ( $\beta$ -actina)	F:5'- AGAGCTACGAGCTGCCTGAC-3' R:5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG – 3'

**Fonte:** Elaborado pelo autor (2022).

#### 4.7 ENSAIO DE ANEXINA V

A externalização da fosfatidilserina foi avaliada utilizando-se o *Kit Guava Nexin®* (Merck Millipore, Massachusetts, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Células foram semeadas em placas de 24 poços a uma densidade de  $1 \times 10^5$  células por poço. As culturas celulares foram tratadas com **LASSBio-2029** a 30  $\mu$ M por 24 h e 48 h coletados por digestão enzimática (*Trypsin/EDTA*, Sigma).

As amostras foram centrifugadas a 1.000 rpm por 5 min a 4 °C, lavadas com PBS frio, e então  $2 \times 10^4$  células foram suspensas em 100  $\mu$ l de DMEM. Em seguida, foi adicionado 100  $\mu$ l de solução de mistura contendo tampão V-PE e 7-AAD. As amostras foram lidas após 20 minutos de incubação à temperatura ambiente em uma câmara escura. A análise foi realizada por citometria de fluxo utilizando *GoiabaSoft 2.7 Software*.

Os experimentos foram realizados em triplicatas e repetidos duas vezes. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  SD.

## 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

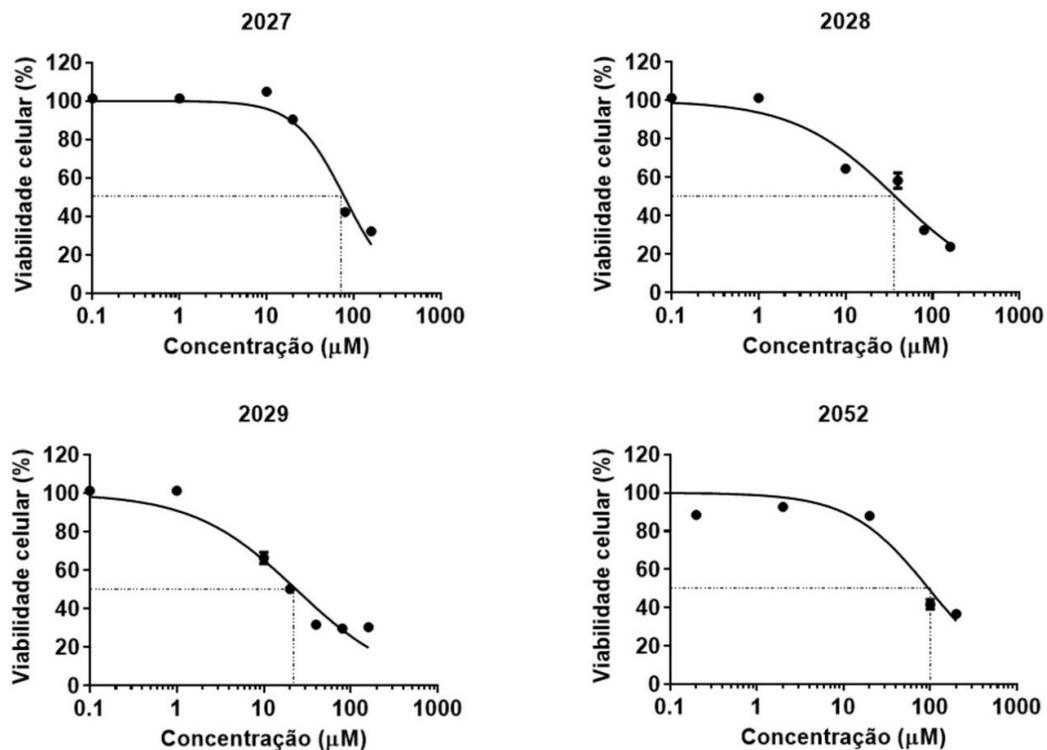
Os dados quantitativos foram apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão (DP) / erro padrão (EP). Diferenças significativas foram evidenciadas de acordo com o teste *t-student* usando o software *GraphPad Prism*® 8.0 (*GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA*).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 VIABILIDADE CELULAR

Os ensaios de viabilidade mostraram que houve redução significativa na taxa de viabilidade em culturas MCF-7 tratadas por 48 horas com as substâncias **LASSBio-2027**, **LASSBio-2028**, **LASSBio-2029** e **LASSBio-2052** em relação as culturas controles (FIGURA 5), contudo a substância **LASSBio-2029** obteve o menor  $IC_{50}$  e maior atividade citotóxica nas culturas de células MCF-7 (FIGURA 5, TABELA 5). O perfil de citotoxicidade das substâncias avaliadas sobre células normais também foi investigado. Fibroblastos derivados de pele humana normal foram usados como modelo de célula não tumoral. Os resultados mostraram que as substâncias testadas têm baixa citotoxicidade ( $IC_{50}$  superior a 100  $\mu M$ ) frente às células normais (TABELA 5).

**Figura 5** – Viabilidade celular - curvas dose-resposta



**Fonte:** Elaborado pelo autor (2022).

**Nota:** Curvas dose-resposta obtidas a partir dos ensaios de viabilidade, os quais foram realizados pelo método de sulfurodamina B (SRB). As culturas foram tratadas com as diferentes substâncias nas concentrações de 0,1; 1,0; 10,0; 50 e 100  $\mu M$  por 48 horas.

**Tabela 5** – Valores de IC<sub>50</sub> (µM) determinados após 48 horas de tratamento pelo ensaio de SRB.

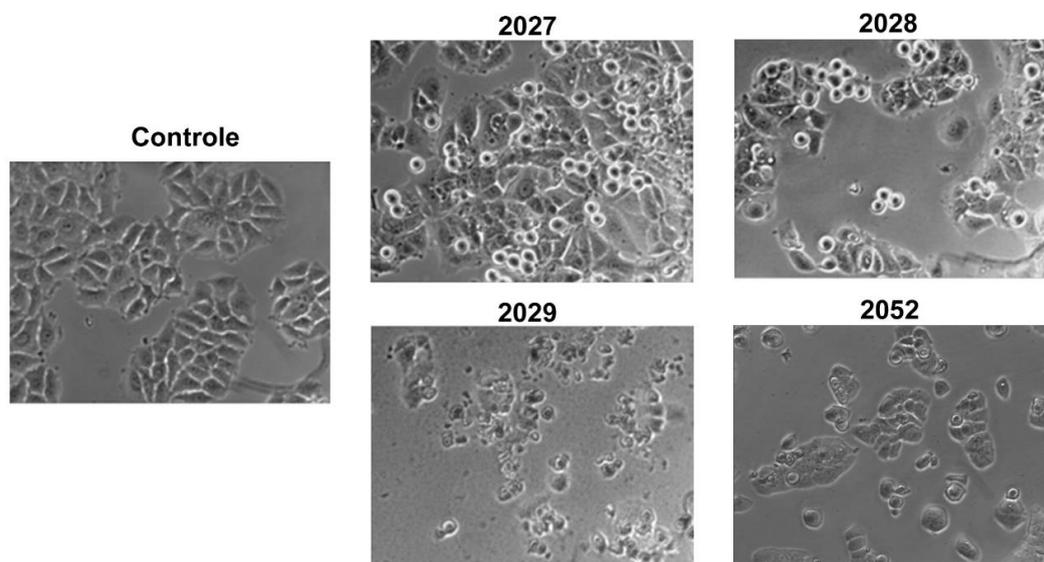
	<b>MCF-7</b>	<b>Fibroblasto</b>
<b>LASSBio-2027</b>	78,76 ± 5,14	> 200
<b>LASSBio-2028</b>	37,08 ± 3,3	> 140
<b>LASSBio-2029</b>	23,62 ± 2,52	> 120
<b>LASSBio-2052</b>	96,09 ± 0,96	> 190

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

O aspecto morfológico das células foi avaliado ao término do tratamento (FIGURA 6). Todas as substâncias avaliadas alteraram o padrão morfológico característico das células MCF-7 (FIGURA 6), contudo o efeito foi mais drástico em culturas tratadas com **LASSBio-2029** (FIGURA 6), que difere das demais substâncias por possuir o cloro para-substituído no grupo arila (FIGURA 4).

Considerando os dados preliminares, a substância **LASSBio-2029** foi selecionada para futuras investigações objetivando avaliar os mecanismos moleculares associados à atividade dessa substância sobre células MCF-7.

**Figura 6** – Imagens ilustrativas - microscopia de contraste de fase



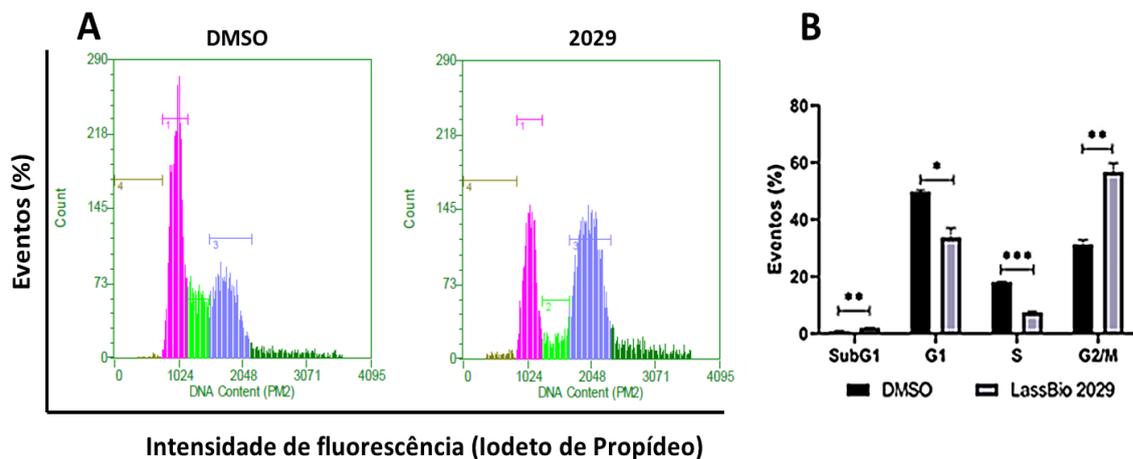
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

**Nota:** Imagens ilustrativas obtidas por microscopia de contraste de fase mostrando o aspecto morfológico das culturas tratadas com as substâncias **LASSBio-2027**, **LASSBio-2028**, **LASSBio-2029** e **LASSBio-2052** (aumento de 60X).

## 5.2 ANÁLISE DE PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR

A citometria de fluxo foi utilizada para determinar a frequência de células nas diferentes fases do ciclo celular. De acordo com os resultados, o composto **LASSBio-2029** alterou a dinâmica de progressão do ciclo celular. Nas culturas tratadas com **LASSBio-2029** (30 $\mu$ M) por 24 horas foi observado uma diminuição da população G1/S com concomitante aumento da população em G2/M. O acúmulo de células em G2/M constitui um indicativo de bloqueio da transição G2/M ou durante a fase M. Além disso, foi observado aumento da frequência de células em Sub-G1, indicando a indução de morte celular, uma vez que, na população Sub-G1, as células possuem o DNA fragmentado (FIGURA 7).

**Figura 7** – Análise do ciclo celular



**Fonte:** Elaborado pelo autor (2022).

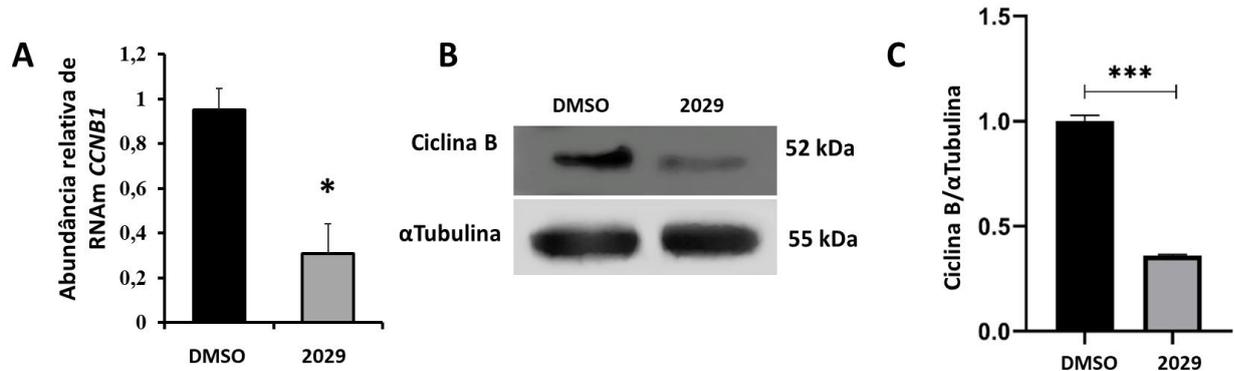
**Nota:** Análises de ciclo celular em culturas de MCF-7 tratadas com 30 $\mu$ M de **LASSBio-2029** por 24 horas. **(A)** histogramas ilustrativos obtidos por citometria de fluxo. As populações Sub-G1, G0/G1, S e G2/M estão representadas pelas cores marrom, rosa, verde claro e azul, respectivamente. **(B)** Análise da distribuição de células nas diferentes fases do ciclo celular. DMSO com concentração equivalente foi usado como controle. Os resultados referem-se a média de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  de acordo o teste *t-student*.

Considerando os resultados obtidos pela análise do ciclo celular, experimentos adicionais foram realizados para avaliar se o bloqueio do ciclo celular, ocasionado pelo tratamento com **LASSBio-2029**, ocorreu durante a transição G2/M ou nos estágios iniciais da fase M do ciclo celular.

Os níveis de expressão de reguladores da transição G2/M foram avaliados em nível de RNA mensageiro (RNAm) e de proteína. A abundância de RNAm para *CCNB1* (ciclina B1) foi cerca de três vezes menor em culturas MCF-7 tratadas com

**LASSBio-2029** (30  $\mu$ M) por 24 horas (Figura 8A). Os resultados de *immunoblot* também mostraram redução dos níveis de expressão de *CCNB1* em resposta ao tratamento (FIGURA 8B).

**Figura 8** – Expressão de *CCNB1* determinada por qPCR e *western blotting*

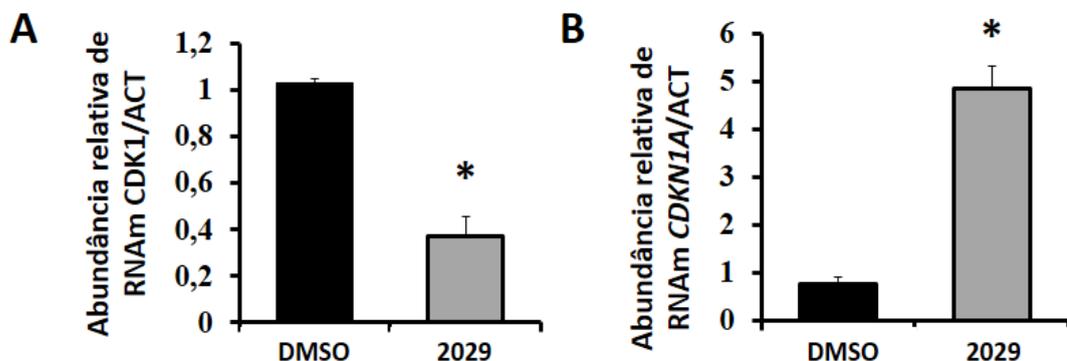


**Fonte:** Elaborado pelo autor (2022).

**Nota:** (A) Abundância relativa de RNAm para *CCNB1*, determinada por qPCR. (B e C) Expressão proteica de ciclina B. As culturas foram tratadas por 24 h com **LASSBio-2029** (30 $\mu$ M). Os resultados referem-se a média de, pelo menos, 3 experimentos independentes. \*\*\* $p < 0,001$  e \* $p < 0,05$  de acordo o teste *t-student*.

Dando continuidade à investigação, os níveis de RNAm para *CDK1* e *CDKN1A* (p21) também foram avaliados por qPCR. Os dados mostraram que houve redução significativa nos níveis de RNAm que codifica a *CDK1*, uma cinases crítica para desencadear o início da mitose. Concomitantemente, houve aumento significativo (cerca de 5 vezes) da abundância de RNA de *CDKN1A*, que codifica a proteína p21, uma proteína que inibe diferentes CDKs (FIGURA 9).

**Figura 9** – Expressão relativa de *CDK1* e *CDKN1A* determinada por qPCR

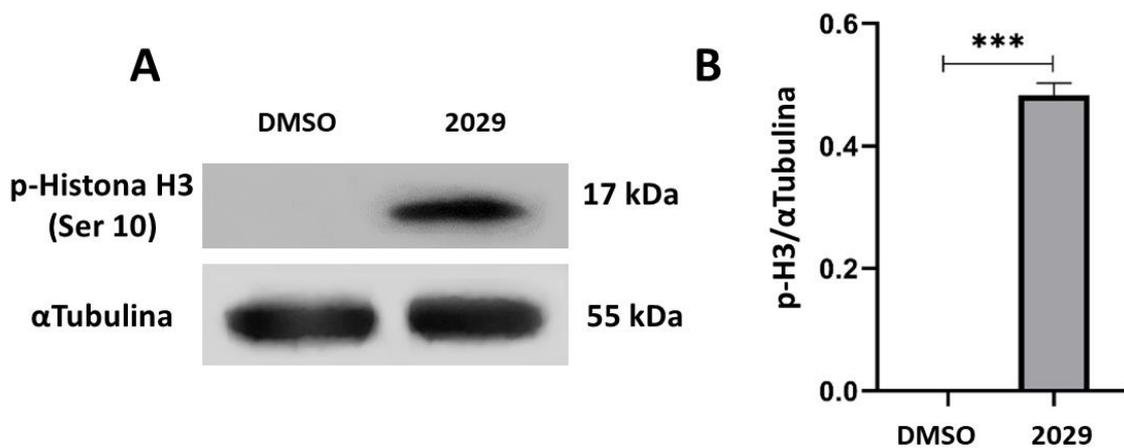


**Fonte:** Elaborado pelo autor (2022).

**Nota:** Abundância de RNAm de *CDK1* (A) e *CDKN1A* (p21) (B) determinada por qPCR. As culturas foram tratadas **LASSBio-2029** (30 $\mu$ M) por 24 horas. DMSO representa o grupo controle. Os resultados referem-se a média de 4 experimentos independentes. \* $p < 0,05$  de acordo o teste *t-student*.

Os níveis de expressão histona H3 fosforilada (Serina 10) foram determinados por *immunoblot* para avaliar a influência de **LASSBio-2029** na dinâmica de empacotamento da cromatina para a entrada em mitose. Paralelamente, foi determinada a frequência de células em mitose, a partir de preparações citológicas imunomarcadas para alfa-tubulina e coradas com DAPI. Os resultados mostraram que houve aumento expressivo nos níveis de histona H3 fosforilada no grupo tratado em comparação com grupo controle (FIGURA 10).

**Figura 10** – Expressão de histona H3 fosforilada determinada por *western blotting*

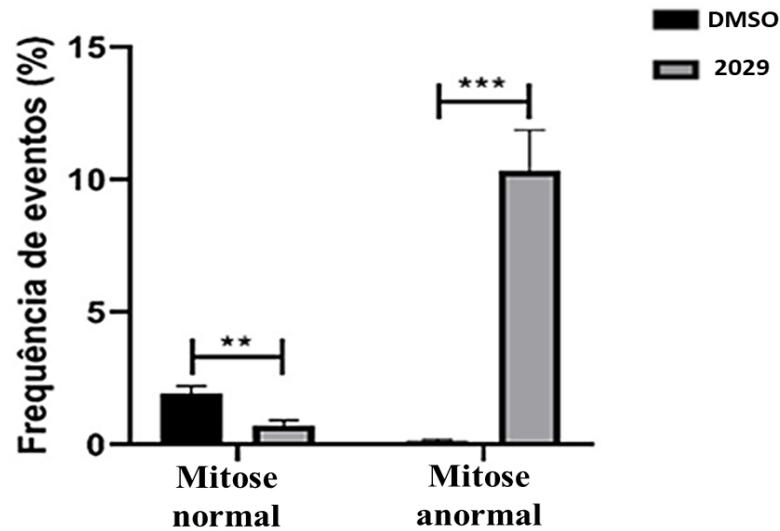


**Fonte:** Elaborado pelo autor (2022).

**Nota:** (A) Imagem ilustrativa mostrando as bandas imunorreativas para histona H3 fosforilada (ser10). A alfa-tubulina foi utilizada como controle de carregamento. (B) Expressão de histona H3 fosforilada de acordo com a análise realizada pelo *ImageJ*. As culturas foram tratadas com **LASSBio-2029** (30μM) por 24 horas. Os resultados referem-se a média de 2 experimentos independentes. \*\*\*p<0,001 de acordo o teste *t-student*.

No que diz respeito à determinação do índice mitótico, os resultados mostraram que houve redução significativa na frequência de eventos mitóticos, contudo foi observado o aparecimento de uma população celular atípica exibindo material genético condensado, em níveis compatíveis com a prófase e prometáfase, contudo sem a organização característica dos cromossomos nessas fases do processo de divisão. Além disso, não foi possível observar nessas células a presença de fuso bipolar. Esses eventos foram quantificados como mitoses anormais (FIGURA 11) e sugerem que essas células entraram prematuramente no processo de divisão celular. Nas mesmas preparações citológicas, foi possível observar também um aumento significativo na frequência de células apoptóticas e células multinucleadas (FIGURA 12).

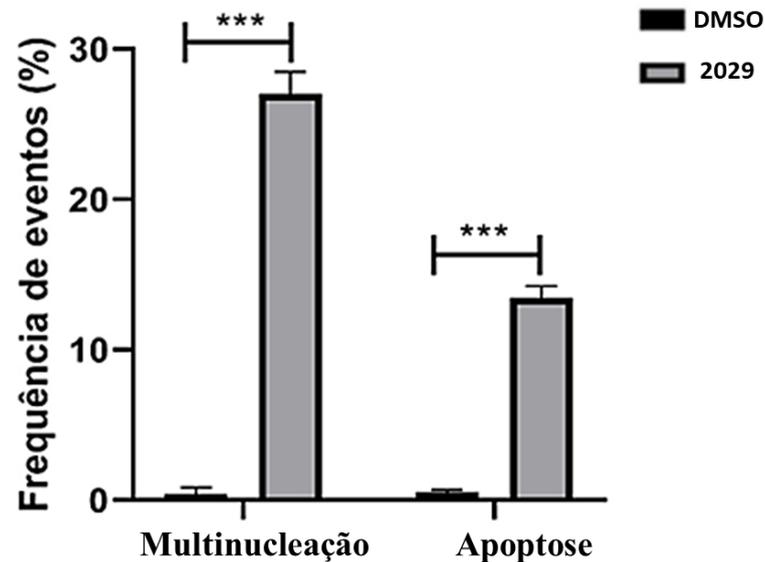
Figura 11 – Frequência de eventos mitóticos



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Nota: Frequência de eventos mitóticos normais e anormais determinada em preparações citológicas imunomarcadas para alfa-tubulina e DAPI. As culturas foram tratadas por 24 horas com **LASSBio-2029** (30 $\mu$ M). 1000 células foram contadas por amostra. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  de acordo com teste *t-student*.

Figura 12 – Frequência de células multinucleadas e apoptótica.



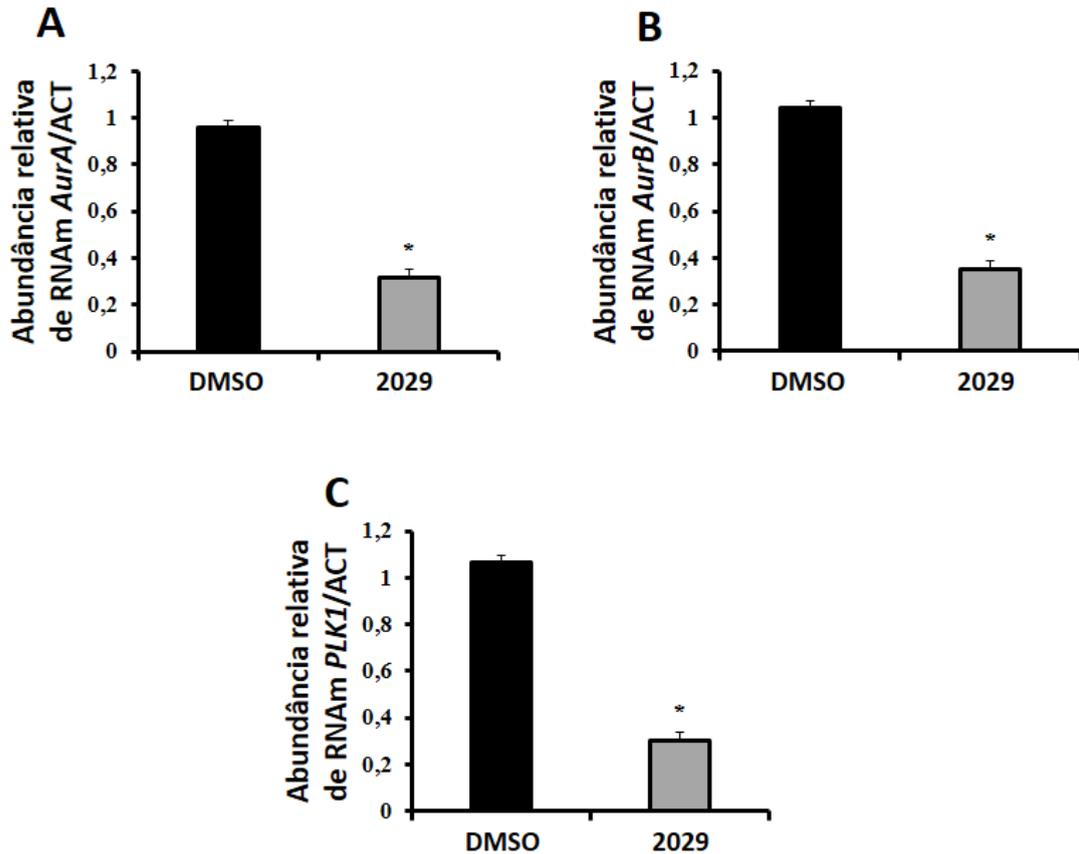
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Nota: Frequência de células multinucleadas e apoptótica determinada em preparações citológicas imunomarcadas para alfa-tubulina e DAPI. As culturas foram tratadas por 24 horas com **LASSBio-2029** (30 $\mu$ M). 1000 células foram contadas por amostra. \*\*\*  $p < 0,001$  de acordo com teste *t-student*.

Para entender melhor os efeitos induzidos por **LASSBio-2029** em células MCF-7, o perfil de expressão de *AURKA*, *AURKB* e *PKL-1* foi avaliado. Os

resultados mostraram que **LASSBio-2029** reduziu significativamente a abundância relativa de RNA mensageiro dessas proteínas cinases, as quais são necessárias para desencadear os eventos que marcam o início da mitose (FIGURA 13).

**Figura 13** – Abundância relativa de RNAm de *AURKA*, *AURKB* e *PLK1*



**Fonte:** Elaborado pelo autor (2022).

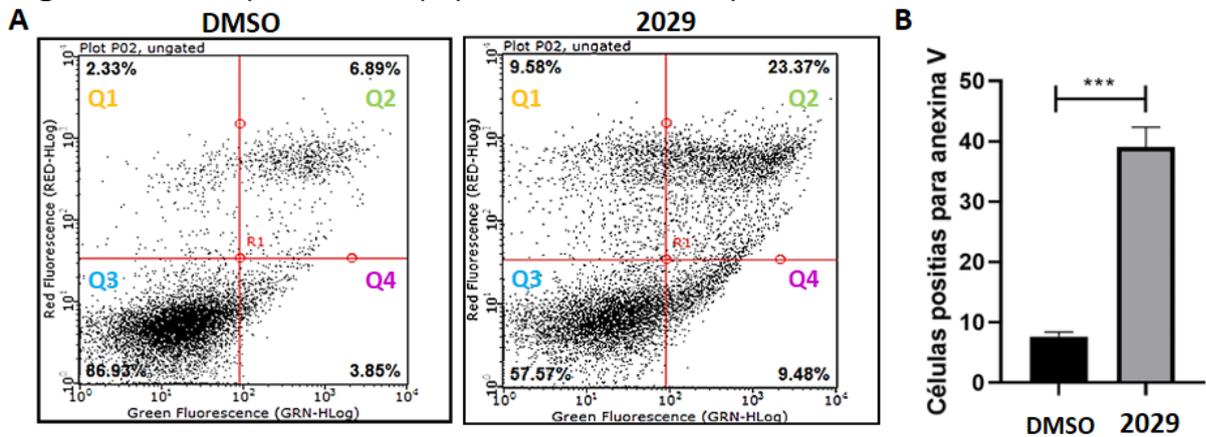
**Nota:** Abundância relativa de RNA mensageiro para *AURKA* (A), *AURKB* (B) e *PLK-1* (C) determinada por qPCR. As culturas foram tratadas com **LASSBio-2029** (30  $\mu$ M) por 24 horas. \*p < 0,05 de acordo com teste *t-student*.

### 5.3 ANÁLISE DE APOPTOSE

Considerando os dados preliminares como aumento significativo na população Sub-G1 na análise de progressão do ciclo celular e, ainda, o enriquecimento de eventos apoptóticos nas preparações citológicas usadas para determinar o índice mitótico. O potencial pró-apoptótico de **LASSBio-2029** foi avaliado usando abordagens metodológicas adicionais. Foram realizados ensaios de anexina V e avaliação da abundância de RNAm de proteínas pró e anti-apoptótica da família BCL-2 por qPCR.

**LASSBio-2029** induziu aumento significativo na população de células positivas para anexina V em comparação ao grupo controle (FIGURA 14). A investigação molecular, mostrou que os níveis de RNAm para *BAX* não foi significativamente alterado, entretanto houve redução significativa na abundância relativa de RNAm de *BCL-2* (cerca de 5 vezes), o que leva a aumento do raio *BAX/BCL-2*, favorecendo a indução de apoptose (FIGURA 15).

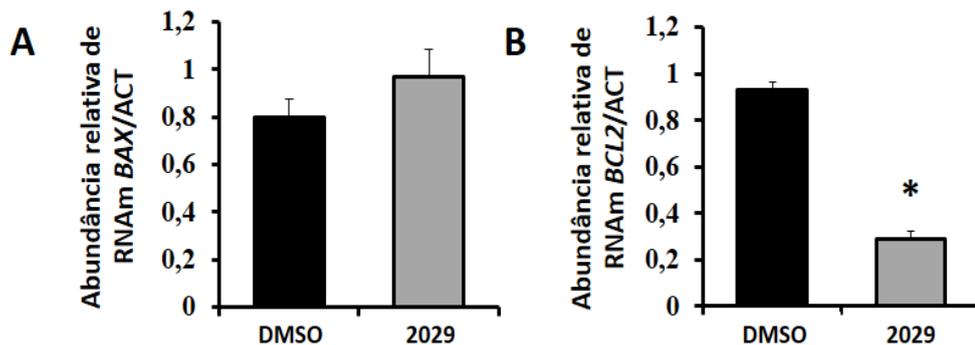
**Figura 14** – Frequência de apoptose determinada pelo ensaio de Anexina V



**Fonte:** Elaborado pelo autor (2022).

**Nota:** Ensaio de anexina V realizado após 24 horas de tratamento com **LASSBio-2029** (30 $\mu$ M). **(A)** *Dot plots* representativos obtidos por citometria de fluxo. **(B)** Análise quantitativa englobando o percentual de células positivas para anexina V. \*\*\* $p < 0,001$  de acordo com teste *t-student*.

**Figura 15** – Abundância relativa de RNAm de *BAX* e *BCL-2*.



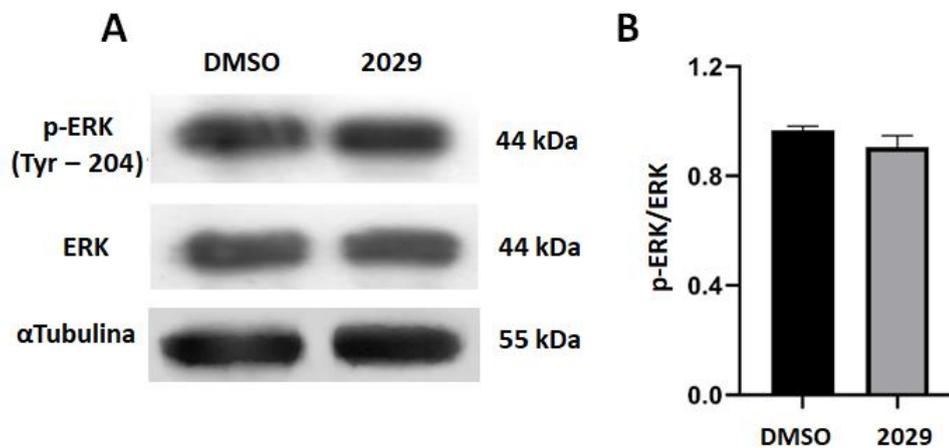
**Fonte:** Elaborado pelo autor (2022).

**Nota:** Abundância relativa de RNAm para *BAX* **(A)** e *BCL-2* **(B)** determina por qPCR. As culturas foram tratadas com **LASSBio-2029** (30 $\mu$ M) por 24 horas. \* $p < 0,05$  de acordo com teste *t-student*.

#### 5.4 ANÁLISE NO PERFIL DE EXPRESSÃO/ATIVACÃO DE ERK

Os níveis de expressão proteica de ERK e p-ERK foram investigados por *immunoblot* e diferenças significativas não foram evidenciadas ao comparar os resultados obtidos nos grupos tratados e controles (FIGURA 16). Os dados mostraram que **LASSBio-2029** não modula os níveis de expressão e o perfil de ativação de ERK, pelo menos, nas condições experimentais avaliadas.

**Figura 16** – Expressão de p-ERK e ERK determinada por *western blotting*



**Fonte:** Elaborado pelo autor (2022).

**Nota:** (A) Imagem ilustrativa evidenciando as bandas imunoreativas de ERK e p-ERK. (B) Análise quantitativa realizada pelo *ImageJ* após 24 horas de tratamento com **LASSBio-2029** a 30  $\mu$ M.

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou os efeitos de derivados *N*-acilidrazônicos **LASSBio-2027**; **LASSBio-2028**; **LASSBio-2029** e **LASSBio-2052** (PAULI *et al.*, 2020) sobre o comportamento proliferativo de células derivadas de câncer de mama (MCF-7), as quais expressam RE (ABDALLA *et al.*, 2020; AMIN *et al.*, 2016; JARIYAL *et al.*, 2021; KARAGULLE; YURTTAS, 2022; ORTIZ-MONTERO; LONDOÑO-VALLEJO; VERNOT, 2017; PESCATORI *et al.*, 2022; PIRSKO *et al.*, 2018; VIKRAM *et al.*, 2020).

As quatro substâncias avaliadas foram capazes de reduzir a taxa de viabilidade em culturas de MCF-7, contudo a substância **LASSBio-2029** foi a mais efetiva. De forma interessante, todas as substâncias avaliadas apresentaram baixa citotoxicidade frente a células normais (fibroblastos derivados de pele humana normal), indicando alta seletividade desses derivados *N*-acilidrazônicos para as células tumorais. Os dados obtidos são coerentes com outros estudos que investigaram a atividade antiproliferativa de inibidores de VEGFR2 (NI *et al.*, 2021; OKUMURA *et al.* 2018). Foi demonstrado que Ki8751, um inibidor de VEGFR2 inibiu a proliferação de células derivadas de câncer de colo uterino (HeLa S3) (OKUMURA *et al.* 2018) e de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) (NI *et al.*, 2021).

Considerando os resultados iniciais com os protótipos **LASSBio (2027, 2028, 2029, 2052)**, novas investigações foram realizadas para avaliar os mecanismos associados à capacidade de **LASSBio-2029** reduzir a taxa de viabilidade de células MCF-7. A análise de progressão do ciclo celular mostrou que **LASSBio-2029** inibe a progressão do ciclo e induz morte celular. Houve aumento significativo nas populações G2/M e Sub-G1 em amostras tratadas com **LASSBio-2029** em relação às amostras do grupo controle. Resultados semelhantes foram observados por Ni e colaboradores (2021) que observaram aumento da população G2/M em culturas de células MCF-7 tratadas com Ki8751 por 24 horas.

A transição G2/M é altamente regulada e envolve a ativação de diferentes proteínas cinases, especialmente a CDK1, a qual é diretamente regulada pela ciclina B (HYDBRING; MALUMBRES; SICINSKI, 2016). Além disso, outras proteínas cinases são ativadas devem ser ativadas para orquestrar os eventos necessários para a entrada na mitose como as Auroras A e B, e a PLK1 (HYDBRING; MALUMBRES; SICINSKI, 2016; KAHL *et al.*, 2022; LIU *et al.*, 2020; WONG *et al.*,

2022). Assim, o perfil de expressão de reguladores da transição G2/M foi avaliada.

Os dados mostraram que houve significativa redução na abundância relativa de RNA mensageiro (RNAm) para *CNNB1* (ciclina B1) e *CDK1*. Redução dos níveis proteicos de ciclina B1 também foi observada em amostras tratadas com **LASSBio-2029**. Os dados mostram que o aumento da população G2/M observado por citometria de fluxo está associado à falta de estímulos apropriados para a transição G1/M devido à depleção parcial de complexos CDK1-ciclina B. Nós avaliamos o perfil de expressão de fosfo-Histona H3 (serina 10), a qual tem sido usada como um marcador de mitose, e observamos aumento significativo nos níveis de p-Histona H3 em culturas tratadas com **LASSBio-2029** indicando que as células foram capazes de entrar na mitose, contudo os eventos necessários à progressão e conclusão do processo de divisão parecem ter sido afetados pelo tratamento. Aumento dos níveis de histona H3 fosforilada foi observado em culturas de células tratadas com agentes que, direta ou indiretamente, perturbam a formação do fuso mitótico bipolar prejudicando a dinâmica de progressão pelas diferentes fases do processo de divisão (SILVA *et al.*, 2018; TSUDA *et al.*, 2017).

Em uma etapa subsequente, nós avaliamos os efeitos de **LASSBio-2029** sobre os microtúbulos e na dinâmica de progressão pelas fases da mitose. Os dados mostraram que houve aumento significativo de mitoses anormais com falhas na formação do fuso bipolar. Foi também observado aumento na frequência de células multinucleadas indicando que o processo de divisão não foi adequadamente concluído (CISSE *et al.*, 2019; SARKAR *et al.*, 2021). Assim sendo, nós investigamos o perfil de expressão das cinases mitóticas *AURKA*, *AURKB* e *PLK-1*, as quais estão envolvidas não apenas com a ativação de CDK1, mas também com eventos importantes para a progressão da mitose e citocinese (CHOU *et al.*, 2015; DIAZ-MORALLI *et al.*, 2013; KRENN; MUSACCHIO, 2015; LIN *et al.*, 2020; MANZIONE *et al.*, 2020; MARUMOTO; ZHANG; SAYA, 2005; WONG *et al.*, 2022). Além disso, os níveis de expressão de *CDKN1A* (p21) também foram avaliados, pois é bem conhecido que a expressão de p21 aumenta frente a diferentes tipos de estresse celular, incluindo inativação de cinases mitóticas (GEORGAKILAS *et al.*, 2017; KREIS *et al.*, 2014; TRAKALA *et al.*, 2013; TSUDA *et al.*, 2017).

A análise de expressão gênica mostrou que houve redução significativa na abundância de RNAm para *AURKA*, *AURKB* e *PLK-1* em amostras tratadas com **LASSBio-2029**. Ao passo que os níveis de RNAm para p21 aumentaram

significativamente em consequência ao tratamento. Tem sido amplamente descrito na literatura que inibição de Aurora B e *PKL1* induzem aumento de expressão de p21 (KREIS et al., 2009; TRAKALA et al., 2013; TSUDA et al., 2017). Estudo realizado por Trakala e colaboradores (2013) revelou que a deficiência de aurora B induz aumento significativo na expressão de p21. Os autores demonstraram que a redução de aurora B não impediu a entrada das células na mitose, mas que aumento na expressão de p21 e, conseqüentemente, a inativação ou inibição parcial de CDK1 contribuiu para que células (em prófase) saíssem prematuramente da mitose. Tsuda e colaboradores (2017) observaram efeitos similares quando trataram células de colo uterino (HeLa) com inibidores de Aurora B. No presente estudo, **LASSBio-2029** alterou significativamente a dinâmica de progressão pela mitose. Nós observamos aumento na frequência de células em divisão com fuso mitótico desorganizado e padrão alterado de empacotamento da cromatina, as quais foram classificadas como mitoses anormais. Esses eventos podem estar relacionados com a redução dos níveis de cinases mitóticas, pois efeitos similares foram observados quando células MCF-7 foram tratadas com alisertibe e danusertibe, os quais são inibidores de Auroras A/B (HOLE et al., 2015). Os autores observaram que essas substâncias inibiram a progressão do ciclo celular na transição G2/M devido a erros na formação do fuso mitótico e alinhamento dos cromossomos corroborando os nossos resultados.

De forma similar ao observado por Tsuda e colaboradores (2017), nós observamos que **LASSBio-2029** induziu aumento significativo na frequência de células multinucleadas e de células apoptóticas indicando que a correlação inversa dos níveis de expressão das cinases mitóticas e p21 pode ter contribuído para ativação sustentada do *checkpoint* mitótico, saída prematura da mitose e indução de apoptose.

Os dados obtidos no presente estudo são muito promissores considerando que **LASSBio-2029** inibiu, concomitantemente, a expressão de importantes alvos terapêuticos. Estudos recentes mostram que substâncias capazes de inibir a atividade de cinases mitóticas são úteis como agentes terapêuticos no combate ao câncer e estudos clínicos estão em andamento para avaliar a aplicabilidade clínica dessas substâncias (BORAH; REDDY, 2021; NIH, 2022). Tem sido proposto que a inibição de Auroras A/B representa uma estratégia terapêutica promissora para superar a resistência adquirida aos inibidores de aromatase (HOLE et al., 2015).

Estudos clínicos estão em andamento para avaliar a eficácia terapêutica do uso combinado de inibidores de aurora cinases com fármacos usados na terapia hormonal (NIH, 2022).

No presente estudo, o perfil de expressão das cinases mitóticas foi avaliado considerando a abundância de RNAm, de modo que o (s) alvo (s) molecular (es) de **LASSBio-2029** está (ão) associado (s) a repressão transcricional dos genes que codificam essas proteínas. É possível que **LASSBio-2029** tenha como alvo molecular FOXM1, um fator de transcrição da família *Forkhead box*, uma vez que muitos genes associados à transição G2/M são regulados transcionalmente por FOXM1, incluindo as cinases mitóticas (LEE *et al.*, 2018; PHAM *et al.*, 2021; VAZ *et al.*, 2021). Alternativamente, **LASSBio-2029** pode ter inibido a via de sinalização responsável pela transativação de FOXM1. Estudos mostram que FOXM1 pode ser ativado pelas vias MAPK/ERK, PI3K/AKT e JAK/STAT. No presente estudo, nós não evidenciamos redução significativa nos níveis de expressão e de ativação de ERK nas condições experimentais avaliadas. Novos estudos devem ser realizados para avaliar se **LASSBio-2029** atua sobre FOXM1 ou em eventos associados à sua transativação. Curiosamente, eventos similares aos observados neste estudo, como bloqueio do ciclo na fase M e alteração da maquinaria responsável pela formação do fuso mitótico e alinhamento dos cromossomos, foram observados por Okumura e colaboradores (2018) ao tratarem células HeLa S3 com inibidores de VEGFR2, indicando que os efeitos de **LASSBio-2029** podem ser consequentes da inibição da via de VEGFR2.

Atividade citotóxica de **LASSBio-2029** sobre células MCF-7 foi evidenciada nos ensaios de viabilidade celular e ensaios de citometria de fluxo onde foi possível observar aumento significativo da população Sub-G1. Subsequentemente, foi possível observar aumento significativo de células apoptóticas tanto em preparações citológicas marcadas com DAPI como pela detecção de células positivas para anexina V. Os dados indicam que **LASSBio-2029** foi efetivo em induzir apoptose em células MCF-7 e que esse efeito pode ter sido decorrente de perturbações causadas por **LASSBio-2029** na dinâmica de progressão do ciclo. Assim sendo, nós avaliamos o perfil de expressão de genes envolvidos na determinação de apoptose em resposta a estresse celular (via intrínseca). Foi observado redução significativa nos níveis de expressão de *BCL-2* indicando que houve aumento do raio BAX/BCL-2, o que favorece a ocorrência de apoptose (KREIS; LOUWEN; YUAN, 2019;

KUANG *et al.*, 2021; MANU *et al.*, 2019). Tem sido descrito que a ativação de p21 inibe a via JAK/STAT e, conseqüentemente, a repressão transcricional de *BCL-2* (KARIMIAN; AHMADI; YOUSEFI, 2016). Assim sendo, é possível que exista uma relação entre a inibição das AURKs, o aumento de p21 e a repressão de *BCL-2*. Contudo, a validação dessa hipótese deverá ser realizada em estudos subsequentes.

## 7 CONCLUSÃO

No presente estudo, a atividade antiproliferativa de derivados *N*-acilidrazônicos foi explorada. Os dados mostraram que **LASSBio-2029** foi a substância mais ativa em relação às demais substâncias avaliadas no momento inicial do estudo. A investigação dos mecanismos associados à atividade antiproliferativa de **LASSBio-2029** em células MCF-7 mostrou que essa substância inibe a progressão do ciclo celular devido a sua capacidade de modular a expressão de genes que regulam a transição G2/M e as fases iniciais da mitose. Os níveis de expressão de Ciclina B, CDK1, Auroras A/B e PLK-1 foram reduzidos, enquanto a expressão relativa de p21 aumentou em decorrência do tratamento. Dessa forma, **LASSBio-2029** alterou os mecanismos que regem a dinâmica de progressão do ciclo celular levando ao acúmulo de células nas fases iniciais da mitose. Os efeitos negativos de **LASSBio-2029** sobre a progressão do ciclo foram críticos para ativar a indução de apoptose pela via intrínseca, uma vez que foi observada diminuição significativa nos níveis de expressão de *BCL-2*. Os dados mostraram, portanto, que **LASSBio-2029** apresenta atividade antitumoral promissora suportando futuras investigações para avaliar sua contribuição como um protótipo candidato à fármaco antineoplásico frente ao câncer de mama.

## REFERÊNCIAS

- ABDALLA, A. N. *et al.* Significance of targeting VEGFR-2 and cyclin D1 in luminal-A breast cancer. **Molecules**, Basel, v. 25, n. 20, p. e4606, out. 2020.
- AESROY, R. *et al.* An Autocrine VEGF/VEGFR2 and p38 Signaling Loop Confers Resistance to 4-Hydroxytamoxifen in MCF-7 Breast Cancer Cells. **Molecular Cancer Research**, Philadelphia, v. 6, n. 10, p. 1630-1638, out. 2008.
- AKULA, S. M *et al.* RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/PTEN/AKT/mTORC1 and TP53 pathways and regulatory miRs as therapeutic targets in hepatocellular carcinoma. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, London, v. 23, n. 11, p. 915-929, nov. 2019.
- ALCON, C. *et al.* RE+ breast cancer strongly depends on MCL-1 and BCL-xL anti-apoptotic proteins. **Cells**, Basel, v. 10, n. 7, p. e1659, jul. 2021.
- AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). **Cancer and Figures**, Atlanta. 2019. Disponível em: <<http://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2019.html>>. Acesso em: 12 nov. 2020.
- AMIN, R. *et al.*  $\Delta$ Np63 $\alpha$  induces quiescence and downregulates the BRCA1 pathway in estrogen receptor-positive luminal breast cancer cell line MCF7 but not in other breast cancer cell lines. **Molecular oncology**, Cambridge, v. 10, n. 4, p. 575–593, nov. 2016.
- ANASTASIADI, Z. *et al.* Breast cancer in young women: an overview. **Updates in Surgery**, Milan, v. 69, n. 3, p. 313-317, set. 2017.
- ASATI, V.; MAHAPATRA, D. K.; BHARTI, S. K. PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: structural and pharmacological perspectives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 109, p. 314-341, jan. 2016.
- BARNUM, K. J.; O'CONNELL, M. J. Cell cycle regulation by checkpoints. **Methods in Molecular Biology**, New York, v. 1170, n. 1, p. 29-40, maio 2014.
- BECKMANN, M. W. *et al.* Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. **Journal of Molecular Medicine**, Berlin, v. 75, n. 6, p. 429-439, 1997.
- BEDARD, P. L. *et al.* Tumour heterogeneity in the clinic. **Nature**, London, v. 501, n. 7467, p. 355-364, set. 2013.
- BÍBLIA. Daniel. Português. *In*: **BÍBLIA Missionária**: Almeida Revista e Atualizada. 3. ed. (1993). Tatuí, SP: Casa Publicadora Brasileira: Sociedade Bíblica do Brasil, 2018. p. 859. Bíblia. A. T.

BOÉR, K. Fulvestrant in advanced breast cancer: evidence to date and place in therapy. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, London, v. 9, n. 7, p. 465-479, jul. 2017.

BORAH, N. A.; REDDY, M. M. Aurora kinase B inhibition: A potential therapeutic strategy for cancer. **Molecules**, Basel, v. 26, n. 7, p. e1981, abr. 2021.

BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 39, n. 11, p. 615-647, jan. 2003.

CEJALVO, J. M. *et al.* Clinical implications of the non-luminal intrinsic subtypes in hormone receptor-positive breast cancer. **Cancer Treatment Reviews**, London, v. 67, p. 63-70, jun. 2018.

CHIAPPA, M. *et al.* Present and future perspective on PLK1 inhibition in cancer treatment. **Frontiers in Oncology**, Lausanne, v. 12, p. 903016, jun. 2022.

CHOU, C. H. *et al.* AIBp regulates mitotic entry and mitotic spindle assembly by controlling activation of both Aurora-A and Plk1. **Cell cycle**, Georgetown, v. 14, n. 17, p. 2764-2776, jun. 2015.

CISSE, O. *et al.* Downregulation of class II phosphoinositide 3-kinase PI3K-C2 $\beta$  delays cell division and potentiates the effect of docetaxel on cancer cell growth. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR**, London, v. 38, n. 1, p. e472, nov. 2019.

CLAESSON-WELSH, L.; WELSH, M. VEGFA and tumour angiogenesis. **Journal of Internal Medicine**, Oxford, v. 273, n. 2, p. 114-127, fev. 2013.

COLICINO, E. G.; HEHNLY, H. Regulating a key mitotic regulator, polo-like kinase 1 (PLK1). **Cytoskeleton**, Hoboken, v. 75, n. 11, p. 481-494, nov. 2018.

CSERNI, G. Histological type and typing of breast carcinomas and the WHO classification changes over time. **Pathologica**, Genova, v. 112, n. 1, p. 25–41, mar. 2020.

CUZZIOL, C. I. *et al.* MicroRNAs as regulators of VEGFA and NFE2L2 in cancer. **Gene**, [s.l.], v. 759, n. 1, p. e144994, out. 2020.

DEGIRMENCI, U.; WANG, M.; HU, J. Targeting aberrant RAS/RAF/MEK/ERK signaling for cancer therapy. **Cells**, Basel, v. 9, n. 1, p. e198, jan. 2020.

DHANASEKARAN, N.; REDDY, E. Signaling by dual specificity kinases. **Oncogene**, Basingstoke, v. 17, p. 1447-1455, set. 1998.

DHANASEKARAN, R. *et al.* The MYC oncogene - the grand orchestrator of cancer growth and immune evasion. **Nature Reviews: Clinical Oncology**, London, v. 19, n. 1, p. 23-36, jan. 2022.

DIAZ-MORALLI, S. *et al.* Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v. 138, n. 2, p. 255-271, maio 2013.

ELKHOLI, R. *et al.* Putting the pieces together: How is the mitochondrial pathway of apoptosis regulated in cancer and chemotherapy? **Cancer & Metabolism**, California, v. 2, n. 1, p. e16, out. 2014.

ENGIN, A. Protein kinase-mediated decision between the life and death. **Advances in experimental medicine and biology**, New York, v. 1275, n. 1, p. 1-33, fev. 2021.

FERRARI, A. *et al.* A whole-genome sequence and transcriptome perspective on HER2-positive breast cancers. **Nature Communications**, London, v. 7, n. 1, p. e12222, jul. 2016.

FESIK, S. W. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. **Nature Reviews: Cancer**, London, v. 5, n. 11, p. 876-885, nov. 2005.

FISHER, D.; KRASINSKA, L. Explaining redundancy in CDK-mediated control of the cell cycle: Unifying the continuum and quantitative models. **Cells**, Basel, v. 11, n. 13, p. e2019, jun. 2022.

FLACH, K. D. *et al.* Endonuclease FEN1 coregulates ER $\alpha$  activity and provides a novel drug interface in tamoxifen-resistant breast cancer. **Cancer Research**, Chicago, v. 80, n. 10, p. 1914-1926, maio 2020.

FREEDMAN, R. A.; PARTRIDGE, A. H. Emerging Data and Current Challenges for Young, Old, Obese, or Male Patients with Breast Cancer. **Clinical Cancer Research**, Denville, v. 23, n. 11, p. 2647-2654, jun. 2017.

FUENTES, N.; SILVEYRA, P. Estrogen receptor signaling mechanisms. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, Amsterdam, v. 116, n. 1, p. 135-170, fev. 2019.

FURRUKH, M.; QURESHI, A. Treatment of breast cancer; Review and updates. **Journal of Ayub Medical College**, Abbottabad, v. 30, n. 2, p. 264-274, abr. 2018.

GEORGAKILAS, A. G.; MARTIN, O. A.; BONNER, W. M. P21: A two-faced genome guardian. **Trends in molecular medicine**, Oxford, v. 23, n. 4, p. 310-319, abr. 2017.

GHOBRAL, I. M.; WITZIG, T. E.; ADJEI, A. A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. **A Cancer Journal for Clinicians**, New York, v. 55, n. 3, p. 178-194, maio/jun. 2005.

GHOSH, S. *et al.* High levels of vascular endothelial growth factor and its receptors (VEGFR-1, VEGFR-2, neuropilin-1) are associated with worse outcome in breast cancer. **Human Pathology**, Philadelphia, v. 39, n. 12, p. 1835-1843, dez. 2008.

GILTANE, J. M.; BALKO, J. M. Rationale for targeting the Ras/MAPK pathway in triple-negative breast cancer. **Discovery Medicine**, Baltimore, v. 17, n. 95, p. 275-283, maio 2014.

GODOY-ORTIZ, A. *et al.* Deciphering HER2 breast cancer disease: Biological and clinical implications. **Frontiers in Oncology**, Lausanne, v. 9, p. e1124, out. 2019.

GONZALEZ-ANGULO, A. M.; BLUMENSCHNEIN, G. R. Jr. Defining biomarkers to predict sensitivity to PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors in breast cancer. **Cancer Treatment Reviews**, Amsterdam, v. 39, n. 4, p. 313-320, jun. 2013.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, Maryland Heights, v. 144, n. 5, p. 646-674, mar. 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, Maryland Heights, v. 100, n. 1, p. 57-70, jan. 2000.

HASAN, M. R. *et al.* Inhibition of VEGF induces cellular senescence in colorectal cancer cells. **International Journal of Cancer**, Genève, v. 129, n. 9, p. 2115-2123, nov. 2011.

HAYES, E. L.; LEWIS-WAMBI, J. S. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer: an overview of the proposed roles of noncoding RNA. **Breast Cancer Research**, London, v. 17, n. 1, p. 40, mar. 2015.

HOLE, S. *et al.* Aurora kinase A and B as new treatment targets in aromatase inhibitor-resistant breast cancer cells. **Breast Cancer Research and Treatment**, Boston, v. 149, n. 3, p. 715-726, fev. 2015.

HOLEN *et al.* In vivo models in breast cancer research: progress, challenges and future directions. **Disease Models & Mechanisms**, Cambridge, v. 10, n. 4, p. 359-371, abr. 2017.

HOSFORD, S. R.; MILLER, T. W. Clinical potential of novel therapeutic targets in breast cancer: CDK4/6, Src, JAK/STAT, PARP, HDAC, and PI3K/AKT/mTOR pathways. **Pharmacogenomics and Personalized Medicine**, Auckland, v. 7, p. 203-215, ago. 2014.

HYDBRING, P.; MALUMBRES, M.; SICINSKI, P. Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 17, n. 5, p. 280-292, maio 2016.

INAL, A. *et al.* Endocrine therapy alone vs. chemotherapy plus endocrine therapies for the treatment of elderly patients with endocrine-responsive and node positive breast cancer: a retrospective analysis of a multicenter study (Anatolian Society of Medical Oncology). **Official Journal of the Balkan Union of Oncology**, Athens, v. 18, n. 1, p. 64-69, jan./mar. 2013.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Ministério da Saúde. **Estatísticas de Câncer/Estimativa de câncer 2020**, [S.l: s.n.], 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa/introducao#:~:text=A%20mais%20recente%20estimativa%20mundial,c%C3%A2nceres%20de%20pele%20n%C3%A3o%20melanoma>). Acesso em: 05 dez. 2020.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Ministério da Saúde. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**, [S.l: s.n.], 2019. Disponível em: [http://www.oncoguia.org.br/pub/3\\_conteudo/2020/estimativa\\_cancer\\_2020.pdf](http://www.oncoguia.org.br/pub/3_conteudo/2020/estimativa_cancer_2020.pdf). Acesso em: 06 jan. 2022.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Estimated number of incident cases and deaths Brazil, females, all ages (excl. NMSC)**, [S.l: s.n.], 2022. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/>. Acesso em: 31 mar. 2022.

JABER, M. I. *et al.* A deep learning image-based intrinsic molecular subtype classifier of breast tumors reveals tumor heterogeneity that may affect survival. **Breast Cancer Research**, London, v. 22, n. 1, p. 12, jan. 2020.

JADHAV, M. *et al.* Synthetic strategies of pyrimidine-based scaffolds as Aurora kinase and polo-like kinase inhibitors. **Molecules**, Basel, v. 26, n. 17, p. e5170, ago. 2021.

JARIYAL, H. *et al.* Comparative stemness and differentiation of luminal and basal breast cancer stem cell type under glutamine-deprivation. **Journal of Cell Communication and Signaling**, Netherlands, v. 15, n. 2, p. 207-222, jun. 2021.

JIN, X.; MU, P. Targeting Breast Cancer Metastasis. **Breast Cancer: Basic and Clinical Research**, Auckland, v. 9, n. 1, p. 23-34, set. 2015.

KAHL, I. *et al.* The cell cycle-related genes RHAMM, AURKA, TPX2, PLK1, and PLK4 are associated with the poor prognosis of breast cancer patients. **Journal of cellular biochemistry**, New York, v. 123, n. 3, p. 581-600, mar. 2022.

KALIMUTHO, M. *et al.* Targeted therapies for triple-negative breast cancer: combating a stubborn disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, Amsterdam, v. 36, n. 12, p.822-846, dez. 2015.

KARAGULLE, O. O.; YURTTAS, A. G. Ozone combined with doxorubicin exerts cytotoxic and anticancer effects on Luminal-A subtype human breast cancer cell line. **Journal of the Brazilian Medical Association**, São Paulo, SP, v. 68, n. 4, p. 507-513, abr. 2022.

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

KATZENELLENBOGEN, J. A. *et al.* Structural underpinnings of oestrogen receptor mutations in endocrine therapy resistance. **Nature Reviews: Cancer**, London, v. 18, n. 6, p. 377-388, jun. 2018.

KAWIAK, A.; KOSTECKA, A. Regulation of Bcl-2 family proteins in estrogen receptor-positive breast cancer and their implications in endocrine therapy. **Cancers**, Basel, v. 14, n. 2, p. 279, jan. 2022.

KETTENBACH, A. N. *et al.* Global assessment of its network dynamics reveals that the kinase Plk1 inhibits the phosphatase PP6 to promote Aurora A activity. **Science Signaling**, Washington, v. 11, n. 530, p. eaaq1441, maio 2018.

KIM, A. *et al.* Mutations of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Triple-Negative Breast Cancer. **Journal of Breast Cancer**, Seoul, v. 20, n. 2, p. 150-159, jun. 2017.

KIM, J. W. *et al.* Inhibition of tumor growth and angiogenesis of tamoxifen-resistant breast cancer cells by ruxolitinib, a selective JAK2 inhibitor. **Oncology Letters**, Athens, v. 17, n. 4, p. 3981-3989, abr. 2019.

KING, C. R.; KRAUS, M. H.; AARONSON, S. A. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. **Science**, New York, v. 229, n. 4717, p. 974-976, set. 1985.

KREIS, N. N. *et al.* Long-term downregulation of Polo-like kinase 1 increases the cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/CIP1). **Cell Cycle**, Georgetown, v. 8, n. 3, p. 460-472, fev. 2009.

KREIS, N. N. *et al.* p21Waf1/Cip1 deficiency causes multiple mitotic defects in tumor cells. **Oncogene**, Basingstoke, v. 33, n. 50, p. 5716-5728, abr. 2014.

KREIS, N. N.; LOUWEN, F.; YUAN, J. The multifaceted p21 (Cip1/Waf1/CDKN1A) in cell differentiation, migration and cancer therapy. **Cancers**, Basel, v. 11, n. 9, p. e1220, ago. 2019.

KRENN, V.; MUSACCHIO, A. The Aurora B kinase in chromosome bi-orientation and spindle checkpoint signaling. **Frontiers in Oncology**, Lausanne, v. 5, n. 1, p. 225, out. 2015.

KUANG, Y. *et al.* Multiple functions of p21 in cancer radiotherapy. **Journal of cancer research and clinical oncology**, Berlin, v. 147, n. 4, p. 987-1006, abr. 2021.

LABRE, L. V. Q. **Relação entre a presença de macrófagos no microambiente tumoral e fatores prognósticos em câncer de mama.** 2018. 121 f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical e Saúde Pública) - Universidade Federal de Goiás, Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde, Goiânia, GO, 2018.

LAVOIE, H.; GAGNON, J.; THERRIEN, M. ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, London, v. 21, n. 10, p. 607-632, out. 2020.

LEE, J. H. *et al.* Apoptotic effect of lambertianic acid through AMPK/FOXM1 signaling in MDA-MB231 breast cancer cells. **Phytotherapy research: PTR**, London, v. 32, n. 9, p. 1755–1763, set. 2018.

LEE, M. H. *et al.* Menadione induces G2/M arrest in gastric cancer cells by down-regulation of CDC25C and proteasome mediated degradation of CDK1 and cyclin B1. **American Journal of Translational Research**, Madison, v. 8, n. 12, p. 5246-5255, dez. 2016.

LI, C. I.; URIBE, D. J.; DALING, J. R. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. **British Journal of Cancer**, London, v. 93, n. 9, p. 1046-1052, out. 2005.

LIN, X. *et al.* The role of Aurora-A in human cancers and future therapeutics. **American Journal of Cancer Research**, Madison, v. 10, n. 9, p. 2705-2729, set. 2020.

LIU, K. *et al.* The role of CDC25C in cell cycle regulation and clinical cancer therapy: a systematic review. **Cancer cell international**, London, v. 20, n. 1, p. e213, jun. 2020.

LOO, L. S. W. *et al.* BCL-xL/BCL2L1 is a critical anti-apoptotic protein that promotes the survival of differentiating pancreatic cells from human pluripotent stem cells. **Cell Death & Disease**, London, v. 11, n. 5, p. e378, maio 2020.

LUND, R. R. *et al.* NADH-cytochrome b5 reductase 3 promotes colonization and metastasis formation and is a prognostic marker of disease-free and overall survival in estrogen receptor-negative breast cancer. **Molecular & Cellular Proteomics**, Bethesda, v. 14, n. 11, p. 2988-2999, nov. 2015.

LUQUE-CABAL, M. *et al.* Mechanisms behind the resistance to trastuzumab in HER2-amplified breast cancer and strategies to overcome it. **Clinical Medicine Insights: Oncology**, Auckland, v. 10, n. 1, p. 21-30, mar. 2016.

MAHARJAN, S. *et al.* Cell cycle arrest-mediated cell death by morin in MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cells. **Pharmacological Reports**, Kraków, v. 73, n. 1, p. 1315-1327, out. 2021.

MAJI, S. *et al.* Bcl-2 antiapoptotic family proteins and chemoresistance in cancer. **Advances in Cancer Research**, New York, v. 137, p. 37-75, dez. 2018.

MAKKI, J. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. **Clinical Medicine Insights Pathology**, Auckland, v. 8, p. 23-31, dez. 2015.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature Reviews Cancer**, London, v. 9, n. 3, p. 153-166, mar. 2009.

MANU, K. A. *et al.* P21cip1/waf1 coordinate autophagy, proliferation and apoptosis in response to metabolic stress. **Cancers**, Basel, v. 11, n. 8, p. 1112, ago. 2019.

MANZIONE, M. G. *et al.* Co-regulation of the antagonistic RepoMan: Aurora-B pair in proliferating cells. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 31, n. 6, p. 419-438, mar. 2020.

MARUMOTO, T.; ZHANG, D.; SAYA, H. Aurora-A - a guardian of poles. **Nature Reviews: Cancer**, London, v. 5, n. 1, p. 42-50, jan. 2005.

MATTHEWS, H. K.; BERTOLI, C.; DE BRUIN, R. A. M. Cell cycle control in cancer. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, London, v. 23, n. 1, p. 74-88, jan. 2022.

MAYER, I. A.; ARTEAGA, C. L. The PI3K/AKT Pathway as a Target for Cancer Treatment. **Annual Review of Medicine**, California, v. 67, n. 1, 11-28, out. 2016.

MEDEMA, R. H.; MACÛREK, L. Checkpoint control and cancer. **Oncogene**, New York, v. 31, n. 21, p. 2601-2613, maio 2012.

MERINO, D. *et al.* Pro-apoptotic Bim suppresses breast tumor cell metastasis and is a target gene of SNAI2. **Oncogene**, New York, v. 34, n. 30, p. 3926-3934, jul. 2015.

MILLER, B.; SEWELL-LOFTIN, M. K. Mechanoregulation of vascular endothelial growth factor receptor 2 in angiogenesis. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, Lausanne, v. 8, p. e804934, jan. 2021.

MURGA-ZAMALLOA, C.; INAMDAR, K. V.; WILCOX, R. A. The role of aurora A and polo-like kinases in high-risk lymphomas. **Blood advances**, Washington, v. 3, n. 11, p. 1778-1787, jun. 2019.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH (NIH). Studies found for: aurora inhibitors | breast câncer. [S.l: s.n.], **Clinical Trials.gov**, [2022?]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=breast+cancer&term=aurora+inhibitors&cntry=&state=&city=&dist=>. Acesso em: 14 ago. 2022.

NAYAK, G. *et al.* Developmental vascular regression is regulated by a Wnt/ $\beta$ -catenin, MYC, P21 (CDKN1A) pathway that controls cell proliferation and cell death. **Development**, Cambridge, v. 145, n. 12, p. dev154898, jun. 2018.

NI, H. *et al.* VEGFR2 inhibition hampers breast cancer cell proliferation via enhanced mitochondrial biogenesis. **Cancer Biology & Medicine**, Tianjin, v. 18, n. 1, p. 139-154, fev. 2021.

NILSSON, M. B. *et al.* A YAP/FOXM1 axis mediates EMT-associated EGFR inhibitor resistance and increased expression of spindle assembly checkpoint components. **Science Translational Medicine**, Washington, v. 12, n. 559, p. eaaz4589, set. 2020.

OKADA, Y. *et al.* Synthetic lethal interaction of CDK inhibition and autophagy inhibition in human solid cancer cell lines. **Oncology Reports**, Athens, v. 38, n. 1, p. 31-42, jul. 2017.

OKUMURA, D. *et al.* Inhibitors of the VEGF Receptor Suppress HeLa S3 Cell Proliferation via Misalignment of Chromosomes and Rotation of the Mitotic Spindle, Causing a Delay in M-Phase Progression. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 19, n. 12, p. 4014-4012, dez. 2018.

ONO, M.; KUWANO, M. Molecular mechanisms of epidermal growth factor receptor (EGFR) activation and response to gefitinib and other EGFR-targeting drugs. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, Denville, v. 12, n. 24, p. 7242-7251, dez. 2006.

ORTIZ-MONTERO, P.; LONDOÑO-VALLEJO, A.; VERNOT, J.-P. Senescence-associated IL-6 and IL-8 cytokines induce a self- and cross-reinforced senescence/inflammatory milieu strengthening tumorigenic capabilities in the MCF-7 breast cancer cell line. **Cell Communication and Signaling**, London, v. 15, n. 1, maio 2017.

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

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v. 29, n. 9, p. e45, maio 2001.

PARSONS, R.; SIMPSON, L. PTEN and cancer. *In*: EL-DEIRY, W. S. (ed). **Methods in Molecular Biology™: Tumor Suppressor Genes**. Totowa, NJ: Humana Press, 2003. v. 222, p. 147-166.

PAULI, F. P. *et al.* Novel VEGFR-2 inhibitors with an N-acylhydrazone scaffold. **Archiv Der Pharmazie**, Weinheim, v. 353, n. 11, p. e2000130, nov. 2020.

PEREIRA, B. *et al.* The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refines their genomic and transcriptomic landscapes. **Nature Communications**, London, v. 7, n. 1, p. e11479, maio 2016.

PEROU, C. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, London, v. 406, n. 1, p. 747-752, ago. 2000.

PESCATORI, S. *et al.* Clinically relevant CHK1 inhibitors abrogate wild-type and Y537S mutant ER $\alpha$  expression and proliferation in luminal primary and metastatic breast cancer cells. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, England, v. 41, n. 1, p. 141, abr. 2022.

PHAM, T. H. *et al.* Apigenin, a partial antagonist of the estrogen receptor (ER), inhibits ER-positive breast cancer cell proliferation through Akt/FOXO1 signaling. **International journal of molecular sciences**, Basel, v. 22, n. 1, p. 470, jan. 2021.

PIRSKO, V. *et al.* An effect of culture media on epithelial differentiation markers in breast cancer cell lines MCF7, MDA-MB-436 and SkBr3. **Medicina**, Kaunas, v. 54, n. 2, p. 11, 2018.

POULARD, C. *et al.* Oestrogen non-genomic signalling is activated in tamoxifen-resistant breast cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 20, n. 11, p. e2773, jun. 2019.

- QUE, H. F. *et al.* Effect of runing II on the growth and metastasis of transplanted tumor in mammary cancer-bearing mice and its mechanism. **Journal of Traditional Chinese Medicine**, Beijing, v. 28, n. 4, p. 293-298, dez. 2008.
- RAAB, C. A. *et al.* Non-mitotic functions of polo-like kinases in cancer cells. **Biochimica Et Biophysica Acta: Reviews On Cancer**, Amsterdam, v. 1875, n. 1, p. e188467, jan. 2021.
- RAAB, M. *et al.* Mitotic arrest and slippage induced by pharmacological inhibition of polo-like kinase 1. **Molecular Oncology**, Amsterdam, v. 9, n. 1, p. 140-154, jan. 2014.
- RAHA, P. *et al.* Combined histone deacetylase inhibition and tamoxifen induces apoptosis in tamoxifen-resistant breast cancer models, by reversing Bcl-2 overexpression. **Breast Cancer Research**, London, v. 17, n. 1, p. 26, fev. 2015.
- RAJENDRAN, B. K.; DENG, C. X. Characterization of potential driver mutations involved in human breast cancer by computational approaches. **Oncotarget**, Albany, v. 8, n. 30, p. 50252–50272, jul. 2017.
- RAMAKERS, C. *et al.* Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, Limerick, v. 339, n. 1, p. 62-66, mar. 2003.
- RANGANATHAN, P.; NADIG, N.; NAMBIAR, S. Non-canonical estrogen signaling in endocrine resistance. **Frontiers in Endocrinology**, Lousanne, v. 10, p. 708, out. 2019.
- ROBERTS, A. W.; WEI, A. H.; HUANG, D. C. S. BCL2 and MCL1 inhibitors for hematologic malignancies. **Blood**, Nova York, v. 138, n. 13, p. 1120–1136, out. 2021.
- RODRIGUEZ, D. *et al.* The Central Contributions of Breast Cancer Stem Cells in Developing Resistance to Endocrine Therapy in Estrogen Receptor (ER)-Positive Breast Cancer. **Cancers**, Basel, v. 11, n. 7, p. e1028, jul. 2019.
- ROUQUIER, S. *et al.* Expression of the microtubule-associated protein MAP9/ASAP and its partners AURKA and PLK1 in colorectal and breast cancers. **Disease Markers**, Chichester, v. 2014, n. 1, p. e798170, abr. 2014.
- ROUSSEL, M. F. The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. **Oncogene**, Basingstoke, v. 18, n. 38, p. 5311-5317, set. 1999.
- RYDÉN, L. *et al.* Tumor-specific VEGF-A and VEGFR2 in postmenopausal breast cancer patients with long-term follow-up. Implication of a link between VEGF pathway and tamoxifen response. **Breast Cancer Research and Treatment**, Boston, v. 89, n. 2, p. 135-143, jan. 2005.

SADREMOMTAZ, A. *et al.* Dual blockade of VEGFR1 and VEGFR2 by a novel peptide abrogates VEGF-driven angiogenesis, tumor growth, and metastasis through PI3K/AKT and MAPK/ERK1/2 pathway. **Biochimica Et Biophysica Acta: General Subjects**, v. 1862, n. 12, p. 2688-2700, dez. 2018.

SARKAR, S. *et al.* Mitotic checkpoint defects: En route to cancer and drug resistance. **Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology**, Amsterdam, v. 29, n. 2, p. 131-144, 2021.

SÉVENO, C. *et al.*  $\gamma$ -Secretase inhibition promotes cell death, NOXA upregulation, and sensitization to BH3 mimetic ABT-737 in human breast cancer cells. **Breast Cancer Research**, London, v. 14, n. 3, p. R96, jun. 2012.

SHERR, C. J.; ROBERTS, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 13, n.12, p. 1501-1512, jun. 1999.

SILVA, R. D. *et al.* Absence of the spindle assembly checkpoint restores mitotic fidelity upon loss of sister chromatid cohesion. **Current Biology**, London, v. 28, n. 17, p. 2837- 2844.e3, set. 2018.

SINGH, R.; LETAI, A.; SAROSIEK, K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, London, v. 20, n. 3, p. 175-193, mar. 2019.

SKEHAN, P *et al.* New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drugs creening. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, jul. 1990.

SLAMON, D. J. *et al.* Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. **Science**, New York, v. 235, n. 4785, p. 177-182, jan. 1987.

SONG, M. S.; SALMENA, L.; PANDOLFI, P. P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, London, v. 13, n. 5, p. 283-296, abr. 2012.

SØRLIE, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 19, p. 10869-10874, set. 2001.

SØRLIE, T. *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, n. 14, p. 8418-8423, jun. 2003.

STEPHEN, R. M. *et al.* Monitoring the development of xenograft triple-negative breast cancer models using diffusion-weighted magnetic resonance imaging. **Experimental biology and medicine**, Maywood, v. 237, n. 11, p. 1273-1280, nov. 2012.

SUN, Y. S. *et al.* Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. **International Journal of Biological Sciences**, Lake Haven, v. 13, n. 11, p. 1387-1397, nov. 2017.

THANG, N. X. *et al.* Epigenetic factors as etiological agents, diagnostic markers, and therapeutic targets for luminal breast cancer. **Biomedicines**, Basel, v. 10, n. 4, p. 748, mar. 2022.

THOMAS, S. *et al.* Targeting the Bcl-2 family for cancer therapy. **Expert opinion on therapeutic targets**, London, v. 17, n. 1, p. 61-75, jan. 2013.

TRAKALA, M. *et al.* Aurora B prevents delayed DNA replication and premature mitotic exit by repressing p21(Cip1). **Cell Cycle**, Georgetown, v. 12, n. 7, p. 1030-1041, abr. 2013.

TSUDA, Y. *et al.* Mitotic slippage and the subsequent cell fates after inhibition of Aurora B during tubulin-binding agent-induced mitotic arrest. **Scientific Reports**, London, v. 7, n. 1, p. e16762, dez. 2017.

VAZ, S. *et al.* FOXM1 repression increases mitotic death upon antimitotic chemotherapy through BMF upregulation. **Cell Death & Disease**, London, v. 12, n. 6, p. 542, maio 2021.

VIKRAM, R. *et al.* Tumorigenic and metastatic role of CD44-/low/CD24-/low cells in luminal breast cancer. **Cancers**, Basel, v. 12, n. 5, p. 1239, maio 2020.

VILLARREAL-GARZA, C. *et al.* Molecular subtypes and prognosis in young mexican women with breast cancer. **Clinical Breast Cancer**. Dallas, v. 17, n. 3, p. e95-e102, jun. 2016.

VUONG, D. *et al.* Molecular classification of breast cancer. **Virchows Archiv: An International Journal of Pathology**, Berlin, v. 465, n. 1, p. 1-14, jul. 2014.

VURAL, S.; WANG, X.; GUDA, C. Classification of breast cancer patients using somatic mutation profiles and machine learning approaches. **BioMed Central Systems Biology**, California, v. 10, n. (Suppl3), p. 62, ago. 2016.

WAKS, A. G. *et al.* Breast Cancer Treatment: A Review. **The Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 321, n. 3, p. 288-300, jan. 2019.

WANG, C. *et al.* Effect of CDK1 interferes with the regulation of PLK1, Aurora B and TRF1 on the proliferation of leukemia cells. **Journal of Experimental Hematology**, Beijing, v. 29, n. 4, p. 1129-1135, ago. 2021.

WANG, J. *et al.* PIK3CA mutations and downstream effector p-mTOR expression: implication for prognostic factors and therapeutic targets in triple negative breast cancer. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, Madison, v. 10, n. 7, p. 7682-7691, jul. 2017.

WANG, J.; BOXER, L. M. Regulatory elements in the immunoglobulin heavy chain gene 3'-enhancers induce c-myc deregulation and lymphomagenesis in murine B cells. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 280, n. 13, p. 12766-12773, abr. 2005.

WANG, K. Molecular mechanisms of hepatic apoptosis. **Cell Death & Disease**, London, v. 5, n. 1, p. e996, jan. 2014.

WANG, Y. H. *et al.* Knockdown of c-Myc expression by RNAi inhibits MCF-7 breast tumor cells growth in vitro and in vivo. **Breast Cancer Research**, London, v. 7, n. 2, p. R220-228, dez. 2005.

WEIGELT, B. *et al.* Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis. **The Lancet Oncology**, London, v. 11, n. 4, p. 339-349, abr. 2010.

WEINBERG, R. A. Mechanisms of malignant progression. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 29, n. 6, p. 1092-1095, jun. 2008.

WONG, S. S. *et al.* Centrioles generate a local pulse of Polo/PLK1 activity to initiate mitotic centrosome assembly. **The EMBO Journal**, Eynsham, v. 41, n. 11, p. e110891, jun. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Cancer fact sheets 2020**. [S.l: s.n.], 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>. Acesso em: 31 mar. 2021.

XU, J. *et al.*  $\beta$ -catenin regulates c-Myc and CDKN1A expression in breast cancer cells: B-CATENIN REGULATES c-Myc AND CDKN1A. **Molecular carcinogenesis**, New York, v. 55, n. 5, p. 431-439, maio 2016.

YAO, H. *et al.* Triple-negative breast cancer: is there a treatment on the horizon? **Oncotarget**, Albany, v. 8, n. 1, p. 1913-1924, jan. 2017.

YIN, L. *et al.* Disruption of the ER- $\alpha$ 36-EGFR/HER2 positive regulatory loops restores tamoxifen sensitivity in tamoxifen resistance breast cancer cells. **PloS one**, San Francisco, v. 9, n. 9, p. e107369, set. 2014.