



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**

**Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG**

Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 . Alfenas /MG. CEP 37130-000

Fone: (35) 3299-1000. Fax (35) 3299 – 1063



**JULIA LOUISE MOREIRA NACIF**

**ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE DERIVADOS SULFONILADOS DE  
GONIOTALAMINA E PIPLARTINA EM CÉLULAS MCF-7: INDUÇÃO DE  
ESTRESSE OXIDATIVO E DANOS AO DNA**

**ALFENAS/MG**

**2024**

**JULIA LOUISE MOREIRA NACIF**

**ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE DERIVADOS SULFONILADOS DE  
GONIOTALAMINA E PIPLARTINA EM CÉLULAS MCF-7: INDUÇÃO DE  
ESTRESSE OXIDATIVO E DANOS AO DNA**

Dissertação 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: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marisa Ionta  
Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Ferro Aissa

**ALFENAS/MG**

**2024**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central

Nacif , Julia Louise Moreira .

Atividade antiproliferativa de derivados sulfonilados de goniotalamina e piplartina em células MCF-7: indução de estresse oxidativo e danos ao DNA / Julia Louise Moreira Nacif . - Alfenas, MG, 2024.

79 f. : il. -

Orientador(a): Marisa Ionta .

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) -  
Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2024.

Bibliografia.

1. Câncer de mama . 2. Goniotalamina . 3. Piplartina/Piperlongumina .  
4. Proliferação Celular . 5. Apoptose . I. Ionta , Marisa, orient. II. Título.

**JULIA LOUISE MOREIRA NACIF**

**ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE DERIVADOS SULFONILADOS DE  
GONIOTALAMINA E PIPLARTINA EM CÉLULAS MCF-7: INDUÇÃO DE  
ESTRESSE OXIDATIVO E DANOS AO DNA**

O (a) Presidente da Banca Examinadora abaixo  
assina a aprovação da Dissertação 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.

Aprovada em: 16 de fevereiro de 2024

Profa. Dra. Marisa Ionta  
Presidente da Banca Examinador  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)

Profa Dra. Débora Barbosa Vendramini Costa  
Instituição: Michigan State University Health Sciences

Profa Dra. Catia Lira do Amaral  
Instituição: Universidade Estadual de Goiás (UEG)



Documento assinado eletronicamente por **Marisa Ionta, Professor do Magistério Superior**, em 18/02/2024, às 19:58, 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 **1184727** e o código CRC **BB1B17E5**.

---

À minha mãe, eu só cheguei até aqui porque  
“carrego seu coração comigo, eu o carrego  
no meu coração”.

## AGRADECIMENTOS

À Deus e meus guias espirituais, por todas as bênçãos e aprendizados e por permitirem que eu viva meu propósito com confiança, dedicação e fé. Gratidão.

À minha mãe, Cláudia. Escrevi um texto de mais de setenta páginas e a parte mais difícil é encontrar palavras que expressem o quão sou a pessoa mais feliz e grata do mundo simplesmente por ser sua filha. Você é minha companhia preferida, meu melhor colo, meu maior amor. Você foi fundamental para este trabalho, assim como é em todas as fases da minha vida. Obrigada.

Ao meu pai Adriel, por sempre me incentivar e apoiar os caminhos pelos quais escolho seguir. Espero ser pra sempre sua menininha e motivo do seu orgulho.

Ao Moises, por ter me criado para que eu acreditasse que poderia conquistar o mundo, acho que finalmente posso dizer que é assim que eu me sinto.

Ao meu irmão Humberto, por ser meu exemplo e minha inspiração. Obrigada pela amizade, pelos conselhos e acima de tudo por caminhar sempre ao meu lado.

Aos meus avós, Geraldo e Maria Helena, por serem meu lar, pra onde eu sempre volto para me sentir segura, amada e feliz. Obrigada por serem os melhores do mundo!

À Vovó Amélia (*in memoriam*), seus conselhos, suas histórias e seu amor continuam sendo meus maiores guias.

Aos meus tios, em especial Tia Tata, Tia Clarice e Tio Moises, pelas orações e pelo apoio e carinho incondicionais.

À minha prima e grande amiga Angélica e aos meus amigos, Júlia, Thati, Lucas, Raquel, Stephanie, Milena, Rafaela e Pedro, por torcerem tanto por mim e pela paciência em me ouvir falando sobre “minhas células”.

Ao Teco, por acreditar em mim (muitas vezes mais que eu mesma), e pelo carinho e apoio ao longo dessa jornada.

À toda equipe LAPAN:

À Marisa Ionta, minha orientadora, pela oportunidade e confiança, pela autonomia e apoio e pelos ensinamentos que levarei pra vida profissional e pessoal. Obrigada.

Ao Alexandre Aissa, meu coorientador, por todos os ensinamentos.

Ao nosso colaborador Ronaldo Pilli por ter cedido gentilmente as moléculas testadas neste estudo.

Ao Bruno Zavan, sem o qual este trabalho não existiria, obrigada por “me ajudar a pensar”, ser meu guia, por me ensinar tanto e ter tornado tudo mais simples e com certeza mais divertido.

À Luiza Mello, pela amizade, carinho e conselhos. Por tornar os dias no laboratório mais leves e felizes e por todo apoio. Esse trabalho é nosso!

À Carol, obrigada por ter me acolhido no laboratório e por ter me ensinado a execução de tantos experimentos.

À Simone, por todo carinho e compartilhar comigo as alegrias e frustrações do dia-a-dia de uma cientista.

À Juliana Martins, pelo cuidado com nosso laboratório e ensinamentos.

À Josi, Sandra e Bia, pelas boas risadas e momentos de distração na “nossa cozinha”.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde, à coordenação, à secretaria e ao corpo docente por toda contribuição com a minha formação profissional.

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

“Você tem que ter imaginação e o coração forte.  
Tentar coisas que podem não funcionar. E não  
pode deixar ninguém definir seus limites. Seu  
único limite é a sua alma.”  
(Gusteau, Ratatouille)

## RESUMO

O câncer é a segunda maior causa de mortes do mundo, sendo o câncer de mama o mais frequente entre as mulheres. O câncer de mama é uma doença complexa e heterogênea compreendendo diferentes subtipos de tumores. A introdução de novas abordagens terapêuticas tem contribuído para aumentar a qualidade de vida e a taxa de sobrevivência dos pacientes, contudo é muito frequente a resistência aos fármacos disponíveis. Portanto, é imprescindível ampliar o arsenal terapêutico para o câncer de mama. Nesse contexto, os produtos naturais têm sido amplamente explorados, visto que muitos fármacos antineoplásicos são de origem natural ou foram obtidos a partir de protótipos naturais. Assim sendo, o presente estudo tem por objetivo investigar o potencial antitumoral de derivados sulfonilados de goniotalamina (composto **3**) e de piplartina (composto **6**) frente à linhagem celular de câncer de mama MCF-7. O mecanismo de ação destes compostos nas células tumorais foi investigado por meio de ensaios avaliando a viabilidade celular, capacidade clonogênica, progressão do ciclo celular, senescência, apoptose, estresse oxidativo e expressão gênica de proteínas relacionadas a estes processos. Os resultados mostraram que os compostos **3** e **6** são mais citotóxicos frente à linhagem MCF-7 em relação à linhagem não tumoral CCD-1059Sk (fibroblastos derivados de pele). Os compostos também inibiram completamente a capacidade de formar colônias na linhagem MCF-7. A atividade antiproliferativa dos compostos estudados foi parcialmente prevenida na presença do antioxidante N-acetilcisteína. O composto **3** alterou a dinâmica de progressão do ciclo celular induzindo acúmulo de células nas fases G0/G1 e G2/M, dependendo da concentração utilizada. O composto **6**, a 3,5 $\mu$ M, promoveu aumento da população G2/M e diminuição na frequência de células na fase S em comparação aos grupos controle. Enquanto a 7,0  $\mu$ M, o composto **6** foi citotóxico para as células MCF-7, como demonstrado pelo aumento da população sub-G1 e aumento na frequência de células apoptóticas. As atividades antiproliferativa e pró-apoptótica foram associadas à capacidade dos compostos estudados em modular o perfil de expressão gênica de reguladores do ciclo celular e apoptose (*CDKN1A*, *MYC*, *CCNB1*, *CCND1*, *BAX* e *BCL2*) em resposta ao estresse oxidativo e danos ao DNA. O composto **3** induziu senescência celular, enquanto o composto **6** modulou as vias de sinalização PI3K/AKT e MAPK/ERK e induziu apoptose. Dessa forma, estes compostos representam protótipos interessantes para o desenvolvimento de fármacos contra o câncer de mama.

**Palavras-chave:** Câncer de mama; Goniotalamina; Piplartina/ Piperlongumina; Proliferação celular; Apoptose.

## ABSTRACT

Cancer is the second leading cause of death in the world and breast cancer is the most common among women. Breast cancer is a complex and heterogeneous disease comprising different tumor subtypes. The introduction of new therapeutic approaches has contributed to increase the quality of life and the survival rate of patients, but resistance to the available drugs is very frequent, therefore it is important to expand the available therapeutic arsenal for breast cancer. In this context, natural products have been widely explored, as many antineoplastic drugs are of natural origin or were obtained from natural prototypes. Therefore, the present study aims to explore the antitumor potential of sulfonyl derivatives of goniothalamin (compound **3**) and pipartine (compound **6**) on MCF-7 breast cancer cell line. The mechanism of action of these compounds on tumor cells was investigated through assays evaluating cell viability, clonogenic capacity, cell cycle progression, senescence, apoptosis, oxidative stress and gene expression of proteins related to these processes. The results obtained showed that compounds **3** and **6** are more cytotoxic against the MCF-7 cell line compared to the non-tumor cell line CCD-1059Sk (skin-derived fibroblasts). The compounds also completely inhibited colony formation on MCF-7 cell line. The antiproliferative activity of the studied compounds was partially prevented in the presence of the antioxidant N-acetylcysteine. Compound **3** altered the dynamics of cell cycle progression, inducing accumulation of cells in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub>/M phases, depending on the concentration used. Compound **6** at 3.5 μM promoted an increase in the G<sub>2</sub>/M population and a decrease in the frequency of cells in the S phase compared to the control groups. At 7.0 μM, compound **6** was cytotoxic against MCF-7, as demonstrated by an increase in the sub-G<sub>1</sub> population and an increase in the frequency of apoptotic cells. The antiproliferative and pro-apoptotic activities were associated with the ability of the studied compounds to modulate the gene expression profile of cell cycle and apoptosis regulators (*CDKN1A*, *MYC*, *CCNB1*, *CCND1*, *BAX* and *BCL2*) in response to oxidative stress and DNA damage. Compound **3** induced cellular senescence, while compound **6** modulated the PI3K/AKT and MAPK/ERK signaling pathways and induced apoptosis. Therefore, these compounds represent interesting prototypes for the development of drugs against breast cancer.

**Keywords:** Breast cancer; Goniothalamin; Pipartine/Piperlongumine; Cell proliferation; Apoptosis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Dados epidemiológicos do câncer .....	19
Figura 2 – Estruturas químicas dos produtos naturais goniotalamina (GTN) e piplartina (PPT) de seus derivados.....	28
Figura 3 – Rotas de síntese para obtenção dos derivados sulfonilados de GTN e PPT.....	28
Figura 4 – Curvas dose-resposta obtidas pelo ensaio de viabilidade por SRB.....	37
Figura 5 – Análise morfológica (composto <b>3</b> ) .....	38
Figura 6 – Análise morfológica (composto <b>6</b> ) .....	39
Figura 7 – Ensaio de capacidade clonogênica .....	40
Figura 8 – Análise de progressão do ciclo celular (composto <b>3</b> ) .....	41
Figura 9 – Análise de progressão do ciclo celular (composto <b>6</b> ) .....	42
Figura 10 – Análise da expressão gênica de reguladores do ciclo celular (composto <b>3</b> ).....	44
Figura 11– Análise da expressão gênica de reguladores do ciclo celular (composto <b>6</b> ).....	46
Figura 12 – Eventos celulares observados por imunofluorescência.....	48
Figura 13 –Atípias nucleares observadas por imunofluorescência.....	49
Figura 14 – Análise dos eventos celulares (compostos <b>3</b> e <b>6</b> ).....	50
Figura 15 – Imagens de imunofluorescência (composto <b>3</b> ) .....	51
Figura 16 – Imagens de imunofluorescência (composto <b>6</b> ) .....	52
Figura 17 – Análise do ensaio de anexina V (compostos <b>3</b> e <b>6</b> ) .....	53
Figura 18 – Análise da expressão gênica de reguladores da apoptose.....	54
Figura 19 – Análise morfológica e marcação $\beta$ -gal (composto <b>3</b> ).....	55
Figura 20 –Análise senescência (composto <b>3</b> ).....	55
Figura 21 – Análise da viabilidade celular com NAC .....	56
Figura 22 – Análise do ensaio CellROX .....	57
Figura 23 – Análise expressão p-Histona H2A.X .....	58

Figura 24 – Imagens expressão p-Histona H2A.X (composto <b>3</b> ).....	59
Figura 25 – Imagens expressão p-Histona H2A.X (composto <b>6</b> ).....	60
Figura 26 – Análise da expressão de proteínas alvo (composto <b>3</b> ) .....	61
Figura 27 – Análise da expressão de proteínas alvo (composto <b>6</b> ) .....	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência de nucleotídeos dos <i>primers</i> utilizados na qPCR .....	33
Tabela 2 – Relação dos anticorpos utilizados e especificações .....	35
Tabela 3 – Valores de IC <sub>50</sub> (μM) dos compostos <b>(1)</b> , <b>(3)</b> , <b>(4)</b> , <b>(6)</b> .....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\beta$ -gal	$\beta$ -galactosidase
AKT	Proteína cinase B
APAF-1	Fator 1 de ativação da protease apoptótica
ATM	<i>Ataxia-telangiectasia mutated kinase</i>
ATR	<i>ATM and Rad3 related kinase</i>
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
<i>BCL2</i>	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BRCA1	<i>Breast cancer gene 1</i>
BRCA2	<i>Breast cancer gene 2</i>
<i>CCNB1</i>	Gene que codifica ciclina B1
<i>CCND1</i>	Gene que codifica ciclina D1
<i>CDKN1A</i>	Gene que codifica p21
CDKs	<i>Cyclin-dependent kinases</i>
CKI	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor</i>
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DAPI	4',6-diamidino-2-fenil-indol
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DUSPs	<i>Dual-specificity phosphatases</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GSH	Glutationa reduzida

GTN	Goniotalamina
HER2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor-type 2</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória média
IgG	Imunoglobulina G
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
NAC	<i>N-acetyl cysteine</i>
PBS	Phosphate-buffered saline
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PPT	Piplartina
PRDX4	Peroxirredoxina-4
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RE	Receptores de estrógeno
RP	Receptores de progesterona
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SFB	Soro fetal bovino
SRB	Sulforodamina B
TN	Triplo-negativo
TrxR1	Tiorredoxina redutase 1

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>19</b>
2.1	CÂNCER DE MAMA	19
2.2	REGULAÇÃO DO CICLO CELULAR	22
2.3	PRODUTOS NATURAIS	24
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
3.1	OBJETIVO GERAL	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>27</b>
4.1	LINHAGEM CELULAR E CONDIÇÕES DE CULTIVO	27
4.2	OBTENÇÃO DOS DERIVADOS SULFONILADOS DE GTN E PPT	27
4.3	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	29
4.4	ENSAIO DE CAPACIDADE CLONOGÊNICA	29
4.5	ANÁLISE DA PROGRESSÃO NO CICLO CELULAR	30
4.6	ANÁLISE DE ELEMENTOS DO CITOESQUELETO E MORFOLOGIA NUCLEAR	30
4.7	ENSAIO DE ANEXINA V	31
4.8	ENSAIO DE SENESCÊNCIA CELULAR	31
4.9	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	31
4.10	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE P-HISTONA H2.AX	32
4.11	qPCR	32
4.12	WESTERN BLOTTING	33
4.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>36</b>
5.1	ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA	36
5.2	DINÂMICA DE PROGRESSÃO NO CICLO CELULAR	40
5.3	MORFOLOGIA NUCLEAR E DO CITOESQUELETO	47
5.4	INDUÇÃO DE APOPTOSE	52
5.5	INDUÇÃO DE SENESCÊNCIA	54
5.6	INDUÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO	56
5.7	EFEITO NA INDUÇÃO DE DANOS AO DNA	58

5.8	VIAS DE SINALIZAÇÃO ASSOCIADAS À PROLIFERAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA CELULAR.....	60
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>69</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>70</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença complexa que surge em decorrência de uma série de alterações genéticas e epigenéticas, as quais comprometem a funcionalidade de genes relacionados à proliferação e sobrevivência celular (Hanahan, 2022; Hanahan; Weinberg, 2000). De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde, os cânceres de mama e de pulmão são os mais incidentes no mundo (World Health Organization, 2022). No Brasil, o câncer de mama é o mais frequente entre as mulheres, exceto câncer de pele não melanoma (Santos *et al.*, 2023).

O câncer de mama é altamente heterogêneo e compreende diferentes subtipos de tumor, os quais apresentam características moleculares e histológicas distintas. Os receptores hormonais (receptores de estrogênio, RE; e de progesterona, RP) e o receptor do fator de crescimento epidermal humano 2 (HER2) representam marcadores de diagnóstico e prognóstico para o câncer de mama (Prat; Perou, 2011; Holen *et al.*, 2017). De acordo com análises de imuno-histoquímica, os tumores de mama são classificados em: a) Receptores hormonais positivos (RE+; RP +); b) HER2+ e c) triplo negativo (TN) (Holen *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2017a; Waks *et al.*, 2019). De acordo com o perfil molecular, os tumores são classificados em: luminal A, luminal B, basal-símile, *claudin-low* e normal-símile, os quais apresentam distintas evoluções clínicas (Sorlie *et al.*, 2001).

Os tumores RE+ são os mais frequentemente diagnosticados e, no geral, apresentam bom prognóstico (Luque-Cabal *et al.*, 2016). Inibidores seletivos de RE (tamoxifeno, por exemplo) e inibidores de aromatase (anastrozol e letrozol) são frequentemente utilizados no tratamento de tumores RE+. Contudo, uma parcela das pacientes não responde ao tratamento ou adquire resistência ao longo do tempo (Kalimutho *et al.*, 2015; Holen *et al.*, 2017). Os tumores HER2+ são tratados com inibidores de proteínas cinases e anticorpos sintéticos (Harbeck; Gnant, 2017). Embora as respostas clínicas às terapias alvo-dirigidas sejam promissoras no início do tratamento, as células tumorais tornam-se resistentes, o que contribui para a progressão da doença (Draganescu; Carmocan, 2017). Os tumores TN são tratados com substâncias citotóxicas e as respostas clínicas são extremamente modestas (Baglia *et al.*, 2018; Núñez Abad *et al.*, 2021).

A ineficácia dos protocolos terapêuticos está associada à elevada heterogeneidade tumoral, aos múltiplos aspectos fisiopatológicos da doença e à resistência das células tumorais aos fármacos disponíveis. Assim sendo, é imperativo a busca por novos agentes que possam melhorar as propostas de tratamento para o câncer de mama.

As propriedades farmacológicas de produtos naturais têm sido amplamente exploradas. Muitos fármacos foram obtidos a partir de protótipos naturais e seus derivados, incluindo os agentes antineoplásicos (Newman; Cragg, 2020). Estudos mostram que a goniotalamina (GTN) e a piplartina (PPT) têm potente atividade citotóxica sobre linhagens celulares derivadas de cânceres humanos, contudo essas substâncias naturais apresentam baixa seletividade e baixa solubilidade, respectivamente, fatores que impossibilitam sua aplicabilidade clínica (Seyed; Jantan; Bukhari, 2014; Piska *et al.*, 2018).

Assim sendo, essas substâncias foram utilizadas como precursoras para a obtenção de derivados sulfonilados de GTN e PPT, a fim de alterar algumas de suas características físico-químicas e torná-las mais compatíveis com protótipos usados na prática clínica. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antiproliferativo de derivados sulfonilados de GTN e PPT sobre células tumorais de câncer de mama.

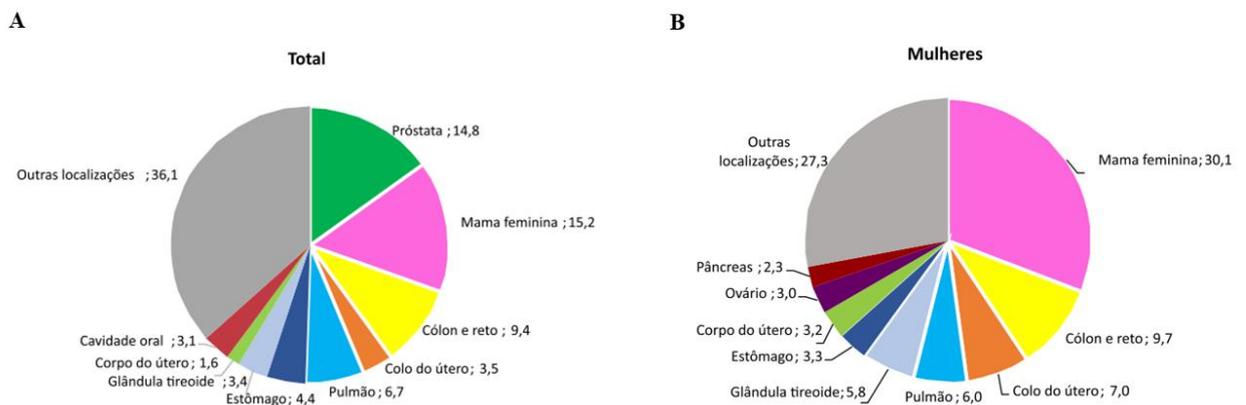
## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 CÂNCER DE MAMA

O desenvolvimento do câncer está associado a fatores de risco genéticos e ambientais, os quais são determinantes para que a célula adquira capacidade de proliferação, sobrevivência e invasão anormais, se tornando maligna e promovendo o crescimento tumoral (Hanahan, 2022; Sarkar *et al.*, 2013). Esta doença é uma das maiores causas de morte no mundo e representa um problema de saúde pública. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde, em 2020, o câncer foi a causa de 10 milhões de mortes no mundo e as maiores taxas de mortalidade foram referentes aos cânceres de pulmão, cólon e reto, fígado, estômago e mama. Enquanto os tipos mais incidentes foram câncer de mama, pulmão, cólon e reto e próstata (WHO, 2022).

No Brasil, as estimativas para o triênio 2023-2025 são de 704 mil novos casos de câncer, sendo que, excluindo o câncer de pele não melanoma, os mais incidentes são os cânceres de mama (73 mil novos casos) e de próstata (71 mil novos casos), seguidos pelos cânceres de cólon e reto, traqueia, brônquio e pulmão e estômago (Figura 1A). O câncer que mais acomete mulheres é o câncer de mama, correspondendo a 30,1 % (Figura 1B) (Santos *et al.*, 2023).

Figura 1 – Dados epidemiológicos do câncer



Fonte: Santos *et al.* (2023, p.7)

Legenda: (A) Distribuição proporcional (%) dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023, exceto câncer de pele não melanoma. (B) Distribuição proporcional (%) dos dez tipos de câncer mais incidentes em mulheres estimados para 2023, exceto câncer de pele não melanoma.

O processo de transformação maligna envolve uma série de alterações genéticas e epigenéticas que modificam o comportamento celular, levando à proliferação descontrolada, resistência à morte celular, e capacidade de invadir tecidos saudáveis (Lambert; Pattabiraman; Weinberg, 2017). Além disso, as células tumorais apresentam alterações no metabolismo

celular e liberam fatores pró-inflamatórios e pró-angiogênicos que modificam o microambiente tumoral, favorecendo os eventos de proliferação, sobrevivência e invasão celular (Hanahan, 2022).

Uma das características das células tumorais é a heterogeneidade fenotípica e funcional entre pacientes e também em um mesmo paciente, resultado de diferentes alterações genéticas e epigenéticas em cada célula (Guo *et al.*, 2019). Compreender esta heterogeneidade auxilia no processo de diagnóstico e tratamento de cada paciente, com diferentes tipos e subtipos tumorais, como o câncer de mama.

O câncer de mama é o mais comum entre as mulheres e representa a principal causa de morte por câncer no sexo feminino. Trata-se de uma doença complexa e heterogênea com diferentes características genéticas, histológicas e clínicas (Piotrowski *et al.*, 2013; Parker *et al.*, 2009). Os receptores hormonais (receptores de estrogênio, RE; e de progesterona, RP) e o receptor do fator de crescimento epidermal humano 2 (HER2) representam marcadores de diagnóstico e prognóstico para o câncer de mama (Prat; Perou, 2011; Holen *et al.*, 2017). De acordo com análises de imuno-histoquímica, os tumores de mama são classificados em: a) Receptores hormonais positivos (RE+ e RP+); b) HER2+ e c) triplo negativo (TN) (Holen *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2017a; Waks *et al.*, 2019). Embora esses parâmetros sejam classicamente usados na escolha do tratamento sistêmico, estudos de expressão gênica mostram uma maior heterogeneidade entre os diferentes tipos de tumores. Dessa forma, é extremamente relevante considerar parâmetros moleculares para definir as abordagens terapêuticas a serem empregadas. De acordo com o perfil molecular, os tumores são classificados em: luminal A, luminal B, basal-símile, normal-símile e *claudin-low*, os quais apresentam distintas evoluções clínicas (Perou *et al.*, 2000; Sørliie *et al.*, 2001; Prat *et al.*, 2010).

Os tumores classificados como luminal A e B são derivados de células luminais dos ductos mamários. O subtipo luminal A é o mais comum, correspondendo a 60% dos cânceres de mama. Em geral, esses tumores respondem às terapias hormonais e apresentam bom prognóstico. São positivos para RE e RP, negativos para HER2 e apresentam baixos níveis de Ki67, um marcador de proliferação celular (Sørliie *et al.*, 2001; Weigel; Dowsett, 2010). O subtipo luminal B também é positivo para RE e RP, entretanto os níveis de expressão desses receptores hormonais são menores em relação ao luminal A. Em relação ao receptor HER2, eles podem ser positivos ou negativos. Uma característica importante dos tumores classificados como luminal B é a elevada expressão de Ki67, indicando alta taxa de proliferação celular (Dai *et al.*, 2015). Esse subtipo apresenta um prognóstico intermediário com maior risco de desenvolver resistência aos tratamentos antiestrogênicos (Kennecke *et al.*, 2010).

O subtipo HER2+ é caracterizado por apresentar expressão acentuada de HER2 que, em geral, é decorrente de amplificação gênica e/ou alterações epigenéticas. A expressão de Ki67 é acentuada nesse subtipo de tumor, enquanto os receptores hormonais não são detectados. Os tumores HER2+ são agressivos, apresentam um prognóstico intermediário, e tendem a responder às terapias alvo-dirigidas (Esbah; Oksuzoglu, 2017; Rakha; Reis-Filho; Ellis, 2010).

Os subtipos basal-símile, normal-símile e *claudin-low* são negativos para os receptores de RE, RP e HER2. Em geral, não respondem bem aos protocolos terapêuticos estabelecidos e são tumores agressivos e altamente metastáticos (Li *et al.*, 2021). O basal-símile tem características de células basais da mama, também chamadas mioepiteliais, e apresenta acentuada expressão dos genes associados à proliferação (Tutt *et al.*, 2018; Sotiriou *et al.*, 2003). O subtipo normal-símile não apresenta marcadores tumorais específicos e expressa uma variedade de genes comuns às células do tecido mamário normal (Perou *et al.*, 2000; Russnes *et al.*, 2017). O subtipo *claudin-low* é caracterizado por expressar baixos níveis de moléculas de adesão e de proteínas associadas às junções célula-célula, como as claudinas. Por outro lado, genes associados à transição epitélio-mesenquimal e às células-tronco tumorais são altamente expressos neste subtipo tumoral (Pan *et al.*, 2023; Prat *et al.*, 2010).

Apesar da grande heterogeneidade dos cânceres de mama, alguns genes estão frequentemente mutados ou amplificados incluindo *TP53* (41% dos tumores), *PIK3CA* (30% dos tumores), *MYC* (20% dos tumores), *PTEN* (16% dos tumores), *CCND1* (16% dos tumores) e *ERBB2* (também conhecido como HER2, 13% dos tumores) (Nik-Zainal *et al.*, 2016). Esses genes codificam proteínas que estão diretamente envolvidas na regulação de proliferação e sobrevivência celular. Algumas mutações hereditárias aumentam o risco de desenvolver câncer de mama. Aproximadamente 10% dos casos de câncer de mama estão associados ao histórico familiar (Shiovitz *et al.*, 2015). Os genes *BRCA1* e *BRCA2* são conhecidos supressores tumorais que apresentam mutações hereditárias. Esses genes codificam proteínas que atuam no reparo do ácido desoxirribonucleico (DNA) (Kuchenbaecker *et al.*, 2017; Fountzilias *et al.*, 2020).

Além da predisposição genética, outros fatores podem contribuir para o desenvolvimento do câncer de mama. Estudos mostram que obesidade, sedentarismo e uso excessivo de álcool são alguns fatores de risco para o câncer de mama (Ansari; Jha, 2022). Menarca precoce, menopausa tardia, idade materna avançada para primeira gestação e uso de contraceptivos hormonais também representam fatores de predisposição ao desenvolvimento do câncer de mama (Colditz; Sellers; Trapido, 2006; Busund *et al.*, 2018; Mørch *et al.*, 2017).

Os protocolos terapêuticos são definidos considerando o estadiamento da doença e as características histopatológicas e moleculares do tumor. No geral, o tratamento consiste em

terapias locorregionais (remoção cirúrgica e radioterapia) e terapias sistêmicas, que podem ser neoadjuvantes (antes da remoção cirúrgica) e/ou adjuvantes (após a remoção cirúrgica) (Agostinetto; Gligorov; Piccart, 2022; Harbeck; Gnant, 2017).

As terapias sistêmicas empregam diferentes fármacos, considerando as características do tumor. Os tumores RE+ (luminais A e B) são tratados pela terapia hormonal que emprega o uso de inibidores e degradadores seletivos de RE (tamoxifeno e fulvestrant, respectivamente) e inibidores de aromatase (anastrozol e letrozol) (Burguin; Diorio; Durocher, 2021). Apesar do subtipo luminal A, no geral, apresentar um melhor prognóstico, ele é o mais comum entre as mulheres e apresenta altas taxas de pacientes resistentes (resistência intrínseca ou após exposição ao medicamento) à terapia hormonal, sendo este o principal desafio no tratamento dos tumores luminais (Abdel-Hafiz, 2017). Os tumores HER2+ são direcionados para as terapias alvo-dirigidas que empregam inibidores de proteínas cinases e anticorpos monoclonais (trastuzumabe, por exemplo) (Gianni *et al.*, 2016). Os tumores triplo negativos são tratados com quimioterápicos clássicos que apresentam alta citotoxicidade como, por exemplo, as antraciclinas e os taxanos. O risco de recidiva é maior nesse tipo de tumor (Blum *et al.*, 2017; Mackey *et al.*, 2016).

De modo geral, é comum observar pacientes que são refratários às terapias sistêmicas disponíveis e, frequentemente, as células tumorais desenvolvem resistência aos fármacos empregados nos protocolos terapêuticos. Além disso, os antineoplásicos causam diversos efeitos colaterais, como artralgias, náuseas e o desenvolvimento de outras patologias como infertilidade, cardiopatias e disfunção cognitiva (Draganescu; Carmocan, 2017; Harbeck *et al.*, 2019). Com a ineficácia dos tratamentos, a doença progride e forma metástases, levando os pacientes à óbito (Cardoso *et al.*, 2018). Portanto, é extremamente relevante identificar novos agentes com atividade antitumoral para ampliar o arsenal terapêutico frente ao câncer de mama.

## 2.2 REGULAÇÃO DO CICLO CELULAR

A proliferação das células normais é altamente regulada por complexos proteicos que são ativados frente a estímulos mitogênicos (Milletti; Colicchia; Cecconi, 2023). A progressão do ciclo celular depende, principalmente, da ativação de proteínas cinases dependentes de ciclina (CDKs), cuja atividade é regulada por ciclinas específicas (Martínez-Alonso; Malumbres, 2020). Os complexos ciclina D-CDK4/CDK6 e ciclina E-CDK2 são ativados em resposta a fatores que estimulam a proliferação celular e determinam a progressão pela fase G1 e transição G1/S. Os complexos ciclina A-CDK2 ativam diferentes substratos, os quais são

necessários para a replicação do DNA e do centrôssomo e, dessa forma, impulsionam a progressão pela fase S. Os complexos ciclina B-CDK1 são críticos para promover a entrada e os eventos da mitose que levam à divisão do material genético (Milletti; Colicchia; Cecconi, 2023). Assim sendo, as diferentes CDKs ligam-se com alta afinidade às suas ciclinas parceiras e orquestram os eventos que levam à progressão coordenada do ciclo celular (Nurse, 2000).

Enquanto os complexos CDK-ciclina estimulam a progressão do ciclo, as proteínas das famílias Kip/Cip (p21 e p27) e INK4 (p15, p16, p18 e p19) têm função contrária, uma vez que podem interagir com as CDKs para inibir sua atividade. Além disso, as CDKs podem ser inibidas pelas proteínas cinases WEE1 e MYT1 que fosforilam resíduos específicos de aminoácidos nas CDKs inibindo sua atividade catalítica. O efeito inibitório das cinases WEE1 e MYT1 sobre as CDKs é revertido pelas fosfatases CDC25 A/B/C. Dessa forma, em condições normais, o ciclo celular é altamente regulado pela atuação conjunta de uma variedade de proteínas cinases e fosfatases (Liu *et al.*, 2020a; Martínez-Alonso; Malumbres, 2020; Morgan, 1997).

Os mecanismos regulatórios descritos acima são muito importantes para determinar que a divisão celular ocorra somente quando necessário. Além disso, são essenciais para garantir a segregação equacional dos cromossomos, evitando a propagação de erros genéticos para as células-filhas. Portanto, as células apresentam pontos de checagem que evitam a entrada ou a progressão no ciclo celular, baseados em: integridade do DNA, replicação correta e completa do material genético, montagem correta do fuso mitótico e alinhamento dos cromossomos que precede a anáfase. Em resposta a erros nesses processos, como por exemplo, dano ao DNA, ocorre a inibição da atividade dos complexos ciclinas-CDKs e de outras proteínas que regulam a progressão do ciclo celular, bloqueando a divisão celular até que esses erros sejam reparados (Barnum; O'Connell, 2014; Chao *et al.*, 2017).

Considerando que as células tumorais apresentam grande instabilidade genética, proteínas envolvidas no controle do ciclo celular estão frequentemente alteradas, permitindo que elas sobrevivam e continuem proliferando mesmo em condições anormais. Dessa forma, as terapias antitumorais inibem a progressão do ciclo celular por meio de diferentes alvos, como pela inibição de proteínas-chave do controle do ciclo celular (inibidores de CDK4/6), ou de vias associadas à proliferação e sobrevivência celular, como PI3K/Akt (everolimus e capivarsetibe) e MAPK/ERK (vemurafenibe e lapatinibe). Além de quimioterápicos que inibem a replicação do DNA e são agentes causadores de danos ao DNA (doxorubicina e cisplatina) e os taxanos, que interferem na formação correta do fuso mitótico (paclitaxel) (He *et al.*, 2021; Lee; Rauch; Kolch, 2020; Matthews; Bertoli; De Bruin, 2022; Otto; Sicinski, 2017; Visconti; Della Monica;

Grieco, 2016). Muitos destes medicamentos comumente utilizados em tratamentos sistêmicos foram desenvolvidos a partir de produtos naturais.

### 2.3 PRODUTOS NATURAIS

Os produtos naturais têm sido amplamente explorados com o objetivo de identificar substâncias bioativas e de interesse farmacológico. Muitos fármacos disponíveis no mercado são produtos naturais ou foram derivados de protótipos naturais. Além disso, uma parcela considerável de fármacos (semissintéticos) foi desenvolvida a partir do arcabouço estrutural de produtos naturais (Newman; Cragg, 2020).

Os taxanos representam exemplos de fármacos semissintéticos que foram obtidos a partir de precursores naturais. Esses fármacos são utilizados no tratamento de diferentes tipos de câncer, incluindo os cânceres de mama, bexiga, próstata, ovário e pulmão. Os taxanos contêm um arcabouço comum (taxadieno) que foi inicialmente identificado no paclitaxel (Taxol®), um antineoplásico aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1992 para o tratamento de pacientes com câncer de ovário que eram refratárias ao tratamento disponível à época (Weaver, 2014). O paclitaxel foi originalmente isolado de uma espécie de planta (*Taxus brevifolia*), contudo devido à pequena quantidade de substância isolada em cada procedimento, o paclitaxel passou a ser produzido por semissíntese a partir da bacatina (10-desacetilbacatina-III). Assim sendo, a bacatina (extraída das folhas de *Taxus baccata*) foi usada como plataforma para obtenção do paclitaxel (Cragg *et al.*, 1993). Apesar da promissora atividade antitumoral do paclitaxel, algumas limitações clínicas como baixa solubilidade, modesta seletividade e alta toxicidade impulsionaram a obtenção de análogos como, por exemplo, o docetaxel (Taxotere®) e o Cabazitaxel (Jevtana®) (Liver Tox, 2020; Yuan *et al.*, 2021).

A goniotalamina (GTN) é uma estiril lactona encontrada em plantas do gênero *Goniothalamus* e *Cryptacarya* que tem despertado o interesse de pesquisadores quanto ao seu potencial antitumoral, de modo que rotas de síntese foram desenvolvidas para a sua obtenção. Estudos mostram que a GTN tem atividade citotóxica e/ou antiproliferativa frente a diferentes linhagens celulares derivadas de cânceres humanos incluindo mama, próstata, ovário e cólon (Vendramini-Costa *et al.*, 2010; Pilli *et al.*, 2019; Meirelles *et al.*, 2019; Tangchirakhaphan, 2018). Foi também demonstrado que a GTN inibe o desenvolvimento de tumor de Ehrlich (Vendramini-Costa *et al.*, 2010).

Os mecanismos associados aos efeitos da GTN sobre células tumorais têm sido associados à sua capacidade de induzir danos ao DNA, estresse oxidativo e estresse do retículo endoplasmático, eventos que levam à morte celular (Abu Bakar *et al.*, 2023; Khaw-On; Pompimon; Banjerdpongchai, 2019; Sophonnithiprasert *et al.*, 2020). Apesar da promissora atividade antitumoral da GTN, novos estudos devem ser realizados, considerando que essa substância possui baixa seletividade. Semprebon *et al.* (2015) mostraram que GTN tem atividade citotóxica sobre células derivadas de epitélio mamário normal. Assim sendo, é relevante obter protótipos que sejam mais seletivos para as células tumorais em relação às células normais.

A pipartina, (PPT), também conhecida como piperlongumina, é um alcalóide/amida encontrado em plantas do gênero Piper. Espécies do gênero Piper têm sido utilizadas para fins medicinais, sendo que a espécie *Piperlongum* é conhecida pelo seu uso na medicina ayurvédica indiana. A PPT apresenta diferentes propriedades farmacológicas, incluindo as atividades leishmanicida, antifúngica, antinocepitiva e antitumoral (Zhu *et al.*, 2021; Bezerra *et al.*, 2013).

Estudos mostram que a PPT tem efeitos citotóxico e citostático em linhagens celulares derivadas de diferentes tipos tumorais, como câncer de próstata, fígado e mama, e sua atividade antitumoral também foi demonstrada em modelos animais (Cheng *et al.*, 2020; Duarte *et al.*, 2023; Meegan *et al.*, 2017). Tem sido demonstrado que a PPT induz apoptose, necrose e autofagia em células tumorais (Bezerra *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2015; Xiong *et al.*, 2015; Thongsom *et al.*, 2017). O potencial antitumoral da PPT também tem sido associado à sua capacidade de inibir migração e invasão em células tumorais (Piska *et al.*, 2018). Apesar do potencial antitumoral da PPT, sua aplicabilidade clínica é limitada devido à sua baixa solubilidade (Parama *et al.*, 2021). Assim sendo, muitos grupos de pesquisa têm trabalhado intensamente na obtenção de novos derivados de PPT com parâmetros físico-químicos apropriados para futura aplicabilidade clínica.

Estudo previamente realizado pelo nosso grupo de pesquisa mostrou que derivados sulfonilados de GTN e PPT podem ser úteis como protótipos candidatos a fármacos. Assim sendo, é relevante avaliar os efeitos dessas substâncias sobre o comportamento proliferativo de células derivadas de câncer de mama que apresentam diferentes perfis genéticos e que são representativas de diferentes subtipos de câncer de mama.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos dos derivados sulfonilados de GTN (composto **3**) e PPT (composto **6**) sobre o comportamento proliferativo da linhagem de câncer de mama MCF-7.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar a eficiência das substâncias **3** e **6** em:

- a) modular o comportamento proliferativo de células MCF-7;
- b) alterar a dinâmica de progressão do ciclo celular e correlacionar esse evento com uma possível modulação no perfil de expressão gênica de proteínas que regulam a progressão do ciclo celular (ciclina D e B, MYC e CDKN1A);
- c) induzir estresse oxidativo e danos ao DNA nas células MCF-7;
- d) induzir o processo de morte celular por apoptose nestas células e correlacionar esse evento com uma possível modulação no perfil de expressão de genes que regulam a via intrínseca de apoptose (*BAX* e *BCL2*);
- e) modular vias que estão associadas ao crescimento, proliferação celular e apoptose (PI3K/Akt e MAPK/ERK).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 LINHAGENS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTIVO

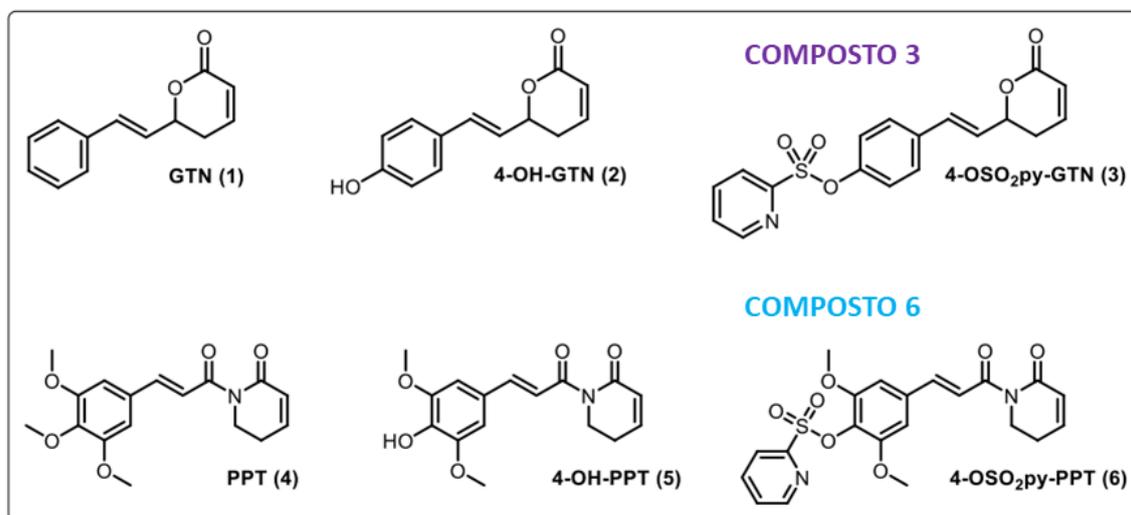
No presente estudo foi utilizada a linhagem celular derivada de câncer de mama MCF-7, representativa do subtipo luminal A. A linhagem CCD-1059Sk, derivada de fibroblastos de pele normal, foi utilizada como modelo de célula não tumoral. Ambas as linhagens foram adquiridas pelo Banco de Células do Rio de Janeiro. As linhagens foram cultivadas em meio DMEM/F12 (Meio Eagle modificado por Dulbecco, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Cultilab, Campinas, SP, Brasil). As culturas foram mantidas em estufa a 37°C contendo 5% de CO<sub>2</sub> e utilizadas para as abordagens experimentais até a 15<sup>a</sup> passagem. Os estoques mantidos em nitrogênio líquido.

### 4.2 OBTENÇÃO DOS DERIVADOS SULFONILADOS DE GONIOTALAMINA E PIPLARTINA

Os derivados sulfonilados de goniotalamina e piplartina foram obtidos pelo grupo do prof. Dr. Ronaldo Aloise Pilli do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). A Figura 2 mostra as estruturas químicas dos produtos naturais goniotalamina (**1**) e piplartina (**4**) e seus derivados hidroxilados (**2**) e (**5**), respectivamente, os quais foram utilizados nas reações subseqüentes para a obtenção dos derivados sulfonilados (**3**) e (**6**) (Figuras 2 e 3).

As rotas de síntese foram previamente estabelecidas e envolvem diferentes reações. A reação SuFEx (Sulfur (VI) Fluoride Exchange) de fluoretos de sulfonila com derivados fenólicos na presença de uma base (Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Et<sub>3</sub>N, etc.) tem sido empregada com sucesso na síntese de sulfonatos de arila e alquila (Tribby *et al.*, 2017). O fluoreto de 2-piridinassulfonila (**7**), previamente preparado, é utilizado nas reações SuFEx com 4-OH-GTN (**2**) e 4-OH-PPT (**5**). Os sulfonatos de arila (**3**) e (**6**) foram obtidos em excelentes rendimentos (92–93%) na presença de Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> em acetonitrila a temperatura ambiente por 1 h (Figura 3).

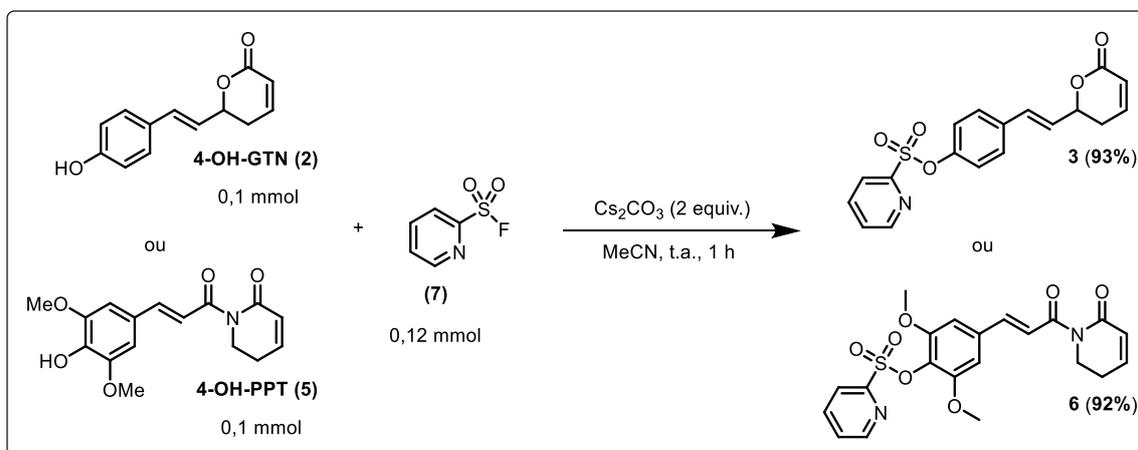
Figura 2 – Estruturas químicas dos produtos naturais goniotalamina (GTN) e piplartina (PPT) de seus derivados



Fonte: Adaptado de Pilli (2022)

Nota: Estruturas químicas dos produtos naturais goniotalamina (GTN) e piplartina (PPT) e de seus derivados hidroxilados (4-OH-GTN e 4-OH-PPT) e sulfonilados (4-OSO<sub>2</sub>py-GTN e 4-OSO<sub>2</sub>py-PPT).

Figura 3 – Rotas de síntese para obtenção dos derivados sulfonilados de GTN e PPT



Fonte: Pilli (2022)

Nota: Representação da reação de síntese realizada para a obtenção dos sulfonatos de arila (3) e (6).

As substâncias (1), (3), (4) e (6) foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) e mantidas em alíquotas de soluções-estoque (4°C) a 50 mM (substâncias 1 e 3) e 25 mM (substâncias 4 e 6), as quais foram utilizadas para obtenção das concentrações de interesse nos diferentes ensaios realizados. Os grupos controles foram tratados com o veículo (DMSO) em concentrações correspondentes (v/v) às utilizadas nos grupos tratados.

#### 4.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

A análise da viabilidade celular foi realizada pelo ensaio de sulforodamina B (SRB), de acordo com Vichai e Kirtikara (2006). As células MCF-7 e CCD-1059Sk foram semeadas em placas de 96 poços ( $1 \times 10^4$  células/poço). Após 24 horas, as células foram tratadas com as substâncias **(1)**, **(3)**, **(4)** e **(6)** em diferentes concentrações (0,1, 1, 10, 50, 100 e 200  $\mu\text{M}$ ) por 48 horas. Ao final do tempo de tratamento, as células foram fixadas com ácido tricloroacético (10%) e coradas por com SRB (0,4%) por 1 hora. O excesso da SRB foi removido por lavagens com ácido acético (1%). A SRB, estavelmente ligada às proteínas, foi solubilizada em solução de Tris-NaOH (10 mM) e as amostras foram analisadas em espectrofotômetro a 540 nm. Os valores de  $\text{IC}_{50}$  (concentração capaz de inibir 50% do crescimento) foram obtidos por regressão não linear usando o software GraphPad Prism® 8.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Os índices de seletividade (IS) foram calculados pela razão entre o  $\text{IC}_{50}$  na linhagem CCD-1059Sk e o  $\text{IC}_{50}$  na linhagem MCF-7. Em determinados experimentos, as células foram tratadas com a  $\text{IC}_{50}$  ou  $1/2 \text{IC}_{50}$  de cada substância.

Posteriormente, a análise da viabilidade celular também foi realizada para avaliar a influência do antioxidante N-acetil-L-cisteína (NAC) (Sigma-Aldrich), na atividade dos compostos **(3)** e **(6)**, a fim de investigar a indução de estresse oxidativo. As células MCF-7 foram tratadas por 48h com os compostos **(3)** e **(6)** a 20  $\mu\text{M}$  e 7  $\mu\text{M}$ , respectivamente, com a ausência ou presença de NAC (1mM). Um grupo foi tratado apenas com o NAC (1mM). Após decorrido o tempo de tratamento foram realizadas todas as etapas subseqüentes descritas acima: fixação, coloração, solubilização e análise.

#### 4.4 ENSAIO DE CAPACIDADE CLONOGÊNICA

O ensaio de capacidade clonogênica foi realizado de acordo com Franken *et al.* (2016) na linhagem MCF-7. As células foram semeadas em baixa densidade (300 células por placa de 35 mm de diâmetro). Após 24 horas, as culturas foram tratadas por 48 horas com a substância **(3)** nas concentrações de 10 e 20  $\mu\text{M}$  e **(6)** nas concentrações de 3,5 e 7  $\mu\text{M}$ . Na sequência, o meio de cultura foi substituído por meio fresco (sem tratamento). As culturas foram mantidas em estufa (37 °C, 5 % de  $\text{CO}_2$ ) por 11 dias, sendo que no dia 7 o meio foi substituído. Após o período de 11 dias, as culturas foram lavadas com PBS e as células fixadas em metanol P.A (Sigma-Aldrich) por 10 minutos. Após secagem, as amostras foram coradas com Violeta Genciana 5% (Farmax®, Divinópolis, MG, Brasil) por 5 minutos. As colônias, com mais de 50 células, foram contadas com auxílio de um estereomicroscópio (Nikon SMZ800, Nikon, Tokyo, Japão).

#### 4.5 ANÁLISE DA PROGRESSÃO NO CICLO CELULAR

A análise de progressão do ciclo celular das células MCF-7 foi avaliada por citometria de fluxo. As células foram semeadas em placas de 35mm de diâmetro, utilizando o inóculo de  $1 \times 10^5$  células por placa. As células foram tratadas com a substância (3) nas concentrações de 10 e 20  $\mu\text{M}$  e (6) nas concentrações de 3,5 e 7  $\mu\text{M}$  por 48 horas. Após decorrido o tempo de tratamento, as células foram coletadas por digestão enzimática (Trypsin-EDTA solution/Sigma-Aldrich) e transferidas para tubos de 15 mL. Após centrifugação (5 minutos a 300 x g), o precipitado de células foi solubilizado em PBS e as amostras fixadas com etanol a 4°C (75% em PBS-Salina fosfato tamponada). No dia posterior, após nova centrifugação, as amostras foram coradas por 1 hora em uma solução contendo PBS, RNase (1,5 mg/mL) e Iodeto de Propídio (90  $\mu\text{g/mL}$ ) (Guava Technologies, Merck Millipore, Burlington, MA, EUA). As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo (Guava Mini EasyCyte, 8HT, Merck Millipore) utilizando-se o software GuavaSoft 2.7 (Merck Millipore).

#### 4.6 ANÁLISE DE ELEMENTOS DO CITOESQUELETO E MORFOLOGIA NUCLEAR

As células MCF-7 foram semeadas em placas de 35mm de diâmetro ( $1 \times 10^5$  células/placa) sobre lamínula. As amostras foram tratadas com a substância (3) nas concentrações de 10 e 20  $\mu\text{M}$  e (6) nas concentrações de 3,5 e 7  $\mu\text{M}$  por 48 horas. Ao término do tratamento, as culturas foram fixadas em solução de formaldeído 3,7% por 20 minutos. Após lavagens com PBS, as membranas foram permeabilizadas com Triton X-100 (0,5% em PBS) por 15 minutos. As amostras foram incubadas com anti- $\alpha$ -tubulina (1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA – #3873) a 4° C por 12h, para visualização dos microtúbulos. Na sequência, foram realizadas lavagens em PBS e a incubação com anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo, 1:100, Abcam, Cambridge, Reino Unido – #ab150113) conjugado a fluoresceína (FITC) por 2 horas. Subsequentemente, as amostras foram incubadas com faloidina conjugada a TRITC (1: 25, Sigma-Aldrich – #P1951,) por 2h, para visualização da actina. Os núcleos foram contracorados com DAPI (4',6-Diamidino-2'-Phenilindol diidrocloreto) presente na solução de montagem (Fluoroshield) (Sigma-Aldrich – #F6057). As análises foram realizadas em microscópio de imunofluorescência e as imagens obtidas usando o software de análise de imagens (NIS-elements AR Version 5.21.03, Nikon).

#### 4.7 ENSAIO DE ANEXINA V

O Kit Alexa Fluor™ 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) foi utilizado para determinar a frequência de células que externalizaram a fosfatidilserina, evento característico das fases iniciais do processo de apoptose. As células foram cultivadas em placas de 35mm com o inóculo de  $1 \times 10^5$  por placa e tratadas com a substância **3** nas concentrações de 10 e 20  $\mu\text{M}$  e **6** nas concentrações de 3,5 e 7  $\mu\text{M}$  por 48 horas. Após o tempo de tratamento, as células foram coletadas por digestão enzimática (Trypsin-EDTA solution/Sigma-Aldrich) e as amostras centrifugadas a 300 x g por 5 minutos. Após lavagem em PBS, o precipitado de células foi homogeneizado em solução contendo anexina V conjugada a AF488 e iodeto de propídeo. As amostras foram incubadas, protegidas da luz e em temperatura ambiente, por 30 minutos. A análise foi realizada no citômetro fluxo (Guava Mini EasyCyte, 8HT, Merck Millipore) usando o software GuavaSoft 2.7 (Merck Millipore).

#### 4.8 ENSAIO DE SENESCÊNCIA CELULAR

A senescência celular foi avaliada usando o Kit “Senescence  $\beta$ -Galactosidase Staining” (Cell Signaling Technology, #9860). As células foram cultivadas em placas de 35mm com o inóculo de  $1 \times 10^5$  por placa e tratadas com a substância **3** nas concentrações de 10 e 20  $\mu\text{M}$  72 horas. Foram registradas, por microscopia de contraste de fase, imagens do mesmo campo, nos tempos: 0, 24, 48 e 72h após tratamento, a fim de observar a morfologia celular da linhagem MCF-7. Decorrido 72h de tratamento, as células foram fixadas em solução fixadora (1mL) por 15 minutos e após lavagem com PBS, foi adicionada a solução de coloração de  $\beta$ -galactosidase (1mL) e as placas foram incubadas a 37°C por 7 horas. O registro das imagens após a coloração foi realizado por microscopia de contraste de fase utilizando-se filtro azul.

#### 4.9 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

A avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*, ROS) foi realizada usando o Kit “CellROX™ Green Flow Cytometry Assay” (Invitrogen, Waltham, MA, EUA – #C10444). As células MCF-7 foram semeadas em placas de 35mm de diâmetro ( $1 \times 10^5$  células/placa). As amostras foram tratadas com a substância **3** a 20  $\mu\text{M}$  e **6** a concentrações 7  $\mu\text{M}$  por 4 horas. Para obtenção do controle positivo as células foram tratadas com peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a 1mM. Após decorrido o tempo de tratamento, o meio de cultura foi substituído por um novo meio contendo o CellROX® Green Reagent a 5 $\mu\text{M}$  e as

placas ficaram incubadas em estufa a 37°C por 30 minutos. Após este período, as células foram lavadas com PBS e coletadas por digestão enzimática (trypsin-EDTA solution/Sigma-Aldrich) e as amostras centrifugadas a 300 x g por 5 minutos e ressuspensas em meio de cultura para análise por citometria de fluxo (Guava Mini EasyCyte, 8HT, Merck Millipore) usando o software GuavaSoft 2.7 (Merck Millipore).

#### 4.10 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE p-HISTONA H2A.X

A fim de caracterizar a indução de danos ao DNA, a detecção de Histona H2A.X fosforilada (p-Histona H2A.X) foi realizada por imunofluorescência. As células MCF-7 foram semeadas em placas de 35mm de diâmetro ( $1,2 \times 10^5$  células/placa) sobre lamínula. As amostras foram tratadas com a substância **3** nas concentrações de 10 e 20  $\mu\text{M}$  e **(6)** nas concentrações de 3,5 e 7  $\mu\text{M}$  por 24 horas. Ao término do tratamento, as culturas foram fixadas em solução de formaldeído 3,7% por 20 minutos. Após lavagens com PBS, as membranas foram permeabilizadas com Triton X-100 (0,5% em PBS) por 15 minutos. As amostras foram incubadas com anti p-Histona H2A.X (1:100, Cell Signaling Technology – #9718) a 4° C por 12h. Na sequência, foram realizadas lavagens em PBS e a incubação com anticorpo secundário (anti-IgG de coelho, 1:100, Abcam – #ab150073) conjugado a Alexa Fluor 488 por 2 horas. Após lavagens com PBS, os núcleos foram contracolorados com DAPI, o qual estava presente no meio de montagem (Fluoroshield) (Sigma-Aldrich – #F6057). As análises foram realizadas por microscopia confocal e as imagens obtidas usando o software de análise de imagens (NIS-elements AR Version 5.21.03, Nikon).

#### 4.11 qPCR

A abundância de RNA mensageiro (RNAm) dos genes alvos (Tabela 1) foi investigada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. As células MCF-7 foram semeadas em placas de 35mm de diâmetro ( $1 \times 10^5$  células/placa) e tratadas com a substância **(3)** nas concentrações de 10 e 20  $\mu\text{M}$  e a substância **(6)** nas concentrações de 3,5 e 7  $\mu\text{M}$  por 24 horas. Após decorrido o tempo de tratamento, as células foram coletadas por digestão enzimática e as amostras centrifugadas (300 x g por 5 minutos, 4 °C), o precipitado de células foi homogeneizado em 350  $\mu\text{L}$  de tampão de lise do kit RNeasy Mini® (Qiagen, Germantown, MD, EUA). 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® (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

A concentração de RNA total das amostras foi determinada usando o espectrofotômetro (NanoDrop® ND 1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EUA). Para eliminação de possível contaminação com DNA genômico, 1 µg de RNA total foi incubado com DNase (1U; Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) e, então submetido à reação de transcrição reversa (RT) utilizando Randon primers e High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit® (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 em seguida, a 85 °C por 5 min, para a inativação da enzima.

As reações foram realizadas utilizando o termociclador ABI Prism7500® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e o protocolo de amplificação do kit Power Syber Green Master Mix® (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  $\Delta\Delta C_t$  com correção da eficiência e utilizando uma amostra controle como calibradora (Pfaffl, 2001). Os valores médios de eficiência para cada gene foram calculados por meio do perfil de amplificação de cada amostra utilizando-se o programa LinRegPCR (Ramakers *et al.*, 2003).

Tabela 1 - Sequência de nucleotídeos dos *primers* utilizados na qPCR

Gene	Sequência do primer
<i>CDKN1A</i>	F 5'- CCATAGCCTCTACTGCCACCATC-3' R 5'- GTCCAGCGACCTTCCTCATCCA-3'
<i>CCNBI</i>	F 5'- GTACCCTCCAGAAATTGGTGA-3' R 5'- GACTACATTCTTAGCCAGGTG-3'
<i>CCND1</i>	F:5'- GGGTTGTGCTACAGATGATAGAG-3' R:5'- AGACGCCTCCTTTGTGTTAAT-3'
<i>BAX</i>	F:5'- TTCCTTACGTGTCTGATCAATCC-3' R:5'- GGCAGAAGGCACTAATCAA -3'
<i>BCL2</i>	F:5'- CAGAAGTCTGGGAATCGATCTG -3' R:5'- AATCTTCAGCACTCTCCAGTTATAG-3'
<i>MYC</i>	F: 5'- AAGCTGAGGCACACAAAGA -3' R: 5'- GCTTGGACAGGTTAGGAGTAAA-3'
<i>ACTB</i>	F 5'- AGAGCTACGAGCTGCCTGAC-3' R 5'- AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'

Fonte: da autora (2024)

#### 4.12 WESTERN BLOTTING

A expressão das proteínas de interesse foi avaliada por *western blotting*. As células MCF-7 foram semeadas em placas de 100 mm de diâmetro ( $1,0 \times 10^6$  células/placa) e tratadas com o composto (3) nas concentrações de 10 e 20 µM e composto (6) nas concentrações de 3,5

e 7  $\mu$ M por 48 horas. Após tratamento, 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 protease e fosfatase (Sigma-Aldrich, #P8340). Após centrifugação (12000 x g) por 10 minutos, o sobrenadante foi coletado e foi realizada a quantificação de proteínas totais de cada amostra (BCA kit, Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, EUA).

As amostras, contendo 40  $\mu$ g de proteínas, foram diluídas em tampão de amostra 4x (Tris 0,5 M – pH 6,8, 4 ml de glicerol, dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%, azul de bromofenol 1% e betamercaptoetanol 1% em água deionizada) e desnaturadas por 5 minutos (100 °C). O fracionamento das proteínas foi realizado em minigel de poliacrilamida 12% com SDS (2 horas a 100V).

A transferência para membrana de PVDF (Amersham Pharmacia, Amersham, Reino Unido) foi realizada por 2 horas a 200 mA em tampão (Tris 0,025 M, glicina 0,192 M e metanol a 20% em água destilada). Após a transferência das proteínas, o bloqueio das membranas foi realizado durante 1 hora em temperatura ambiente [5% de leite desnatado, Tris 0,02 M (TBS) com 0,1% (v/v) Tween20 (Sigma-Aldrich)].

As membranas foram incubadas com os anticorpos de interesse (Tabela 2) por 12 horas a 4 °C. Após sucessivas lavagens com TBS e TTBS (tampão tris-salina acrescido de 0,1% de Tween20), as membranas foram incubadas com anticorpos secundários anti-IgG de camundongo ou de coelho (1:1000) conjugado com peroxidase por 2 horas em temperatura ambiente sob agitação. Então as membranas foram lavadas novamente e reveladas por quimioluminescência usando o ECL Western blotting Detection Kit (Amersham Pharmacia) conforme especificações do fabricante. A quantificação das bandas imunorreativas foi realizada por meio do Bio-Rad Software Image Lab (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

Tabela 2 – Relação dos anticorpos utilizados e especificações

<b>Anticorpo</b>	<b>Diluição</b>	<b>Código</b>	<b>Fabricante</b>
Cyclin D	1:1000	#55506	Cell Signaling
Cyclin B	1:1000	#12231	Cell Signaling
ERK1/2	1:2000	#4696	Cell Signaling
Phospho-ERK1/2	1:1000	#4370	Cell Signaling
Phospho-Akt	1:1000	#4060	Cell Signaling
$\beta$ -actina + HRP	1:25000	A3854	Sigma–Aldrich

---

Fonte: da autora (2024)

#### 4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados quantitativos são apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão (DP) de, pelo menos, dois experimentos independentes. Diferenças significativas foram evidenciadas de acordo com a análise de variância one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. O software utilizado foi o GraphPad Prism® 8.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA

A viabilidade celular foi observada nas linhagens celulares MCF-7 e CCD-1059Sk, após 48h de tratamento com a GTN (**1**) e PPT (**4**) e seus derivados sulfonilados (**3**) e (**6**), respectivamente. Os valores de  $IC_{50}$  foram determinados a partir das curvas de dose-resposta (Tabela 3, Figura 4). A substância (**1**) apresentou maior citotoxicidade para linhagem não tumoral em relação a linhagem tumoral (MCF-7:  $IC_{50} = 84 \pm 1,04 \mu M$ ; CCD-1059Sk:  $IC_{50} = 29,01 \pm 0,66 \mu M$ ; IS= 0,35). Enquanto seu derivado sulfonilado, composto (**3**), apresentou maior citotoxicidade e seletividade para linhagem tumoral (MCF-7:  $IC_{50} = 19,69 \pm 1,6 \mu M$ ; CCD-1059Sk:  $IC_{50} = 64,51 \pm 2,15 \mu M$ ; IS= 3,28). A substância (**4**) apresentou efeitos similares em ambas as linhagens testadas (MCF-7:  $IC_{50} = 21,84 \pm 0,45 \mu M$ ; CCD-1059Sk:  $IC_{50} = 19,82 \pm 0,7 \mu M$ ; IS= 0,9). Entretanto, seu derivado sulfonilado, composto (**6**), foi mais citotóxico frente a linhagem tumoral com bom índice de seletividade (MCF-7:  $IC_{50} = 7,12 \pm 1,6 \mu M$ ; CCD-1059Sk:  $IC_{50} = 33,28 \pm 1,49 \mu M$ ; IS= 4,67).

Considerando os valores de  $IC_{50}$  obtidos para a linhagem MCF-7, nos ensaios subsequentes a substância (**3**) foi utilizada nas concentrações de  $10 \mu M$  ( $1/2 IC_{50}$ ) e  $20 \mu M$  ( $IC_{50}$ ), enquanto a substância (**6**) foi utilizada nas concentrações de  $3,5 \mu M$  ( $1/2 IC_{50}$ ) e  $7 \mu M$  ( $IC_{50}$ ).

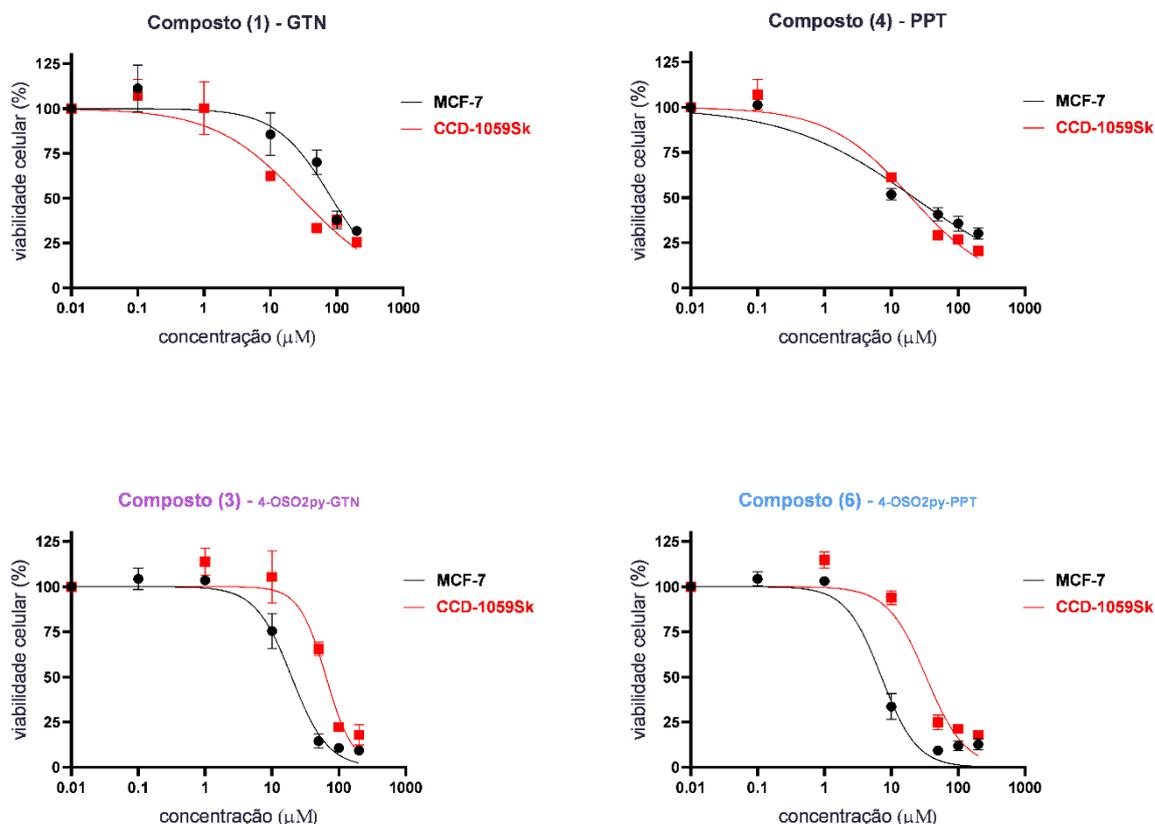
Tabela 3 – Valores de  $IC_{50}$  ( $\mu M$ ) dos compostos (**1**), (**3**), (**4**) e (**6**)

	<b>MCF-7</b>	<b>CCD-1059Sk</b>	<b>IS</b>
COMPOSTO (1)	$84 \pm 1,04$	$29,01 \pm 0,66$	0,35
COMPOSTO (3)	$19,69 \pm 1,6$	$64,51 \pm 2,15$	3,28
COMPOSTO (4)	$21,84 \pm 0,45$	$19,82 \pm 0,7$	0,9
COMPOSTO (6)	$7,12 \pm 1,6$	$33,28 \pm 1,49$	4,67

Fonte: da autora (2024)

Nota: Os valores de  $IC_{50}$  ( $\mu M$ ) foram determinados a partir de curvas dose-resposta obtidas pelo ensaio de viabilidade por SRB após 48h de tratamento com compostos (1), (3), (4) e (6). IS= índice de seletividade, calculado pela razão  $IC_{50} \text{ CCD-1059Sk} / IC_{50} \text{ MCF-7}$ .

Figura 4 – Curvas dose-resposta obtidas pelo ensaio de viabilidade por SRB

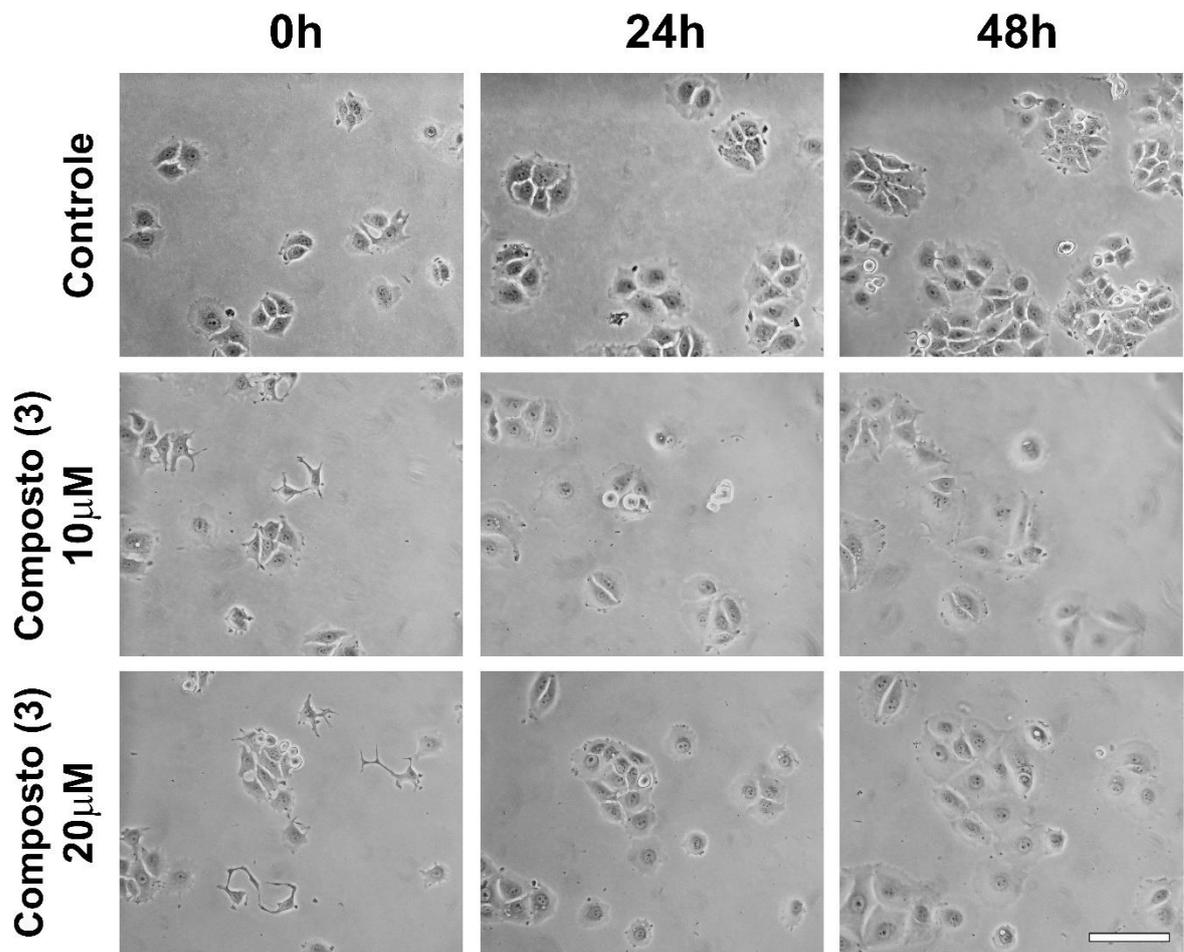


Fonte: da autora (2024)

Nota: Curvas dose-resposta obtidas pelo ensaio de viabilidade por SRB após 48h de tratamento com os compostos (1), (3), (4) e (6) nas concentrações de 0,1, 1, 10, 50, 100 e 200 μM.

A morfologia das células MCF-7 foi avaliada após o tratamento com os compostos (3) a 10 μM e 20 μM, e (6) a 3,5 μM e 7,0 μM após 24h e 48h de tratamento. A substância (3) inibiu a proliferação celular e ocasionou um aumento no tamanho das células, efeito que é mais evidenciado no grupo tratado com 20 μM (Figura 5). A substância (6) inibiu a proliferação celular quando utilizada na concentração de 3,5 μM e causou alteração na morfologia celular a 7,0 μM, uma vez que as células se tornaram arredondadas e parcialmente aderidas ao substrato, um indicativo de citotoxicidade (Figura 6).

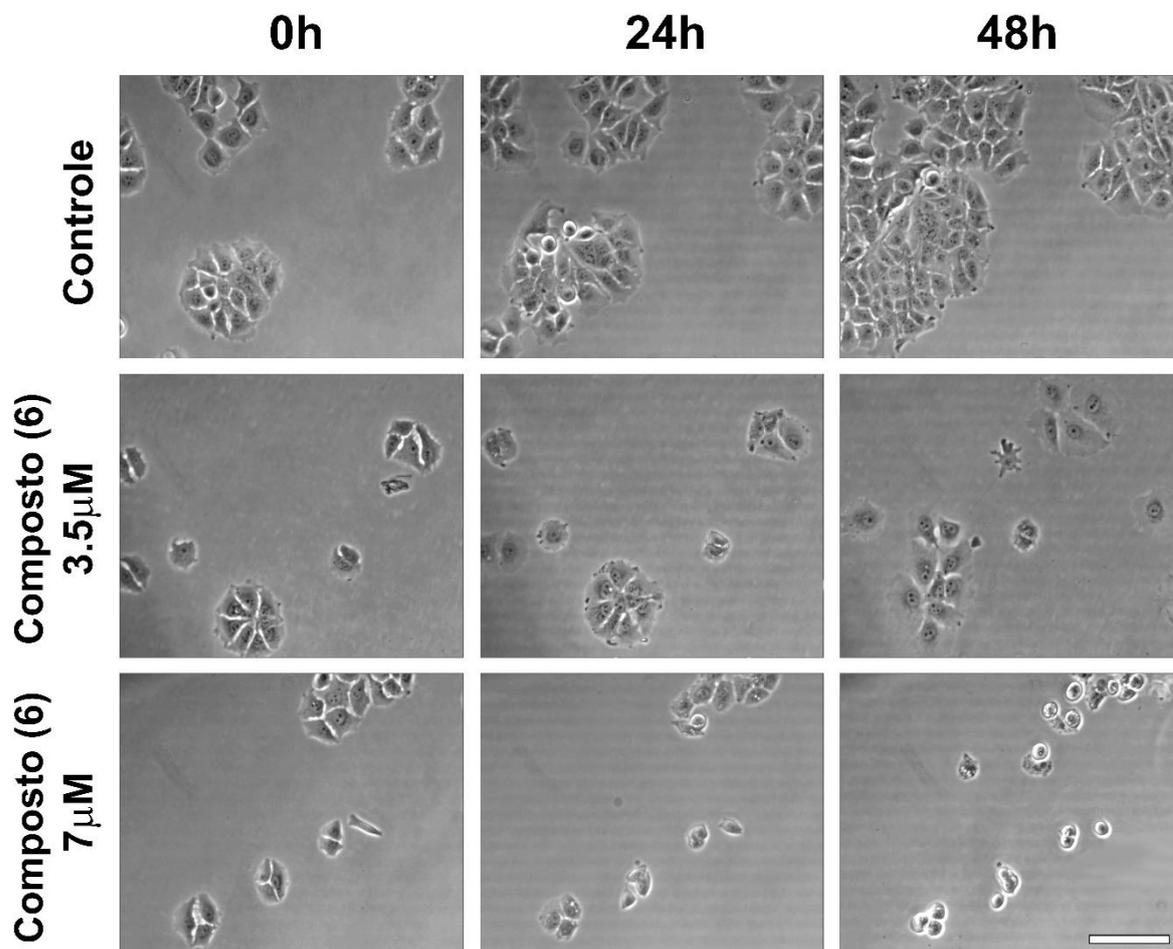
Figura 5 – Análise morfológica (composto 3)



Fonte: da autora (2024)

Nota: Imagens ilustrativas, obtidas por microscopia de contraste de fase, mostrando o aspecto morfológico de células MCF-7 após 24h e 48h de tratamento com o composto (3) nas concentrações de 10 μM e 20 μM. Barra: 100 μm.

Figura 6 – Análise morfológica (composto 6)

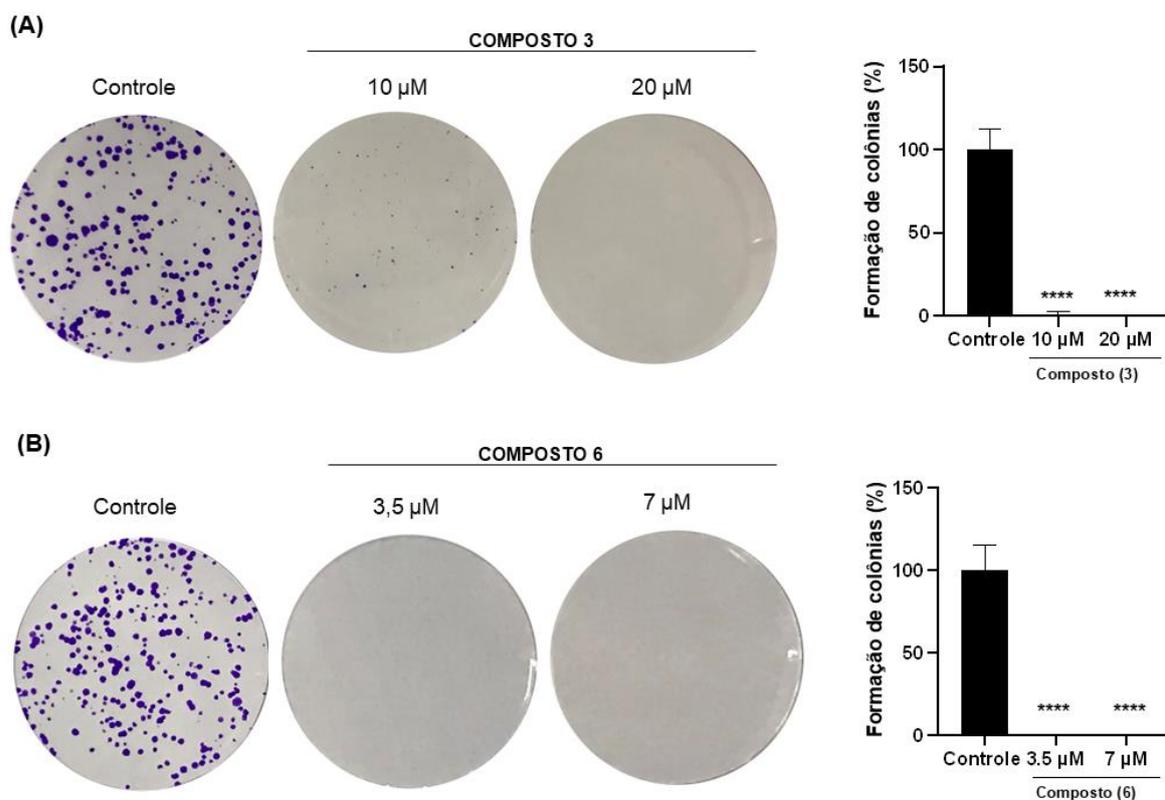


Fonte: da autora (2024)

Nota: Imagens ilustrativas, obtidas por microscopia de contraste de fase, mostrando o aspecto morfológico de células MCF-7 após 24h e 48h de tratamento com o composto (6) nas concentrações de 3,5 μM e 7,0 μM. Barra: 100 μm.

O ensaio de capacidade clonogênica foi realizado em células MCF-7 tratadas com os compostos 3 e 6, nas concentrações de 10 e 20 μM e 3,5 e 7,0 μM, respectivamente. Ambas as substâncias inibiram completamente a formação de colônias (Figura 7), indicando que a exposição ao tratamento por 48 horas foi suficiente para inibir a proliferação de células MCF-7 por longo período de tempo, considerando que as colônias foram fixadas após 11 dias de recuperação (sem o tratamento).

Figura 7 – Ensaio de capacidade clonogênica



Fonte: da autora (2024)

Legenda: Imagens ilustrativas e análise do ensaio de capacidade clonogênica em células MCF-7 (A) após 48h de tratamento com o composto **3** a 10  $\mu$ M e 20  $\mu$ M e 11 dias de recuperação. (B) após 48h de tratamento com o composto **6** a 3,5  $\mu$ M e 7,0  $\mu$ M e 11 dias de recuperação. \*\*\*\*  $p < 0,0001$  para comparações com o controle, segundo ANOVA seguido de pós-teste de Tukey.

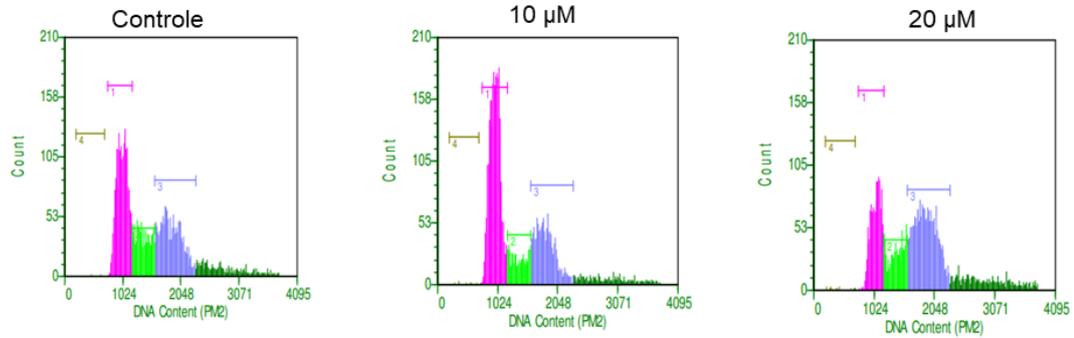
## 5.2 DINÂMICA DE PROGRESSÃO NO CICLO CELULAR

A análise do ciclo celular foi realizada por citometria de fluxo para avaliar a progressão do ciclo celular em células MCF-7 tratadas por 48h com os compostos (**3**) a 10 e 20  $\mu$ M e (**6**) a 3,5 e 7,0  $\mu$ M. Ambas as substâncias modificaram o padrão de distribuição do ciclo celular em relação aos grupos controle, conforme mostrado nas Figuras 8 e 9. Nos grupos tratados com a substância **3** a 10  $\mu$ M, houve um aumento da população G0/G1 e concomitante redução da frequência de células na fase S, ao passo que a 20  $\mu$ M, esse aumento foi observado na população G2/M (Figura 8). O tratamento com a substância **6** a 3,5  $\mu$ M ocasionou um aumento da população G2/M e diminuição de células na fase S, enquanto no grupo tratado com 7,0  $\mu$ M, houve um aumento da população sub-G1, sugerindo que houve indução de morte celular (Figura 9).

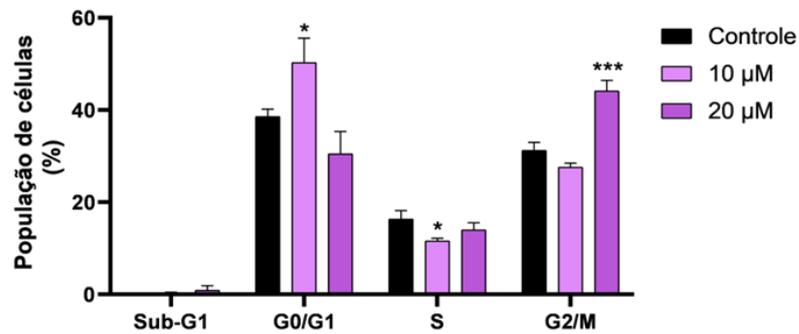
Figura 8 – Análise de progressão do ciclo celular (composto **3**)

**Composto 3**

(A)

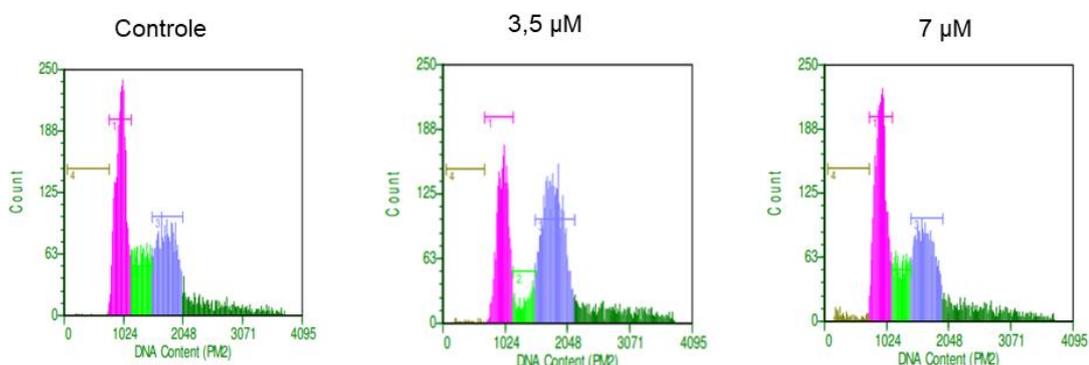
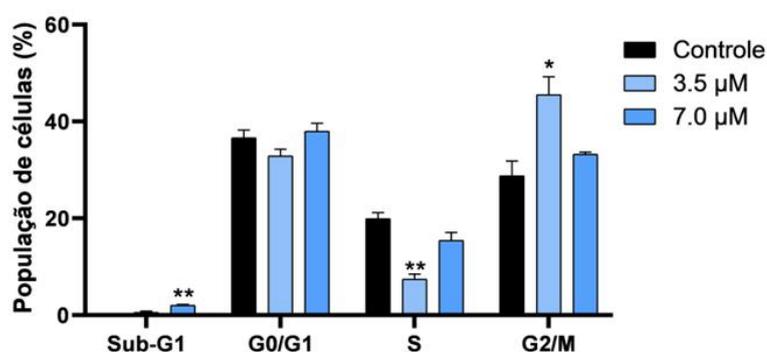


(B)



Fonte: da autora (2024)

Legenda: (A, B) Histogramas representativos e análise do ensaio de progressão do ciclo celular em células MCF-7 após 48 h de tratamento com o composto **3** a 10 μM e 20 μM. \*  $p < 0,05$  \*\*\*  $p < 0,001$  para comparações com o controle, segundo ANOVA seguido de pós-teste de Tukey.

Figura 9 – Análise de progressão do ciclo celular (composto **6**)**Composto 6****(A)****(B)**

Fonte: da autora (2024)

Legenda: (A, B) Histogramas representativos e análise do ensaio de progressão do ciclo celular em células MCF-7 após 48 h de tratamento com o composto (**6**) a 3,5 µM e 7 µM. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  para comparações com o controle, segundo ANOVA seguido de pós-teste de Tukey.

Para investigar as possíveis alterações moleculares envolvidas na atividade antiproliferativa dos compostos **3** e **6**, foram realizadas análises de expressão gênica de reguladores do ciclo celular. A abundância de RNA mensageiro (RNAm) dos genes alvos (*CCND1*, *CCNB1*, *CDKN1A* e *MYC*) foi avaliada por qPCR após 24h de tratamento com os compostos **3** (10 µM e 20 µM) e **6** (3,5 µM e 7,0 µM) em células MCF-7. O perfil de expressão em nível proteico das ciclinas B e D foram avaliados após 48h de tratamento por *Western Blotting*, sendo que os compostos foram usados nas mesmas concentrações da análise de qPCR.

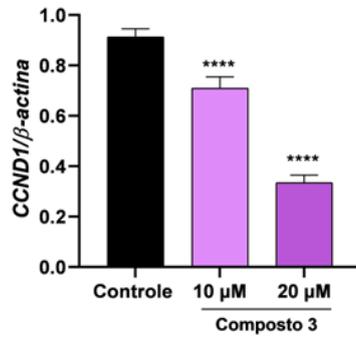
Nos grupos tratados com o composto **3** a 10 e 20 µM houve redução da abundância de RNAm de ciclina D (*CCND1*), entretanto este efeito não foi observado em nível proteico (Figuras 10A e 10E). Também houve diminuição da expressão de MYC (Figura 10D) em ambas as concentrações testadas. A 20 µM, houve redução na expressão de ciclina B (RNAm e proteína) (Figuras 10B e 10F) e aumento de RNAm de *CDKN1A*, também conhecida como proteína p21 (Figura 10C).

O composto **6** reduziu os níveis de RNAm de (*CCND1*) em ambas as concentrações avaliadas (3,5 e 7  $\mu$ M), contudo os níveis proteicos de ciclina D foram reduzidos somente no grupo tratado com **6** a 7  $\mu$ M (Figuras 11A e 11E). Redução dos níveis de ciclina B (RNAm e proteína) (Figuras 11B e 11F) e MYC (Figura 11D) foram observados nas amostras tratadas com 3,5 e 7,0  $\mu$ M, enquanto nas mesmas condições foi observado aumento da expressão relativa de *CDKN1A* (Figura 11C).

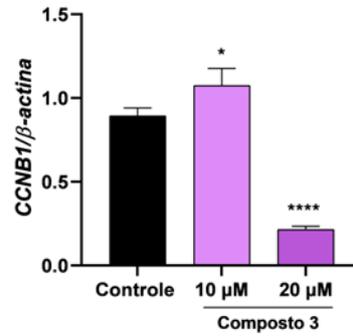
Figura 10 – Análise da expressão gênica de reguladores do ciclo celular (composto 3)

COMPOSTO 3

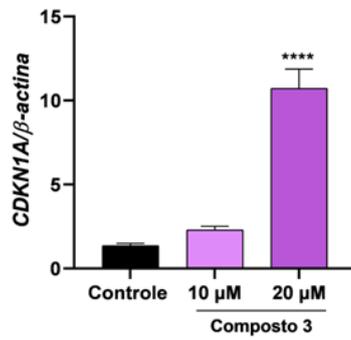
(A)



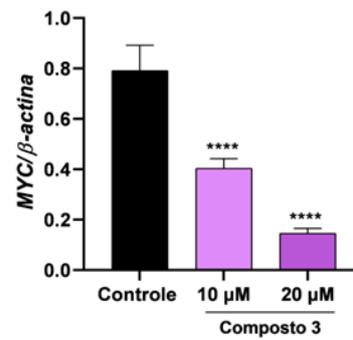
(B)



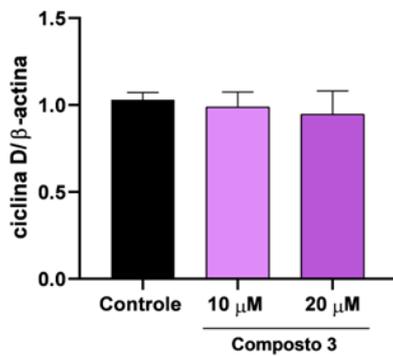
(C)



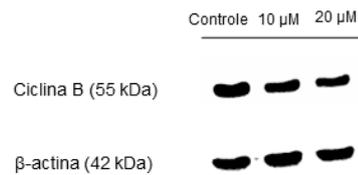
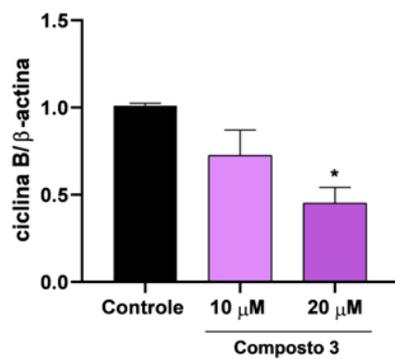
(D)



(E)



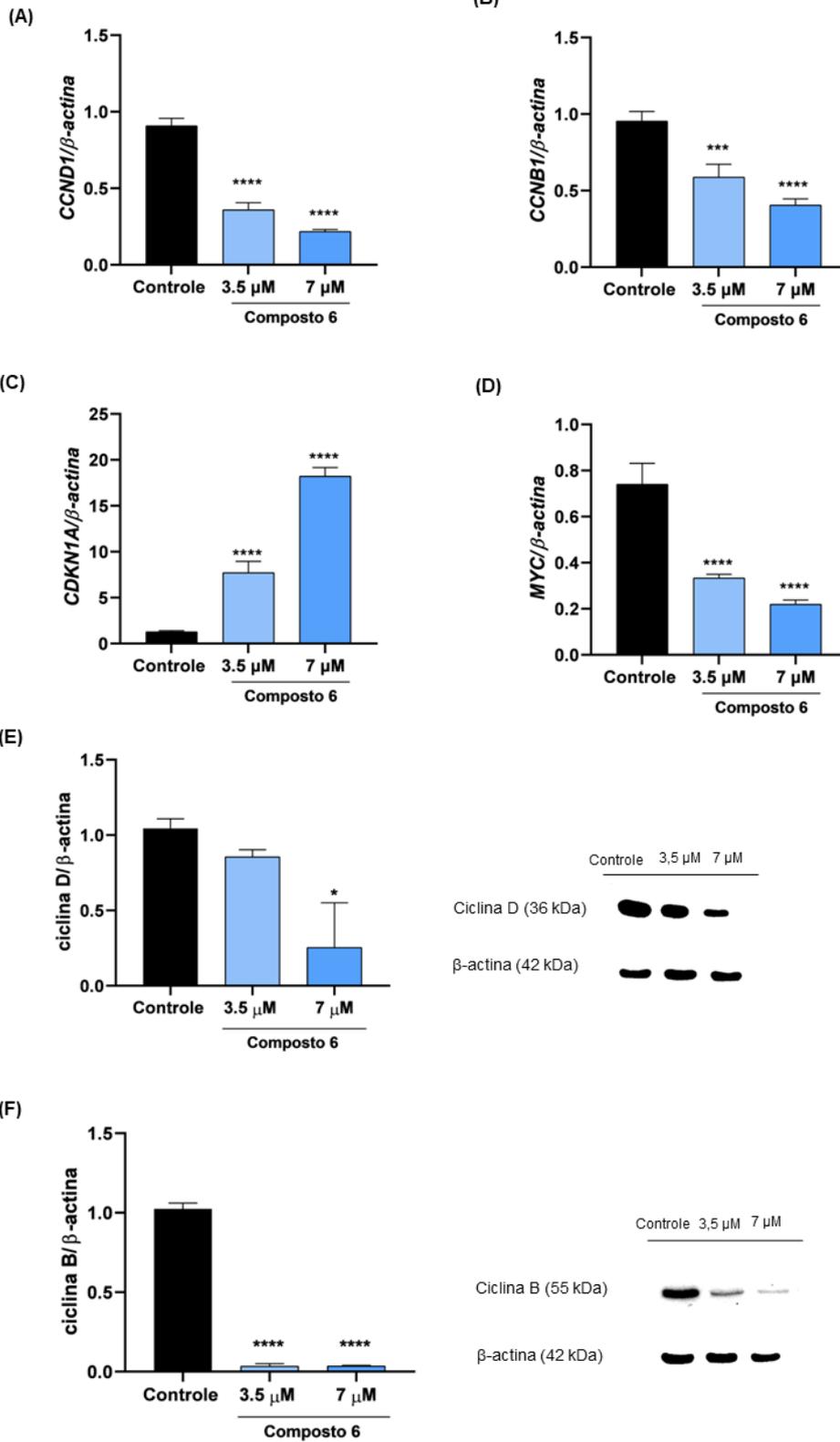
(F)



Legenda: (A, B, C e D) Análise da abundância de RNAm de genes alvo (*CCND1*, *CCNB1*, *CDKN1A* e *MYC*), após 24h de tratamento em células MCF-7 com o composto **3** a 10  $\mu$ M e 20  $\mu$ M. (E e F) Análise da expressão de proteínas alvo (ciclina D e B) após 48h de tratamento em células MCF-7 com o composto **3** a 10  $\mu$ M e 20  $\mu$ M;  $\beta$ -actina utilizada como controle de carregamento. \* $p < 0,05$  \*\*\*\* $p < 0,0001$ , segundo ANOVA seguido de pós-teste de Tukey.

Figura 11– Análise da expressão gênica de reguladores do ciclo celular (composto 6)

## COMPOSTO 6



Legenda: (A, B, C e D) Análise da abundância de RNAm de genes alvo (*CCND1*, *CCNB1*, *CDKN1A* e *MYC*), após 24h de tratamento em células MCF-7 com o composto **6** a 3,5  $\mu\text{M}$  e 7  $\mu\text{M}$ . (E e F) Análise da expressão de proteínas alvo (ciclina D e B) após 48h de tratamento em células MCF-7 com o composto **6** a 3,5  $\mu\text{M}$  e 7  $\mu\text{M}$ ;  $\beta$ -actina utilizada como controle de carregamento. \* $p < 0,05$  \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$ , segundo ANOVA seguido de pós-teste de Tukey.

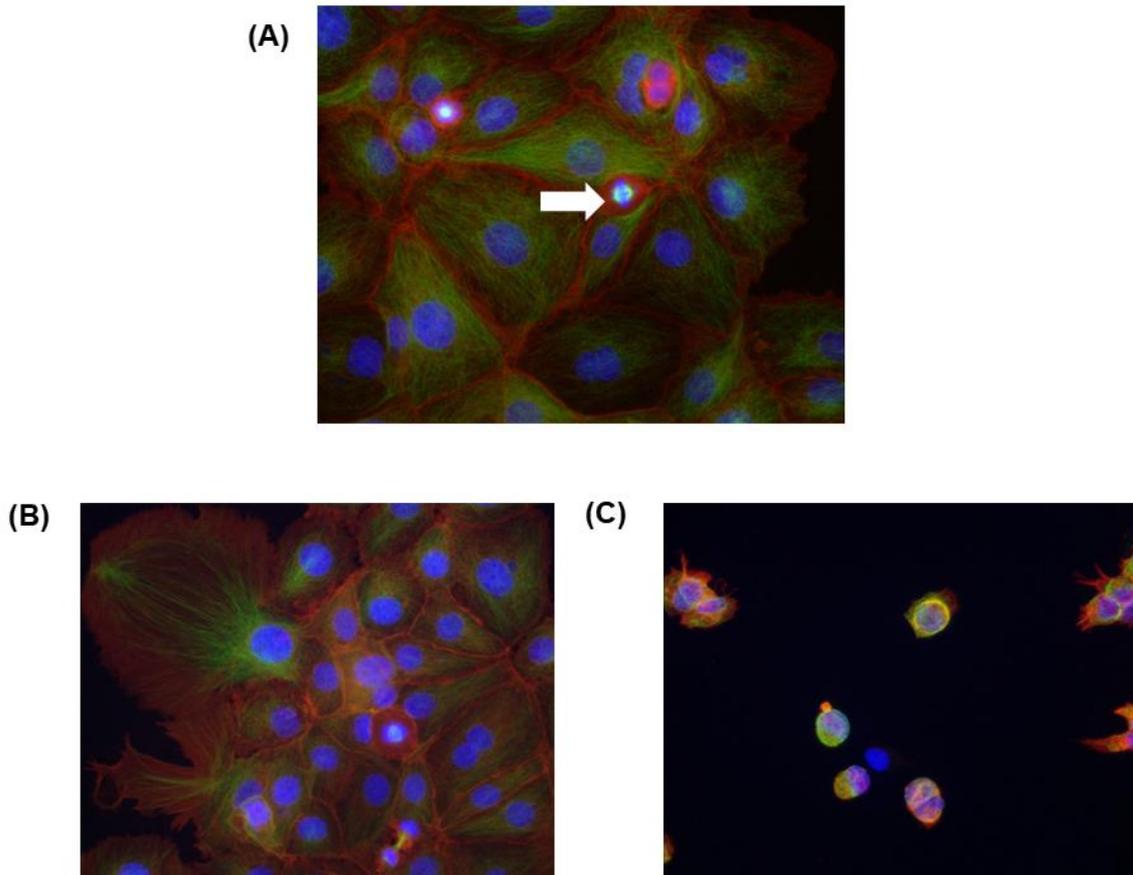
### 5.3 MORFOLOGIA NUCLEAR E DO CITOESQUELETO

A avaliação do aspecto morfológico nuclear e de componentes do citoesqueleto (microtúbulos e filamentos de actina) de células MCF-7 foi realizada empregando marcadores fluorescentes após 48h de tratamento com os compostos (**3**) a 10 e 20  $\mu\text{M}$  e (**6**) a 3,5 e 7,0  $\mu\text{M}$ . Os seguintes eventos foram observados: frequência de células em mitose; padrão de distribuição de microtúbulos e microfilamentos e alterações nucleares (micronucleação, multinucleação, fragmentação nuclear, superfície nuclear irregular e núcleos picnóticos) (Figuras 12 e 13).

O tratamento com o composto **3** reduziu a frequência de células por campo e de células em mitoses, ao passo que atipias nucleares foram mais observadas nos grupos tratados em relação aos controles. Além disso, as células tornaram-se maiores, confirmando as observações feitas por microscopia de contraste de fase (Figuras 14 A, B, C e 15).

O tratamento com composto **6** induziu efeitos similares aos observados para o composto **3**, como diminuição do número de células por campo e de eventos mitóticos. As alterações nucleares foram mais frequentes no grupo tratado a 3,5  $\mu\text{M}$  e foram observadas células com dimensões aumentadas em comparação às amostras do grupo controle. No grupo tratado com o composto **6** (7  $\mu\text{M}$ ) houve uma significativa redução no número de células por campo, sendo possível observar grande desarranjo dos microtúbulos e dos filamentos de actina (Figuras 14 D, E, F e 16).

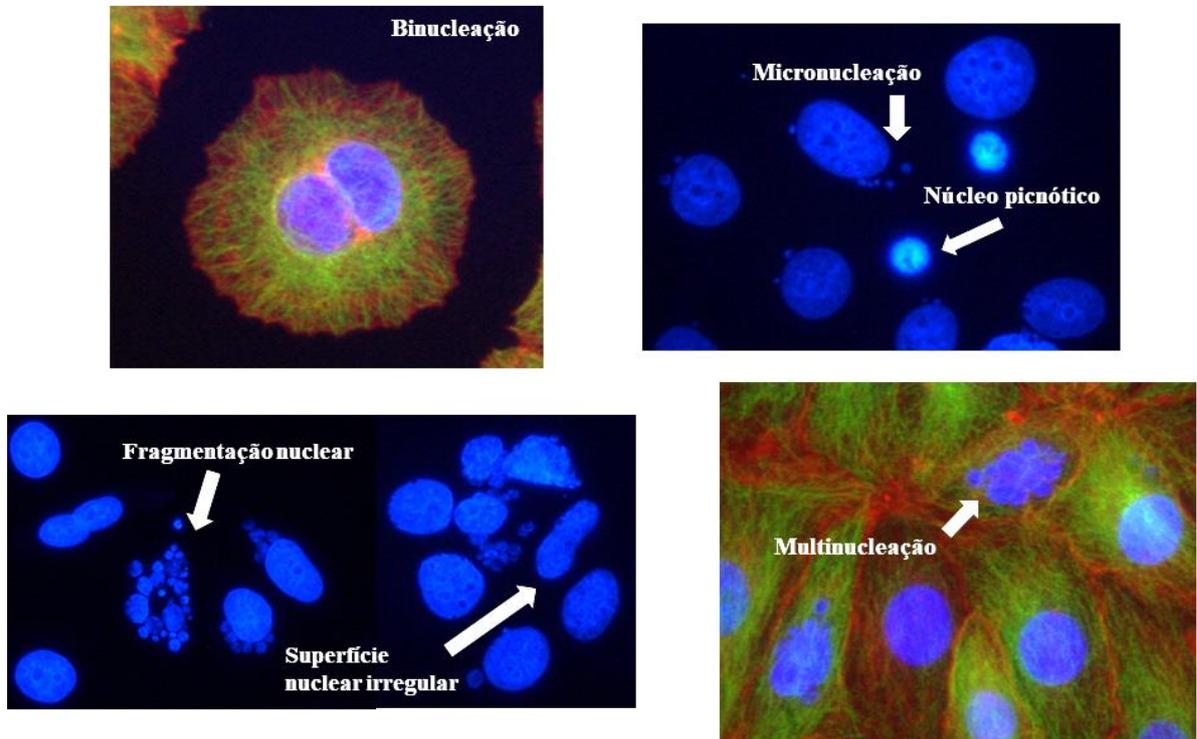
Figura 12 – Eventos celulares observados por imunofluorescência



Fonte: da autora (2024)

Legenda: Imagens representativas obtidas por microscopia de fluorescência mostrando o padrão de distribuição de elementos do citoesqueleto (verde: imunodeteção de  $\alpha$ -tubulina; vermelho: filamentos de actina) e núcleo (azul). (A) Imagem evidenciando célula em mitose (seta). (B, C) Imagens demonstrando diferentes aspectos do citoesqueleto.

Figura 13 –Atipias nucleares observadas por imunofluorescência

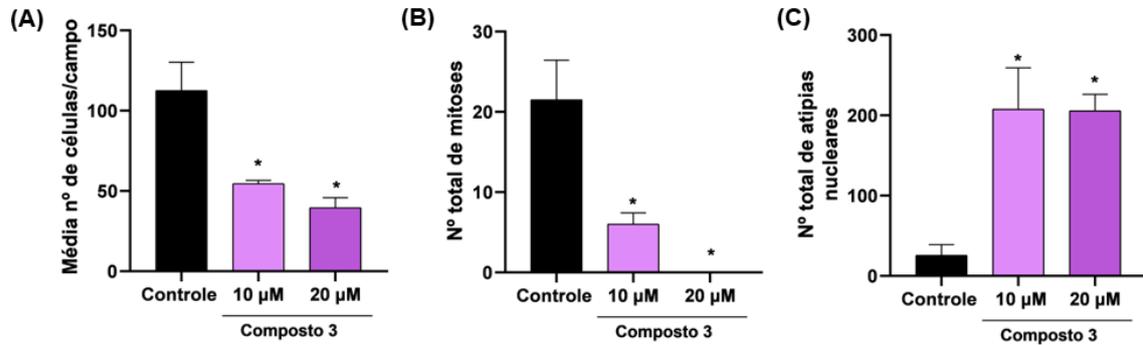
**Alterações nucleares**

Fonte: da autora (2024)

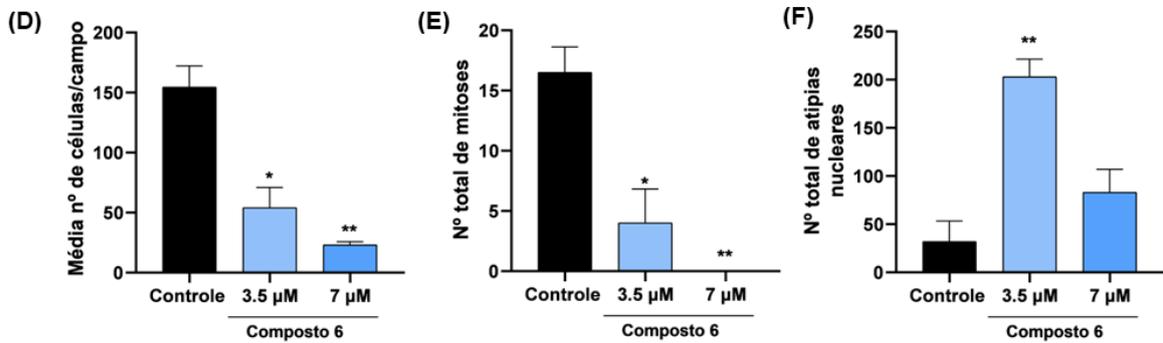
Legenda: Imagens representativas obtidas por microscopia de fluorescência mostrando diferentes atipias nucleares (indicadas pelas setas brancas) que foram observadas nos grupos tratados (verde: imunodeteção de  $\alpha$ -tubulina; vermelho: filamentos de actina) e núcleo (azul).

Figura 14 – Análise dos eventos celulares (compostos 3 e 6)

## Composto 3



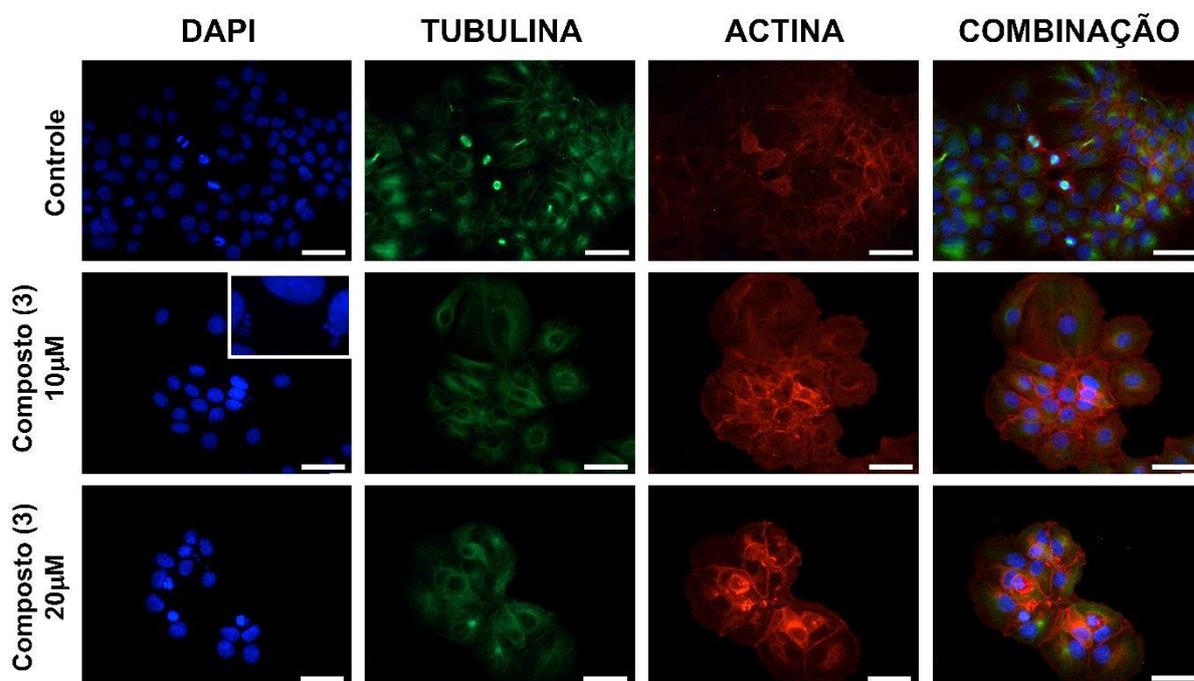
## Composto 6



Fonte: da autora (2024)

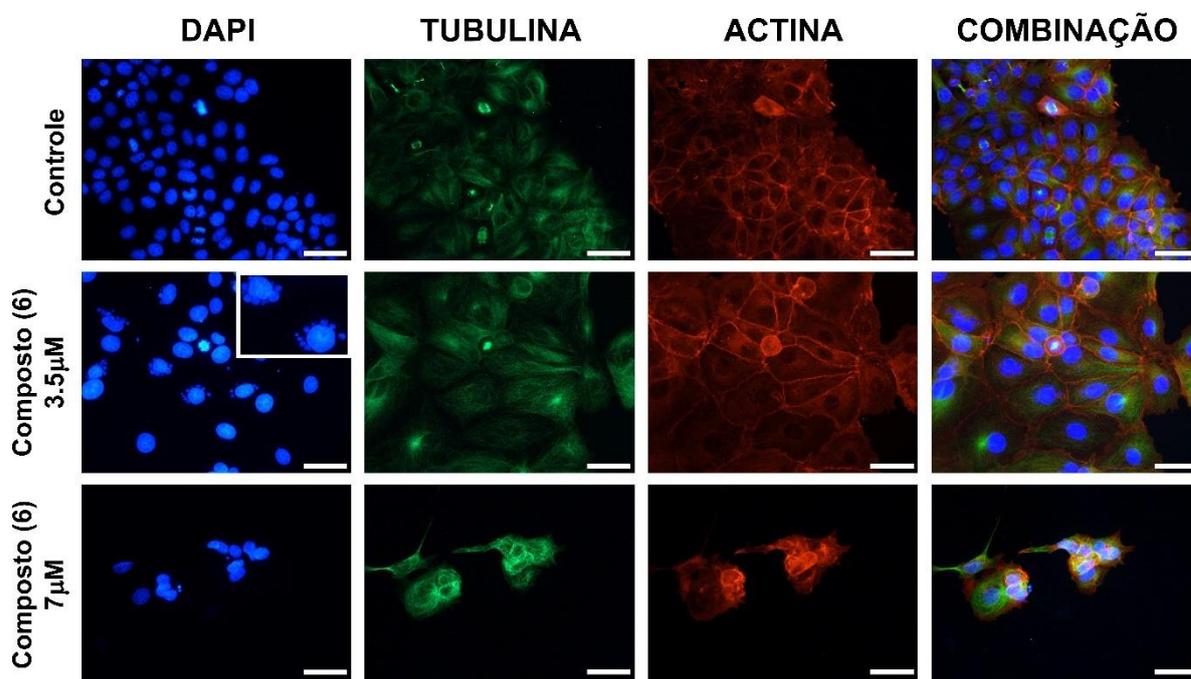
Legenda: Análise realizada em preparações citológicas marcadas para  $\alpha$ -tubulina e filamentos de actina. As células MCF-7 foram tratadas com os compostos 3 (10  $\mu$ M e 20  $\mu$ M) e 6 (3,5  $\mu$ M e 7  $\mu$ M) por 48h. (A, D) Média do número total de células contadas por campo. (B, E) Número total de mitoses contadas. (C, F) Número total de atipias nucleares. \* p < 0,05 \*\* p < 0,01 para comparações com o controle, segundo ANOVA seguido de pós-teste de Tukey. Foram contadas 1000 células por grupo.

Figura 15 – Imagens de imunofluorescência (composto 3)



Fonte: da autora (2024)

Nota: Imagens ilustrativas obtidas por microscopia de fluorescência mostrando os aspectos do núcleo (azul),  $\alpha$ -tubulina (verde) e filamentos de actina (vermelho) de células MCF-7 após 48h de tratamento com o composto (3) a 10  $\mu$ M e 20  $\mu$ M. Barra: 50  $\mu$ m.

Figura 16 – Imagens de imunofluorescência (composto **6**)

Fonte: da autora (2024)

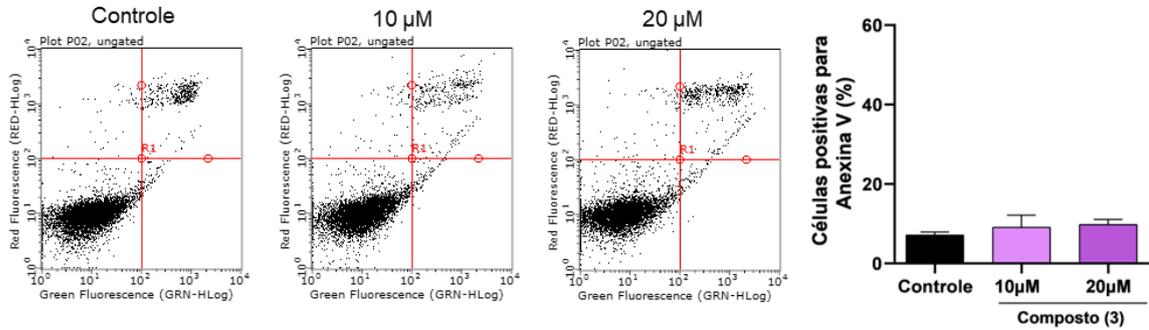
Nota: Imagens ilustrativas obtidas por microscopia de fluorescência mostrando os aspectos do núcleo (azul),  $\alpha$ -tubulina (verde) e filamentos de actina (vermelho) de células MCF-7 após 48h de tratamento com o composto (**6**) a 3,5  $\mu$ M e 7  $\mu$ M. Barra: 50  $\mu$ m.

#### 5.4 INDUÇÃO DE APOPTOSE

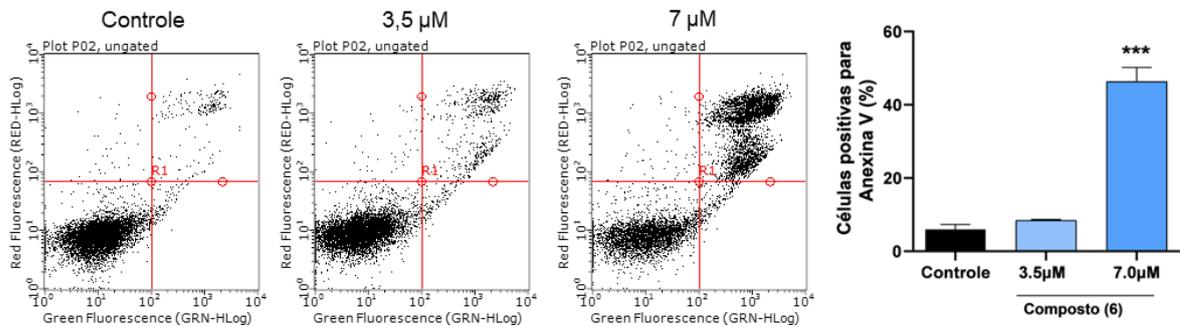
A determinação da frequência de células apoptóticas em culturas de células MCF-7 foi obtida pelo ensaio de anexina V após 48h de tratamento com os compostos (**3**) a 10 e 20  $\mu$ M e (**6**) a 3,5 e 7,0  $\mu$ M. A análise realizada por citometria de fluxo mostrou que não houve aumento na frequência de células positivas para anexina V em nenhum dos grupos tratados com a substância **3**, 10  $\mu$ M ( $9,14\% \pm 3,0\%$ ) e 20  $\mu$ M ( $9,81\% \pm 1,28\%$ ), em comparação com o grupo controle ( $7,19\% \pm 0,72\%$ ) (Figura 17A). O tratamento com a substância **6** a 3,5  $\mu$ M ( $8,4\% \pm 0,25\%$ ) também não apresentou diferença significativa em relação ao controle ( $5,95\% \pm 1,36\%$ ). Entretanto, a 7,0  $\mu$ M ( $46,32\% \pm 3,86\%$ ), houve aumento na frequência de células positivas para anexina V, corroborando com o aumento da população sub-G1 observada na análise de progressão do ciclo celular (Figura 17B).

Figura 17 – Análise do ensaio de anexina V (compostos 3 e 6)

(A) Composto 3



(B) Composto 6



Fonte: da autora (2024)

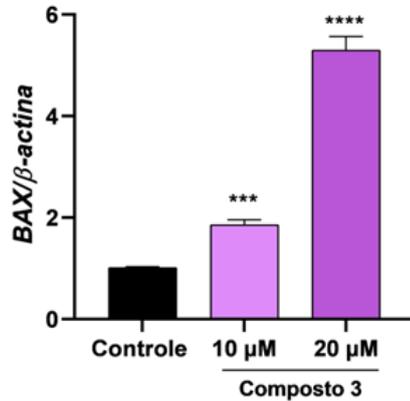
Legenda: Análise de indução de apoptose usando o ensaio de anexina V em células MCF-7 após 48 h de tratamento com os compostos 3 (10  $\mu$ M e 20  $\mu$ M) (A) e 6 (3,5  $\mu$ M e 7  $\mu$ M) (B). Nos dotplots representativos, células viáveis (quadrantes inferiores esquerdos), apoptose inicial (quadrantes inferiores direitos), apoptose tardia (quadrantes superiores direitos) e células necróticas (quadrantes superiores esquerdos) podem ser observadas. \*\*\*  $p < 0,001$ , segundo ANOVA seguido de pós-teste de Tukey.

Para avaliar a influência dos compostos na expressão de genes associados a regulação da apoptose, foi determinada a expressão relativa dos RNAm que codificam as proteínas pró-apoptótica BAX e antiapoptótica BCL2. A análise foi realizada após 24h de tratamento com os compostos (3) a 10 e 20  $\mu$ M e (6) a 3,5 e 7,0  $\mu$ M. Ambos os compostos modularam a expressão destes genes em todas as concentrações testadas. Houve aumento significativo na abundância de RNAm para BAX e diminuição dos níveis de BCL2 (Figura 18).

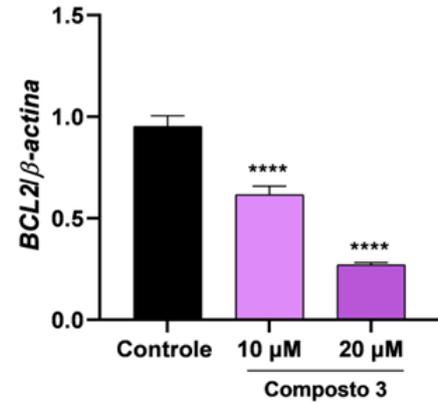
Figura 18 – Análise da expressão gênica de reguladores da apoptose

### Composto 3

(A)

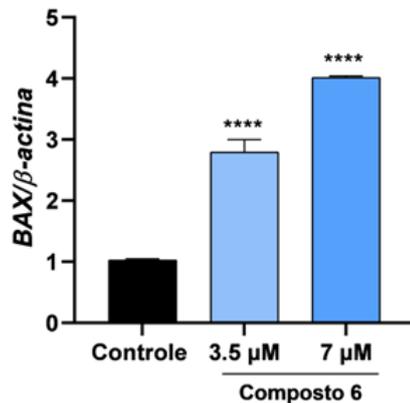


(B)

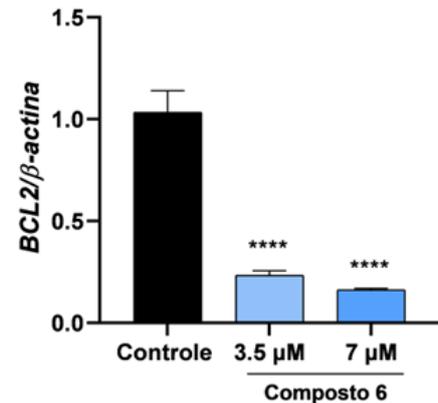


### Composto 6

(C)



(D)



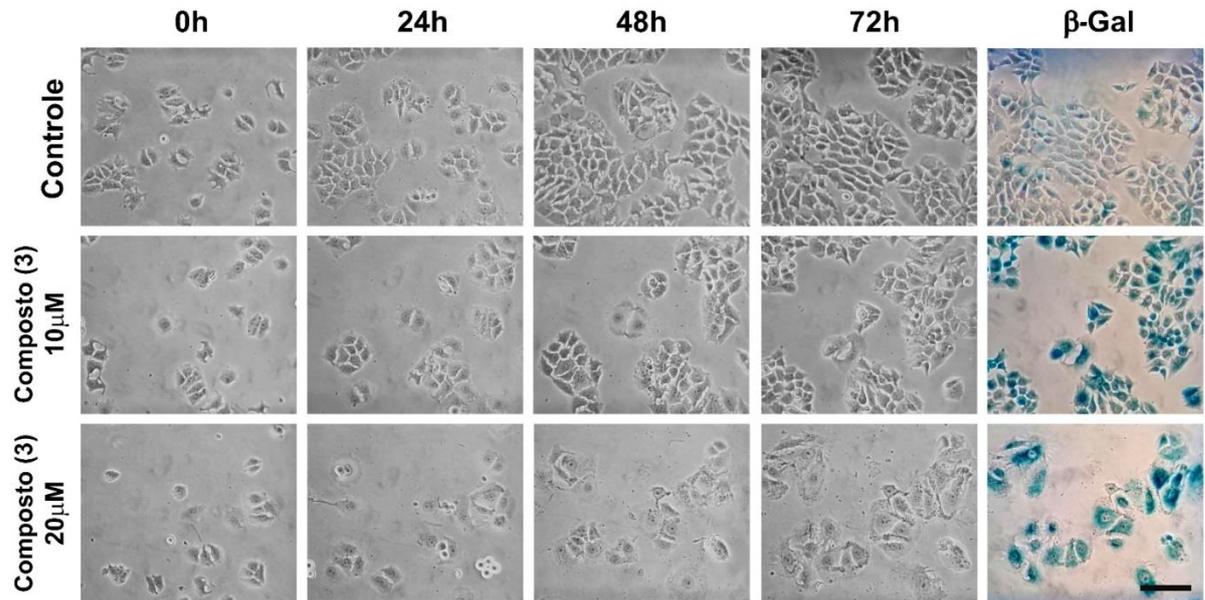
Fonte: da autora (2024)

Legenda: Análise da expressão gênica (RNAm) determinada por qPCR em células MCF-7 após 24h com os compostos (3) a 10 μM e 20 μM e (6) a 3,5 μM e 7 μM (A, C) Expressão relativa de *BAX*. (B, D) Expressão relativa de *BCL2*. \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , segundo ANOVA seguido de pós-teste de Tukey.

## 5.5 INDUÇÃO DE SENESCÊNCIA

A senescência celular foi avaliada pela atividade da enzima β-Galactosidase. As imagens registradas evidenciam que o tratamento com o composto 3 a 20 μM causa alterações morfológicas na linhagem MCF-7, tornando estas células maiores (Figura 19). Após 72 horas foi possível observar o aumento da marcação para enzima β-Galactosidase nos grupos tratados a 10 e 20 μM em relação ao controle (Figura 20), sugerindo que o composto 3 foi capaz de induzir senescência nas células MCF-7.

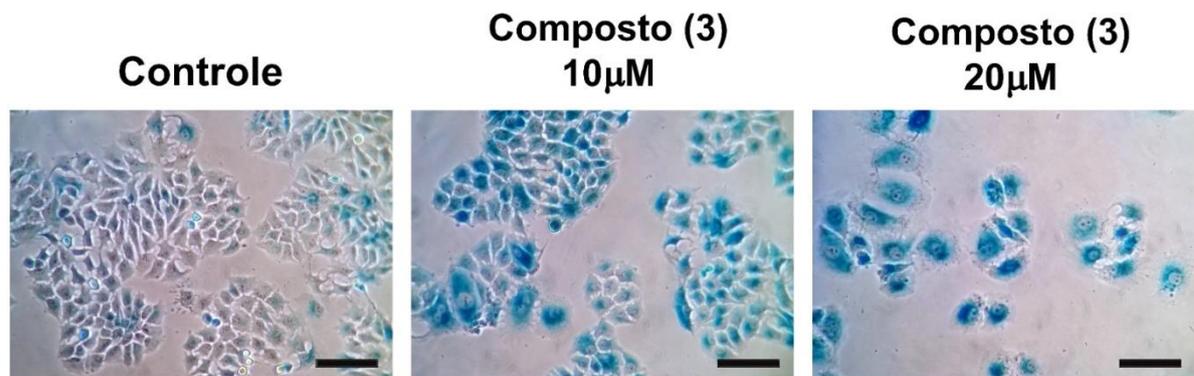
Figura 19 – Análise morfológica e marcação  $\beta$ -gal (composto 3)



Fonte: da autora (2024)

Nota: Imagens ilustrativas, obtidas por microscopia de contraste de fase, mostrando o aspecto morfológico de células MCF-7 após 24h, 48h e 72h de tratamento com o composto 3 nas concentrações de 10  $\mu$ M e 20  $\mu$ M. A reação para a enzima  $\beta$ -galactosidase foi realizada após 72h de tratamento.

Figura 20 – Análise senescência (composto 3)



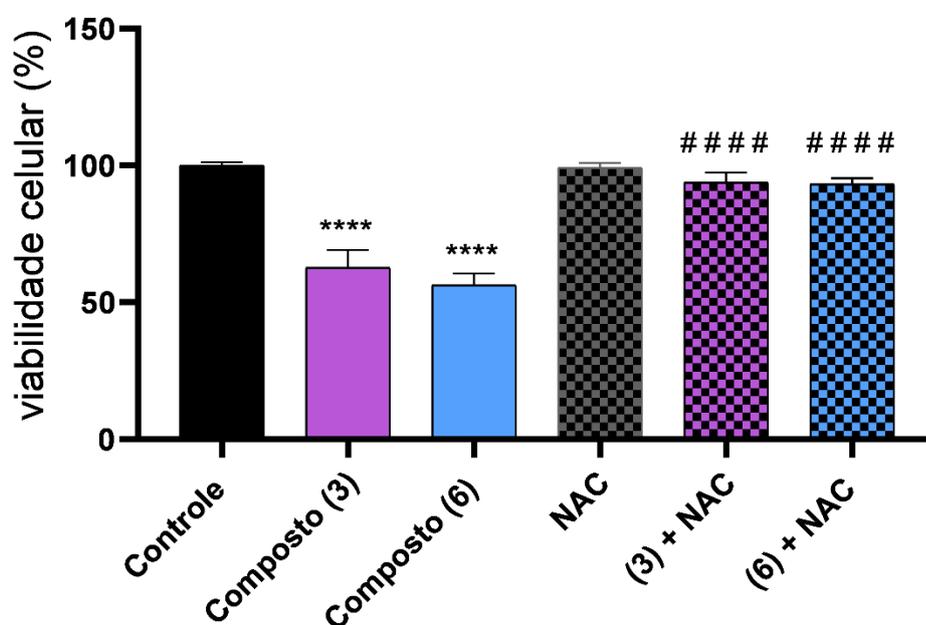
Fonte: da autora (2024)

Nota: Imagens ilustrativas, obtidas por microscopia de contraste de fase, mostrando a marcação da enzima  $\beta$ -Galactosidase após 72h de tratamento com o composto 3 a 10  $\mu$ M e 20  $\mu$ M. Barra: 100  $\mu$ m.

## 5.6 INDUÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO

Ensaio de viabilidade celular foram realizados para avaliar se N-acetil-cisteína (NAC), um agente antioxidante, poderia reverter os efeitos induzidos pelas substâncias avaliadas. Assim, as células foram tratadas com os compostos (3) e (6) na presença ou ausência de NAC. Os resultados mostraram que nos grupos tratados apenas com as substâncias 3 e 6 houve uma redução de cerca de 40% da viabilidade celular em relação ao controle: Controle=  $100,0 \pm 1,17\%$ ; composto 3=  $62,73 \pm 6,27\%$ ; composto 6=  $56,30 \pm 4,22\%$ . Enquanto, nos grupos tratados concomitantemente com o NAC, o antioxidante foi capaz de prevenir os efeitos de ambos os compostos em relação a redução da viabilidade celular: Controle + NAC=  $99,22 \pm 1,77\%$ ; composto 3 + NAC=  $93,84 \pm 3,64\%$ ; composto 6=  $93,21 \pm 2,06\%$  (Figura 21). Sugerindo que, possivelmente, um dos mecanismos de ação dos compostos 3 e 6 é a indução de estresse oxidativo em células MCF-7.

Figura 21 – Análise da viabilidade celular com NAC

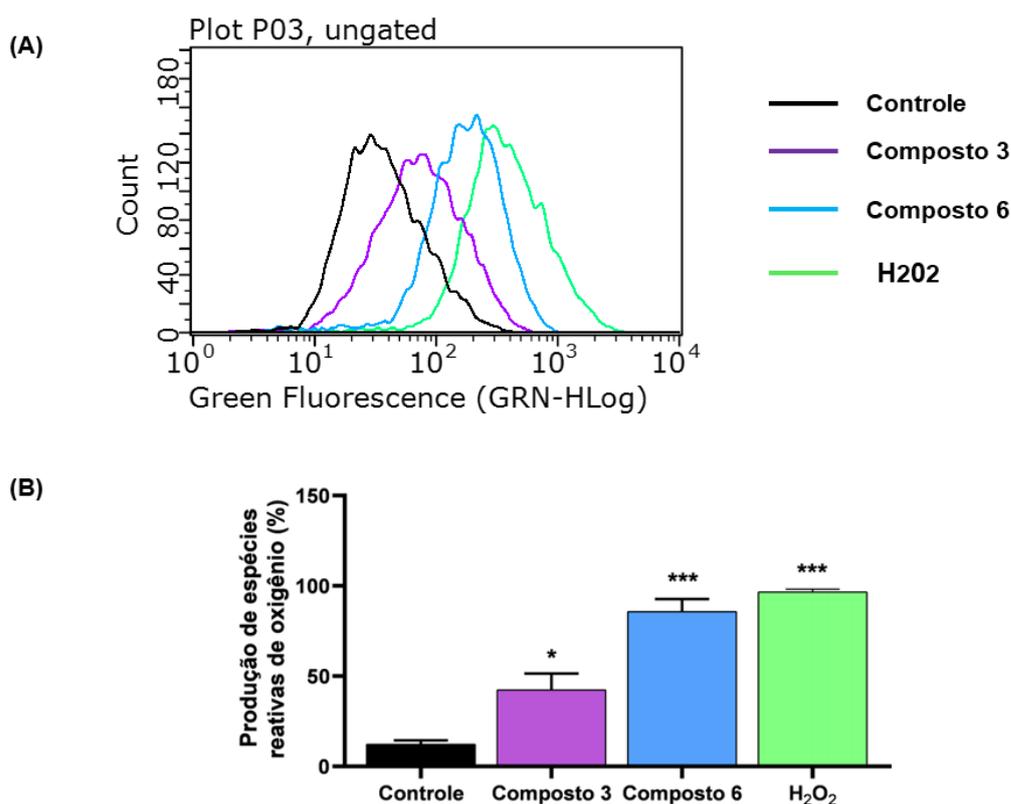


Fonte: da autora (2024)

Legenda: Análise da viabilidade celular após 48h de tratamento de células MCF-7 com o composto 3 a 20  $\mu\text{M}$  e o composto 6 a 7  $\mu\text{M}$  na presença ou ausência de NAC a 1mM. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , para comparação com o grupo controle; ####  $p < 0,0001$  para comparação dos grupos (composto 3 e composto 6) com seus correspondentes (+NAC), segundo ANOVA seguido de pós-teste de Tukey.

Diante destes resultados, para confirmar se o mecanismo de ação dos compostos 3 e 6 está relacionado a indução de estresse oxidativo, foi avaliada a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) usando uma sonda específica. Os resultados obtidos demonstraram que ambos os compostos aumentam os níveis de ROS em relação ao grupo controle (Figura 22). O composto 3 ( $42,46 \pm 8,99$  %) aumentou a produção de ROS cerca 3,5 vezes em relação ao controle ( $12,46 \pm 2,1$ %). Enquanto no composto 6 ( $85,78 \pm 6,6$ %) este aumento foi o dobro, cerca de 7 vezes, se aproximando muito dos valores encontrados no controle positivo  $H_2O_2$  ( $96,74 \pm 1,46$ %). Estes dados sugerem que os efeitos dos compostos 3 e 6 na linhagem MCF-7 estão, pelo menos em parte, associados a indução de estresse oxidativo.

Figura 22 – Análise do ensaio CellROX



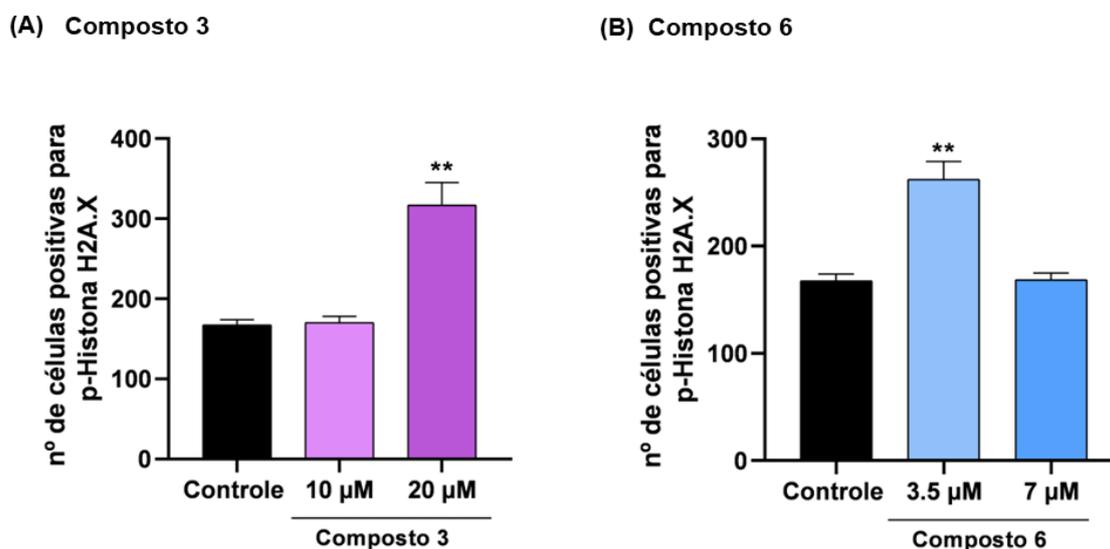
Fonte: da autora (2024)

Legenda: (A) Histograma representativo obtido por citometria de fluxo para detecção de espécies reativas de oxigênio (ROS). As células foram tratadas por 4h com os compostos 3 (20  $\mu$ M) e 6 (7  $\mu$ M). Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) foi utilizado como controle positivo, o qual ficou em contato com a cultura por 30 minutos. (B) Análise quantitativa da produção ROS (%). \*  $p < 0,05$  \*\*\*  $p < 0,001$ , segundo ANOVA seguido de pós-teste de Tukey.

## 5.7 INDUÇÃO DE DANOS AO DNA

O DNA é um dos principais alvos de espécies reativas de oxigênio, dessa forma, foi analisada a indução de danos ao DNA pelos compostos **3** e **6**, por meio da avaliação do número de células marcadas por p-Histona H2A.X, uma vez que esta proteína é ativada em resposta à danos ao DNA. As células MCF-7 foram tratadas com os compostos **3** a 10  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{M}$  composto **6** a 3,5  $\mu\text{M}$  e 7,0  $\mu\text{M}$  durante 24 horas (Figuras 24 e 25). As análises de imunofluorescência mostraram que o composto **3** a 20  $\mu\text{M}$  causa um aumento no número de células positivas para p-Histona H2A.X (Figura 23A), enquanto o composto **6** induziu aumento significativo na frequência de células positivas para p-Histona H2A.X quando utilizado na concentração de 3,5  $\mu\text{M}$  (Figura 23B). Apesar de não haver um aumento do números de células positivas para esse marcador de dano ao DNA no grupo tratado com o composto **6** a 7  $\mu\text{M}$ , observou-se que neste grupo as células positivas exibiam marcação intensa, sugerindo que nas células viáveis houve eventos de danos ao DNA. Estes dados sugerem que ambos os compostos induzem danos ao DNA em células MCF-7.

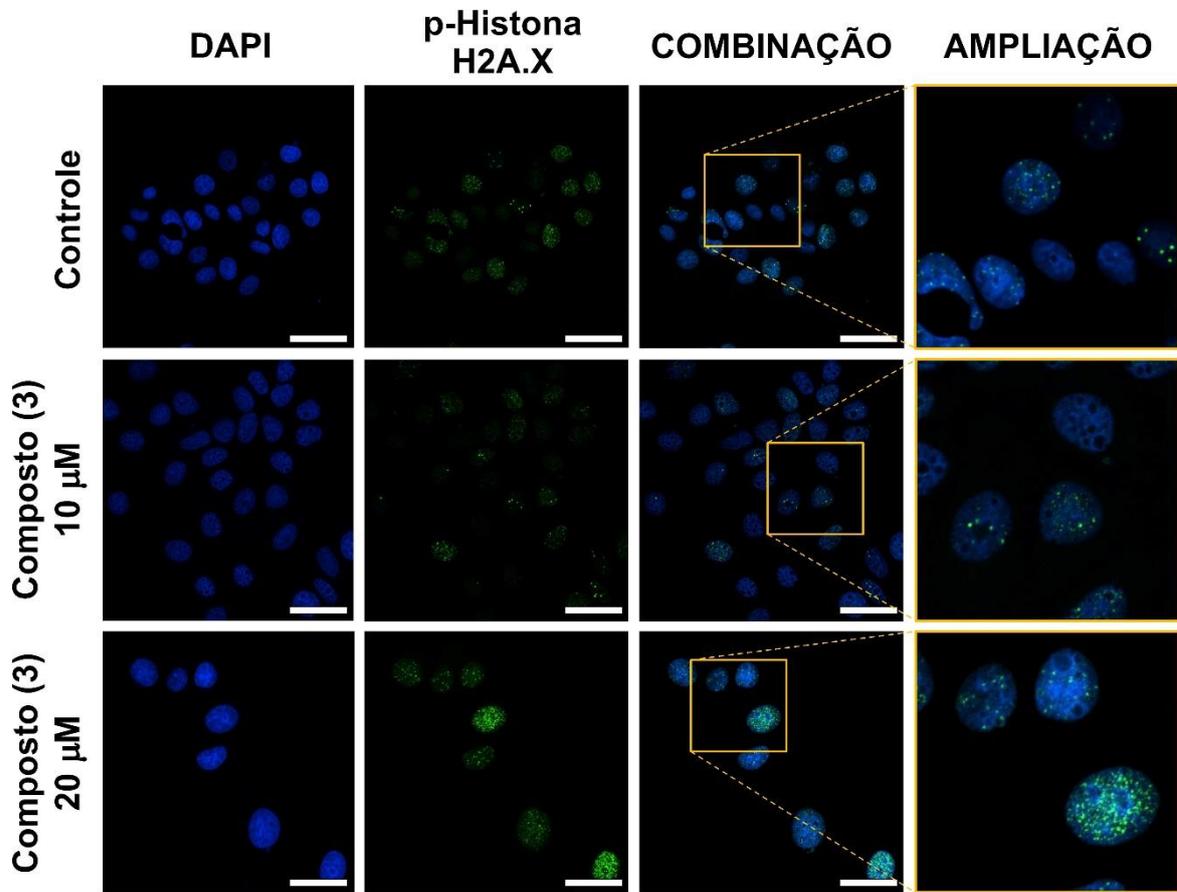
Figura 23 – Análise expressão p-Histona H2A.X



Fonte: da autora (2024)

Legenda: Análise do número de células marcadas por p-Histona H2A.X em células MCF-7, considerando a contagem de 500 células por grupo. (A) Após 24 h de tratamento com o composto **3** a 10  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{M}$ . (B) Após 24 h de tratamento com o composto **6** a 3,5  $\mu\text{M}$  e 7  $\mu\text{M}$ . \*\*  $p < 0,01$ , segundo ANOVA seguido de pós-teste de Tukey.

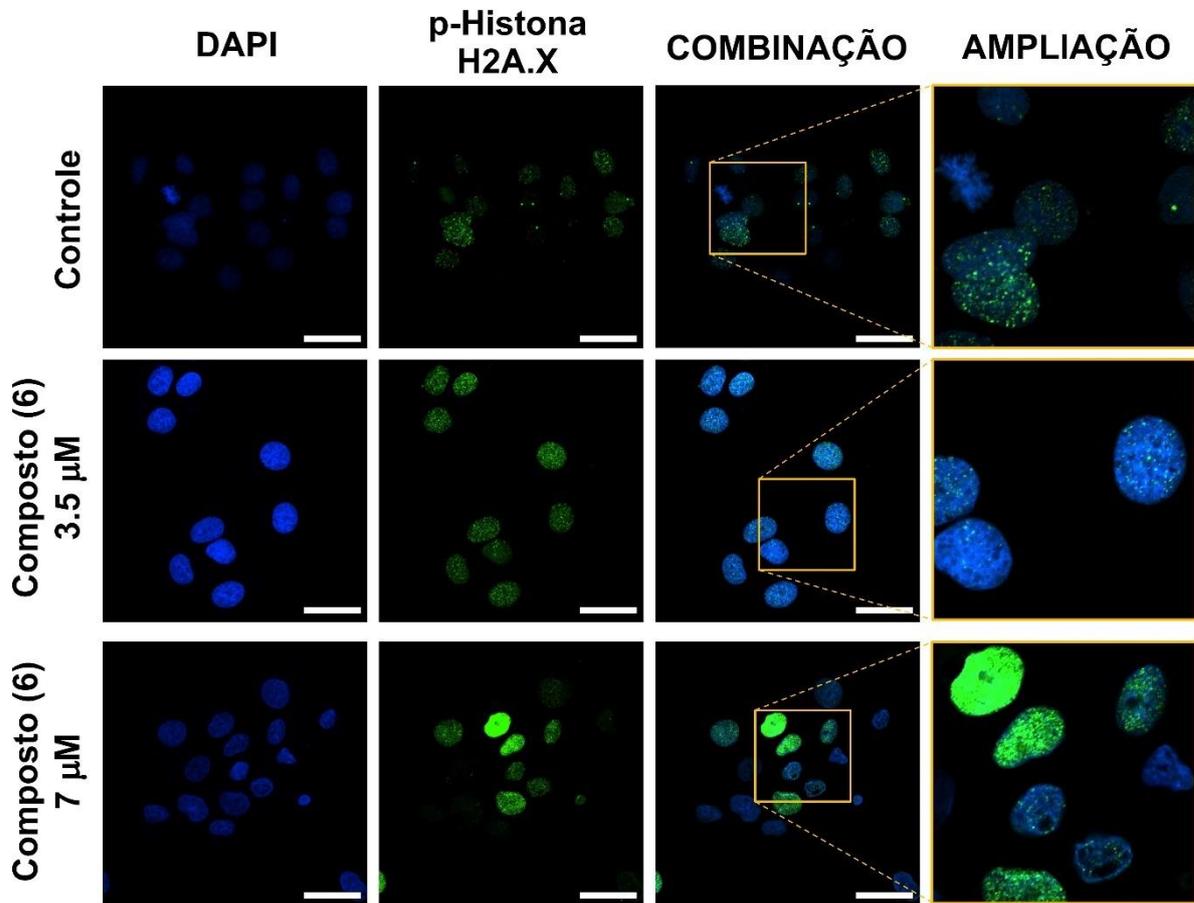
Figura 24 – Imagens expressão p-Histona H2A.X (composto 3)



Fonte: da autora (2024)

Nota: Imagens ilustrativas obtidas por microscopia de confocal de células MCF-7 após 24h de tratamento com o composto (3) a 10 µM e 20 µM; núcleo (azul) e p-Histona H2A.X (verde). Barra: 50 µm.

Figura 25 – Imagens expressão p-Histona H2A.X (composto 6)



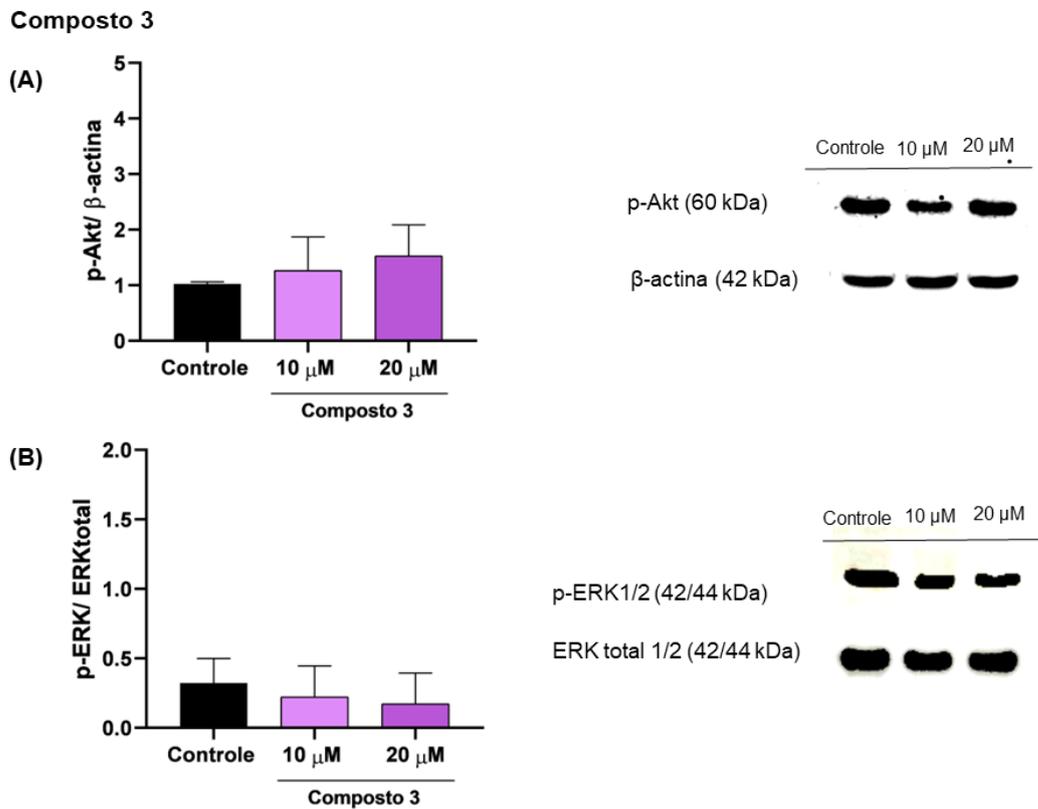
Fonte: da autora (2024)

Nota: Imagens ilustrativas obtidas por microscopia confocal de células MCF-7 após 24h de tratamento com o composto (6) a 3,5 µM e 7 µM; núcleo (azul) e p-Histona H2A.X (verde). Barra: 50 µm.

## 5.8 VIAS DE SINALIZAÇÃO ASSOCIADAS À PROLIFERAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA CELULAR

Por fim, foi avaliado o efeitos dos compostos **3** e **6** na modulação de vias associadas a proliferação, sobrevivência e crescimento celular. Dessa forma, as células MCF-7 foram tratadas com os compostos (**3**) a 10 µM e 20 µM composto (**6**) a 3,5 µM e 7,0 µM durante 48h e foi avaliada a expressão da forma fosforilada e ativa de proteínas relacionadas com estas vias: p-Akt e p-ERK. Nas condições avaliadas, o composto **3** não alterou significativamente a expressão destas proteínas (Figuras 26A e 26B). Por outro lado, o composto **6**, a 7 µM, causou um aumento significativo na expressão de p-Akt e p-ERK (Figuras 27A e 27B).

Figura 26 – Análise da expressão de proteínas alvo (composto 3)

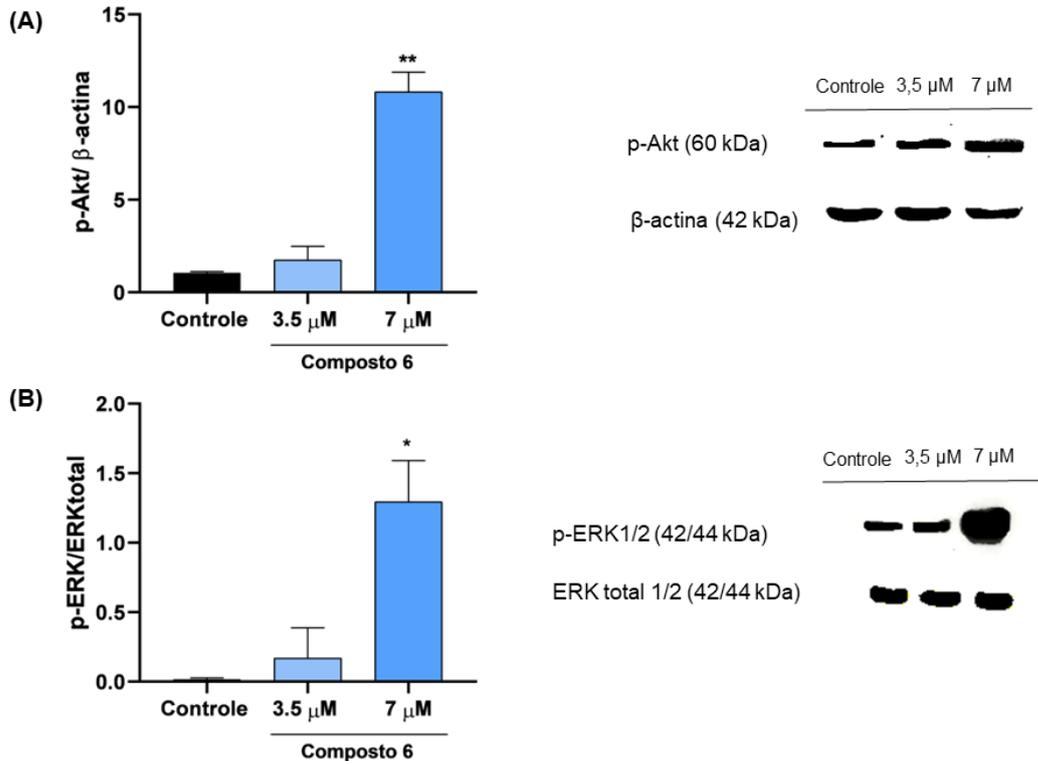


Fonte: da autora (2024)

Legenda: Análise da expressão de pAkt (A) e p-ERK (B) em células MCF-7 determinada por *Western Blotting* após 48h de tratamento com o composto 3 a 10 μM e 20 μM. β-actina utilizada como controle para determinação da expressão relativa de p-Akt e ERK foi utilizada como controle para a determinação da expressão relativa de p-ERK.

Figura 27 – Análise da expressão de proteínas alvo (composto 6)

Composto 6



Fonte: da autora (2024)

Legenda: Análise de expressão de pAkt (A) e p-ERK (B) em células MCF-7 determinada por *Western Blotting* após 48h de tratamento com o composto 6 a 3,5 μM e 7 μM. β-actina utilizada como controle para determinação da expressão relativa de p-Akt e ERK foi utilizada como controle para a determinação da expressão relativa de p-ERK. \* p<0,05, \*\* p<0,01, segundo ANOVA seguido de pós-teste de Tukey.

## 6 DISCUSSÃO

O interesse em estudar as substâncias goniotalamina (GTN) e piplartina (PPT) vêm crescendo ao longo dos anos, uma vez que estas apresentam uma ampla atividade biológica, incluindo propriedades anticâncer, como demonstrado pela sua citotoxicidade frente a diferentes linhagens de células tumorais. Desta forma, diversos estudos têm explorado a estrutura destas moléculas, a fim de desenvolver derivados mais potentes, mais seletivos, e com características físico-químicas e farmacológicas mais compatíveis com a aplicabilidade clínica (Bezerra *et al.*, 2013; Meirelles *et al.*, 2019; Seyed; Jantan; Bukhari, 2014; Zhu *et al.*, 2021). No presente estudo, derivados sulfonilados de GTN (composto **3**) e PPT (composto **6**) foram testados na linhagem celular MCF-7. Esta linhagem é derivada de câncer de mama e expressa receptores hormonais (estrógeno e progesterona), sendo representativa dos tumores classificados como luminal A (Comşa; Cimpean; Raica, 2015).

O compostos **3** e **6** foram cerca de 4 vezes mais citotóxicos para as células MCF-7 em relação à GNT e PPT, e foram cerca de 9 e 5 vezes, respectivamente, mais seletivos para as células tumorais em comparação com as células não tumorais. Dessa forma, as modificações estruturais realizadas na GTN e PPT foram importantes para aumentar a potência e seletividade em relação aos protótipos de origem. Considerando que o sucesso das terapias anticâncer depende da sua efetividade em erradicar as células tumorais sem afetar drasticamente a saúde do paciente (Lica *et al.*, 2021; López-Lázaro, 2015), o arcabouço estrutural dos compostos **3** e **6** podem ser úteis para o desenvolvimento de candidatos a fármacos para o tratamento contra o câncer de mama.

Os compostos **3** e **6** reduziram de forma significativa a viabilidade celular na linhagem MCF-7, com efeitos citostáticos e/ou citotóxicos também a longo prazo, uma vez inibiram completamente a capacidade destas células em formar colônias, mesmo após 11 dias de recuperação (sem o tratamento), demonstrando o potencial antiproliferativo destas substâncias. Os mecanismos responsáveis pela atividade antiproliferativa destas substâncias parecem envolver a indução de estresse oxidativo, que é resultado de um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a capacidade dos sistemas antioxidantes em neutralizá-las (Sies, 2020).

A geração de ROS faz parte do metabolismo normal da célula, entretanto, o acúmulo dessas moléculas pode modificar a estrutura de ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos, causando danos em diversos processos celulares (Forman; Zhang, 2021). O aumento da produção de ROS é uma das características das células tumorais e está associado aos processos de

carcinogênese, progressão tumoral, metástase e recidiva. As células tumorais dispõem de uma maior tolerância ao estresse oxidativo em relação às células normais, mas quando o excesso de geração de ROS ultrapassa o limiar da célula, o estresse oxidativo pode induzir a morte celular (Jelic *et al.*, 2021; Srinivas *et al.*, 2019).

A atividade citotóxica dos compostos **3** e **6** foi atenuada na presença de NAC, um potente antioxidante. Além disso, foi observado um aumento significativo de ROS nos grupos tratados. Estes resultados sugerem que um dos mecanismos de ação associado à atividade de ambos os compostos é a indução de estresse oxidativo. Considerando que estudos mostraram que a GTN e PPT, induzem estresse oxidativo e consequente morte celular em diferentes tipos tumorais, parece que as modificações estruturais realizadas para a obtenção dos derivados **3** e **6** preservaram as propriedades farmacológicas observadas nos protótipos originais.

Punganuru *et al.* (2018) demonstrou que a GTN diminui a formação de glutathiona reduzida (GSH), importante antioxidante, causando aumento de ROS. A indução de estresse oxidativo causou bloqueio do ciclo celular em G2/M, senescência celular e apoptose na linhagem celular de câncer de mama SK-BR-3. A PPT também é capaz de inibir sistemas antioxidantes, que normalmente estão hiperativados nas células cancerosas, pela interação com GSH, e as enzimas antioxidantes tioredoxina redutase 1 (TrxR1) e peroxirredoxina-4 (PRDX4). Essa atividade foi observada em células derivadas de glioma, carcinoma hepatocelular e os cânceres colorretal e gástrico (Kim *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019; Zou *et al.*, 2016).

Além disso, muitos fármacos usados na terapia do câncer induzem estresse oxidativo, incluindo doxorrubicina, gemcitabina, paclitaxel e vimblastina (Hayes; Dinkova-Kostova; Tew, 2020; Huang *et al.*, 2021; Yokoyama *et al.*, 2017). Os alvos específicos dos compostos **3** e **6** ainda precisam ser investigados, no entanto, os resultados obtidos neste estudo já sugerem a capacidade destas substâncias em alterar o equilíbrio oxidativo, resultando no acúmulo de ROS intracelular.

Um dos principais alvos das ROS é o DNA, causando danos à molécula que podem exceder a capacidade do sistema de reparo de DNA da célula (Freudenthal, 2017; Gonzalez-Hunt; Wadhwa; Sanders, 2018). Entre as consequências dos danos oxidativos ao DNA estão: alterações epigenéticas, mutações, alterações conformacionais e quebra da dupla-fita, causando modificações nos cromossomos, fuso mitótico e reguladores do ciclo celular. Estas modificações geram erros durante o processo de divisão celular, os quais podem culminar na formação de células com micronúcleos e células multinucleadas (Fenech *et al.*, 2011; Zhang; Pellman, 2022). Os ensaios de imunofluorescência mostraram aumento na frequência de células

com micronúcleo e células multinucleadas em resposta aos tratamentos com os compostos **3** e **6**, indicando que houve danos ao DNA e/ou alterações na mecânica do processo de divisão.

Estudos subsequentes mostraram que, de fato, os compostos **3** e **6** foram capazes de induzir danos ao DNA. Houve um aumento no número de células positivas para gama-H2AX (forma fosforilada da variante H2A) em células dos grupos tratados em relação aos grupos controles. A gama H2A.X (Ser139) é um biomarcador de danos ao DNA, considerando que a fosforilação na serina 139 é mediada pelas cinases ATM (*Ataxia-telangiectasia mutated kinase*), ATR (*ATM and Rad3 related kinase*) e DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*) em resposta à lesões no DNA. À medida que tal cascata de sinalização é iniciada, proteínas envolvidas no sistema de reparo de DNA e no bloqueio do ciclo celular são ativadas (Ferrand; Plessier; Polo, 2021; Sekiguchi; Matsushita, 2022; Stope, 2021). Eventos similares foram descritos na literatura em resposta ao tratamento com PPT e a GNT (Duarte *et al.*, 2023; Seyed; Jantan; Bukhari, 2014), de modo que o efeito genotóxico pode ser uma estratégia para levar a morte das células tumorais malignas.

A atividade antiproliferativa dos compostos **3** e **6**, possivelmente, está associada à danos oxidativos ao DNA, resultando em bloqueio da progressão do ciclo celular em células MCF-7. Foi observado o acúmulo de células nas fases G0/G1 e G2/M nos grupos tratados com o composto **3**, e G2/M nos grupos tratados com o composto **6**. Além disso, o composto **6** causou desorganização dos microtúbulos e microfilamentos quando usado em concentração correspondente ao IC<sub>50</sub>. Um estudo realizado por Meegan *et al.* (2017) em células MCF-7 mostrou que a atividade antitumoral da PPT está associada com indução de estresse oxidativo, bloqueio do ciclo celular e com a sua capacidade em desestabilizar a rede de microtúbulos.

Os compostos **3** e **6** reduziram a expressão de reguladores positivos do ciclo celular (ciclina B e D e MYC), o que reforça o potencial antitumoral dessas substâncias. As ciclina D e B são determinantes para progressão do ciclo celular e estão comumente super expressas no câncer de mama, contribuindo com os processos de carcinogênese e progressão tumoral (Lu *et al.*, 2020; Massacci; Perfetto; Sacco, 2023; Sun *et al.*, 2017b; Sofi *et al.*, 2022). MYC é um fator de transcrição que regula a expressão de genes essenciais à progressão do ciclo celular e sobrevivência, incluindo ciclina D e BCL-2 (Guo *et al.*, 2020; Matthews; Bertoli; De Bruin, 2022). Vale ressaltar que o oncogene MYC está super ativo em 20% dos casos de câncer de mama e tem sido associado com vários processos, incluindo proliferação, sobrevivência celular, invasão e angiogênese (Duffy *et al.*, 2021; Gao *et al.*, 2023; Nik-Zainal *et al.*, 2016).

A linhagem MCF-7 é selvagem para o gene TP53 (p53) e o bloqueio do ciclo celular e indução de apoptose são eventos mediados por p53 em resposta a lesões no DNA (Dastjerdi *et*

*al.*, 2016; Hafner *et al.*, 2019; Karimian; Ahmadi; Yousefi, 2016). p53 é o principal regulador transcricional de *CDKN1A* (p21), um regulador negativo do ciclo celular devido à sua capacidade de inibir complexos ciclina-CDK (Engeland, 2022). A expressão diminuída de p21 é comumente observada em vários tipos tumorais, e compreender o seu papel na célula tumoral é crítico para avaliar seu potencial como alvo terapêutico de fármacos que interferem na sua síntese e estabilidade (Shamloo; Usluer, 2019).

Agentes com atividade antitumoral podem causar o aumento da expressão de p21 em decorrência de eventos epigenéticos que culminam na desrepressão transcricional de *CDKN1A* (Chatterjee *et al.*, 2022; Chatterjee; Ghosh; Kanade, 2019). No presente estudo, a expressão relativa de *CDKN1A* foi significativamente aumentada nos grupos tratados com os compostos **3** e **6**. O envolvimento de p53 e/ou eventos epigenéticos na indução de expressão de *CDKN1A* em resposta aos tratamentos com estes compostos precisam ser futuramente demonstrados. Contudo, estudos mostram que MYC inibe a expressão de *CDKN1A* (Bretones; Delgado; León, 2015).

A expressão de p21 aumentada nos grupos tratados, provavelmente foi consequência de danos ao DNA. A resposta à danos ao DNA (DDR) promove bloqueio no ciclo celular até que estes danos sejam reparados. Entretanto, se estes danos forem muito extensos e irreparáveis e a DDR permanecer ativa por tempo prolongado, a célula pode apresentar dois mecanismos de resposta: indução de senescência ou morte celular programada (Shmulevich; Krizhanovsky, 2021; Zarneshan *et al.*, 2023). A senescência celular é um estado de interrupção estável e terminal do ciclo celular, o qual pode ser causado por diversos fatores como danos ao DNA, estresse oxidativo, ativação de oncogenes e encurtamento do telômero. O composto **3** induziu senescência nas células MCF-7, o que foi observado pelo aumento da atividade da enzima  $\beta$ -Galactosidase nos grupos tratados e outras alterações que são comuns às células senescentes, como modificações morfológicas (células se tornaram maiores e achatadas) e aumento na expressão de *CDKN1A*.

As células senescentes apresentam um perfil secretório, que pode ser variável, chamado de fenótipo secretor associado à senescência (SASP). Este fenótipo é complexo e pode ser um aliado na terapia antitumoral, induzindo senescência nas células vizinhas por sinalização parácrina e recrutando o sistema imune para eliminar estas células. Por outro lado, pode conter fatores de crescimento e fatores pró-inflamatórios, os quais podem favorecer a progressão tumoral. Nesse sentido, é importante o desenvolvimento de novos compostos capazes de induzir senescência, cujo SASP possa contribuir para efetiva supressão tumoral (Di Micco *et al.*, 2021; Kudlova; De Sanctis; Hajdich, 2022; Kumari; Jat, 2021; Schmitt; Wang; Demaria, 2022).

Neste estudo, a indução de senescência em células MCF-7 em resposta ao tratamento com o composto **3** foi demonstrada pelo aumento da atividade lisossomal (enzima  $\beta$ -Galactosidase), no entanto, seria interessante investigar os componentes do SASP a fim de estimar quais são as implicações das células senescentes no microambiente tumoral.

Como discutido anteriormente, o acúmulo de ROS e, conseqüentemente, danos extensos ao DNA que excedem a capacidade de reparo celular, também podem direcionar a célula cancerosa a outro destino além da senescência celular, a morte celular por apoptose. A proteína p53, além de ativar a expressão da p21, também promove o aumento de proteínas pró-apoptóticas. Além disso, p53 pode interagir com proteínas antiapoptóticas, inibindo sua atividade. Dessa forma, diferentes mecanismos são ativados para induzir apoptose como um mecanismo de proteção em resposta aos danos irreparáveis ao DNA (Abuetabh *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2023).

A capacidade de induzir apoptose representa uma propriedade importante dos agentes utilizados na terapia do câncer (Carneiro; El-Deiry, 2020). O composto **6** (na concentração correspondente ao IC<sub>50</sub>) induziu apoptose em células MCF-7, como demonstrado pelo aumento na frequência de células positivas para anexina V, bem como pela modulação de genes reguladores da apoptose intrínseca. Houve aumento na quantidade de RNAm de *BAX* e diminuição da abundância de RNAm de *BCL2*. A ativação da via intrínseca de apoptose envolve vários membros da família Bcl-2, incluindo aumento dos níveis de BAX (um fator pró-apoptótico efetor) em detrimento de seus bloqueadores (*BCL2*, por exemplo) favorece a indução de apoptose (Kiraz *et al.*, 2016).

O estresse oxidativo, além de causar modificações ao DNA e induzir apoptose pela via intrínseca, pode levar a ativação de receptores de morte transmembrana, como Fas e TNF-R, e induzir apoptose pela via extrínseca. O acúmulo de ROS também pode desencadear a apoptose por outras formas, como pelo aumento direto da permeabilidade mitocondrial, estresse do retículo endoplasmático e ativação persistente de algumas vias oncogênicas de sinalização, como a MAPK/ERK. A hiperativação desta via normalmente está correlacionada à progressão tumoral, inibição de apoptose, indução de transição epitélio-mesenquimal, angiogênese e invasão (Braicu *et al.*, 2019; Lee; Rauch; Kolch, 2020).

Entretanto, estudos têm demonstrado que a ativação sustentada de ERK, que ultrapassa um determinado limiar, pode ativar vias pró-apoptóticas. O acúmulo de ROS inibe a atividade das fosfatases DUSPs (*dual-specificity phosphatases*), evento que promove a hiperativação de ERK por fosforilação, a qual pode atuar no citoplasma ou núcleo, ativando fatores como p53 e resultando no aumento e diminuição de reguladores pró-apoptóticos e antiapoptóticos,

respectivamente (Redza-Dutordoir; Averill-Bates, 2016; Sugiura; Satoh; Takasaki, 2021; Yue; López, 2020).

O composto **6** induziu a ativação desta via, uma vez que houve aumento significativo na expressão de p-ERK. Diante disso, é possível que a hiperativação da via MAPK/ERK esteja envolvida no potencial pró-apoptótico deste composto. Uma série de quimioterápicos já estabelecidos, como cisplatina e doxorrubicina, induzem a ativação de ERK (Thongnuanjan *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2016a). Além disso, um estudo realizado por Oliveira *et al.* (2019) na linhagem celular de leucemia HL-60, demonstrou que um complexo contendo derivados de PPT causa estresse oxidativo e consequente ativação da via ERK/p38 e indução de apoptose, ou seja, um mecanismo semelhante ao que foi observado neste trabalho.

O composto **6** também foi capaz de ativar a via PI3K/Akt, como demonstrado pelo aumento de Akt fosforilada. Esse efeito pode estar associado ao acúmulo de ROS. A ligação de fatores de crescimento em receptores tirosina-quinase específicos, resulta na ativação da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e consequente ativação da proteína quinase B (Akt). A p-Akt é responsável por ativar ou inibir inúmeras moléculas envolvidas nos processos de crescimento, proliferação e sobrevivência celular. Dessa forma, a hiperativação desta via favorece a progressão tumoral (He *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2020b; Zhang *et al.*, 2016b). Entretanto, o aumento da expressão de p-Akt pelo composto **6** não interferiu na sua atividade antiproliferativa e pró-apoptótica observada na linhagem MCF-7. De modo que, o aumento de p-Akt mediado pelo composto **6** merece futuras investigações.

Diante dos dados obtidos neste estudo, estes compostos mostram-se promissores e são mais potentes e seletivos em relação aos protótipos de origem, contudo, parecem atuar pelos mesmos mecanismos de ação, de modo que as propriedades farmacológicas da GNT e PPT foram preservadas em seus derivados sulfonilados. Assim sendo, os protótipos avaliados apresentam potencial antitumoral e novas abordagens experimentais devem ser realizadas para explorar em detalhes os alvos moleculares dessas substâncias. É crucial validar os efeitos antitumorais *in vivo*, expandir o estudo *in vitro* para outros subtipos de câncer de mama, especialmente o triplo negativo, cujo arsenal terapêutico é restrito e pouco efetivo. Além disso, é necessário avaliar os perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos dos derivados para avançar nas etapas inerentes ao processo de desenvolvimento de fármacos.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que os derivados sulfonilados de GTN e PPT têm efeitos citotóxicos significativos em células de câncer de mama e são mais potentes e seletivos em relação aos protótipos de origem. Os compostos **3** e **6** aumentam os níveis de espécies reativas de oxigênio na linhagem MCF-7, causando danos ao DNA e modulação da expressão de proteínas associadas à regulação do ciclo celular e apoptose. O composto **3** induziu senescência, enquanto o composto **6** apresentou atividade pró-apoptótica, que possivelmente está associada à resposta de danos ao DNA e ativação sustentada da via MAPK/ERK. Portanto, esses compostos representam protótipos promissores para o desenvolvimento de candidatos à fármacos antineoplásicos e devem ser considerados em futuras investigações.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAFIZ, H. Epigenetic mechanisms of tamoxifen resistance in luminal breast cancer. **Diseases**, v. 5, n. 3, p. 16, July 2017.
- ABU BAKAR, S. A. *et al.* Goniiothalamine inhibits cell growth, perturbs cell cycle and induces apoptosis in human osteosarcoma saos-2 cells. **JUMMEC**, special issue 1, 2023.
- ABUETABH, Y. *et al.* DNA damage response revisited: the p53 family and its regulators provide endless cancer therapy opportunities. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 54, n. 10, p. 1658–1669, Oct. 2022.
- AGOSTINETTO, E.; GLIGOROV, J.; PICCART, M. Systemic therapy for early-stage breast cancer: learning from the past to build the future. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 19, n. 12, p. 763–774, Dec. 2022.
- ANSARI, K. K.; JHA, A. Causes of Cancer in the World: Comparative Risk Assessment of Nine Behavioral and Environmental Risk Factors. **Cureus**, 7 set. 2022.
- BAGLIA, M. L. *et al.* Alcohol, smoking, and risk of her2-overexpressing and triple negative breast cancer relative to estrogen receptor-positive breast cancer. **International Journal of Cancer**, v. 143, n. 8, p.1849-1857, July 2018.
- BARNUM, K. J.; O'CONNELL, M. J. Cell cycle regulation by checkpoints. *In*: NOGUCHI, E.; GADALETA, M. C. (ed.). **Cell cycle control**. Methods in Molecular Biology. New York: Springer New York, 2014.
- BEZERRA, D.P. *et al.* Overview of the therapeutic potential of piperlongumine (piperlongumine). **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 3, p. 453-463, Feb. 2013.
- BEZERRA, D.P. *et al.* Piperlongumine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. **Toxicology In Vitro**, v. 21, n. 1, p. 1-8, Feb. 2007.
- BLUM, J. L. *et al.* Anthracyclines in early breast cancer: the ABC Trials-USOR 06-090, NSABP B-46-I/USOR 07132, and NSABP B-49 (NRG Oncology). **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, p. 2647–2655, Aug. 2017.
- BRAICU, C. *et al.* A comprehensive review on MAPK: a promising therapeutic target in cancer. **Cancers**, v. 11, n. 10, p. 1618, Oct. 2019.
- BRETONES, G.; DELGADO, M. D.; LEÓN, J. Myc and cell cycle control. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1849, n. 5, p. 506–516, May 2015.
- BURGUIN, A.; DIORIO, C.; DUROCHER, F. Breast cancer treatments: updates and new challenges. **Journal of Personalized Medicine**, v. 11, n. 8, p. 808, Aug. 2021.
- BUSUND, M. *et al.* Progestin-only and combined oral contraceptives and receptor-defined premenopausal breast cancer risk: the Norwegian women and cancer study. **International Journal of Cancer**, v. 142, p. 2293–2302, June 2018.

CARDOSO, F. *et al.* 4th ESO–ESMO international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC 4)†. **Annals of Oncology**, v. 29, p. 1634–1657, Aug. 2018.

CARNEIRO, B. A.; EL-DEIRY, W. S. Targeting apoptosis in cancer therapy. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 17, n. 7, p. 395–417, July 2020.

CHAO, H. X. *et al.* Orchestration of DNA Damage Checkpoint dynamics across the human cell cycle. **Cell Systems**, v. 5, n. 5, p. 445–459.e5, Nov. 2017.

CHATTERJEE, B. *et al.* The phytochemical brazilin suppress DNMT1 expression by recruiting p53 to its promoter resulting in the epigenetic restoration of p21 in MCF7 cells. **Phytomedicine**, v. 95, p. 153885, Jan. 2022.

CHATTERJEE, B.; GHOSH, K.; KANADE, S. R. Resveratrol modulates epigenetic regulators of promoter histone methylation and acetylation that restores BRCA1, p53, p21<sup>CIP1</sup> in human breast cancer cell lines. **BioFactors**, v. 45, n. 5, p. 818–829, Sept. 2019.

CHENG, X. *et al.* Piplartine attenuates the proliferation of hepatocellular carcinoma cells via regulating hsa\_circ\_100338 expression. **Cancer Medicine**, v. 9, n.12, p. 4265–4273, June 2020.

CHOI, D. G.; VENKATESAN, J.; SHIM, M. S. Selective anticancer therapy using pro-oxidant drug-loaded chitosan–fucoidan nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 13, p. 3220, June 2019.

COLDITZ, G. A.; SELLERS, T. A.; TRAPIDO, E. Epidemiology — identifying the causes and preventability of cancer? **Nature Reviews Cancer**, v. 6, p. 75–83, Jan. 2006.

COMŞA, Ş.; CIMPEAN, A. M.; RAICA, M. The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research. **Anticancer Research**, v. 35, n. 6, p. 3147–3154, 2015.

CRAGG, G. M. *et al.* The taxol supply crisis. New NCI policies for handling the large-scale production of novel natural product anticancer and anti-HIV agents. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 10, p. 1657–1668, Oct. 1993.

DAI, X. *et al.* Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. **American Journal of Cancer Research**, v. 5, n. 10, p. 2929–2943, Sept. 2015.

DASTJERDI, M. N. *et al.* Adenosine A1 receptor modifies P53 expression and apoptosis in breast cancer cell line MCF-7. **Bratislava Medical Journal**, v. 116, n. 04, p. 242–246, 2016.

DI MICCO, R. *et al.* Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 22, n. 2, p. 75–95, Feb. 2021.

DRAGANESCU, M.; CARMOCAN, C. Hormone therapy and breast cancer. **Chirurgia**, v. 112, n. 4, p. 413–417, 2017.

DUFFY, M. J. *et al.* MYC as a target for cancer treatment. **Cancer Treatment Reviews**, v. 94, p. 102154, Mar. 2021.

ENGELAND, K. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. **Cell Death & Differentiation**, v. 29, n. 5, p. 946–960, May 2022.

ESBAH, O.; OKSUZOGLU, B. Prognostic & predictive factors for planning adjuvant chemotherapy of early-stage breast cancer. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 146, n. 5, p. 563–571, Nov. 2017.

FENECH, M. *et al.* Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 125–132, Jan. 2011.

FERRAND, J.; PLESSIER, A.; POLO, S. E. Control of the chromatin response to DNA damage: histone proteins pull the strings. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 113, p. 75–87, May 2021.

FORMAN, H. J.; ZHANG, H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 9, p. 689–709, Sept. 2021.

FOUNTZILAS, E. *et al.* Pathology of BRCA1- and BRCA2-associated breast cancers: known and less known connections. **Clinical Breast Cancer**, v. 20, n. 2, p. 152–159, 2020.

FRANKEN, N. A. P. *et al.* Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, Dec. 2006.

FREUDENTHAL, B. D. Base excision repair of oxidative DNA damage from mechanism to disease. **Frontiers in Bioscience**, v. 22, n. 9, p. 1493–1522, 2017.

GAO, F. *et al.* c-MYC mediates the crosstalk between breast cancer cells and tumor microenvironment. **Cell Communication and Signaling**, v. 21, n. 1, p. 28, Jan. 2023.

GIANNI, L. *et al.* 5-Year analysis of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in patients with locally advanced, inflammatory, or early-stage HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a multicentre, open-label, phase 2 randomised trial. **Lancet Oncology**, v. 17, p. 791–800, June 2016.

GONZALEZ-HUNT, C. P.; WADHWA, M.; SANDERS, L. H. DNA damage by oxidative stress: Measurement strategies for two genomes. **Current Opinion in Toxicology**, v. 7, p. 87–94, Feb. 2018.

GUO, M. *et al.* Epigenetic heterogeneity in cancer. **Biomarker Research**, v. 7, n. 1, p. 23, 23 Dec. 2019.

GUO, Y.J. *et al.* ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v.19, n. 3, p.1997-2007, Mar. 2020.

HAFNER, A. *et al.* The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 4, p. 199–210, Apr. 2019.

- HANAHAN, D. Hallmarks of cancer: new dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, Jan. 2022.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, Jan. 2000.
- HARBECK, N. *et al.* Breast cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, n. 1, p. 66, Sept. 2019.
- HARBECK, N.; GNANT, M. Breast cancer. **Lancet**, v. 389, n. 10074, p. 1134–1150, Mar. 2017.
- HAYES, J. D.; DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; TEW, K. D. Oxidative stress in cancer. **Cancer Cell**, v. 38, n. 2, p. 167–197, Aug. 2020.
- HE, Y. *et al.* Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, p. 425, Dec. 2021.
- HOLEN, I. *et al.* In vivo models in breast cancer research: progress, challenges and future directions. **Disease Models & Mechanisms**, v. 10, p. 359–371, 2017.
- HUANG, R. *et al.* Dual role of reactive oxygen species and their application in cancer therapy. **Journal of Cancer**, v. 12, n. 18, p. 5543–5561, 2021.
- JELIC, M. *et al.* Oxidative stress and its role in cancer. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 17, n. 1, p. 22, 2021.
- KALIMUTHO, M. *et al.* Targeted therapies for triple-negative breast cancer: combating a stubborn disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n. 12, p. 822–846, Dec. 2015.
- KARIMIAN, A.; AHMADI, Y.; YOUSEFI, B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. **DNA Repair**, v. 42, p. 63–71, June 2016.
- KENNECKE, H. *et al.* Metastatic behavior of breast cancer subtypes. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 20, p. 3271–3277, July. 2010.
- KHAW-ON, P.; POMPIMON, W.; BANJERDPONGCHAI, R. Goniiothalamine induces necroptosis and anoikis in human invasive breast cancer MDA-MB-231 cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 16, p. 3953, Aug. 2019.
- KIM, T. H. *et al.* Piperlongumine treatment inactivates peroxiredoxin 4, exacerbates endoplasmic reticulum stress, and preferentially kills high-grade glioma cells. **Neuro-Oncology**, v. 16, n. 10, p. 1354–1364, Oct. 2014.
- KIRAZ, Y. *et al.* Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. **Tumor Biology**, v. 37, n. 7, p. 8471–8486, July 2016.

KUDLOVA, N.; DE SANCTIS, J. B.; HAJDUCH, M. Cellular senescence: molecular targets, biomarkers, and senolytic drugs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 8, p. 4168, Apr. 2022.

KUMARI, R.; JAT, P. Mechanisms of cellular senescence: cell cycle arrest and senescence associated secretory phenotype. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 645593, Mar. 2021.

KUCHENBAECKER, K. B. *et al.* Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. **JAMA**, v. 317, n.23, p. 2402–2416, June. 2017.

LAMBERT, A.W; PATTABIRAMAN, D. R.; WEINBERG, R. A. Emerging biological principles of metastasis. **Cell**, v. 168, n.4, p.670-691, Feb. 2017.

LEE, S.; RAUCH, J.; KOLCH, W. Targeting MAPK signaling in cancer: mechanisms of drug resistance and sensitivity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, p. 1102, Feb. 2020.

LI, Y. *et al.* Targeted therapeutic strategies for triple-negative breast cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 11, p. 731535, Oct. 2021.

LICA, J. J. *et al.* Effective drug concentration and selectivity depends on fraction of primitive cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4931, May. 2021.

LIU, K. *et al.* The role of CDC25C in cell cycle regulation and clinical cancer therapy: a systematic review. **Cancer Cell International**, v. 20, n. 1, p. 213, Dec. 2020a.

LIU, R. *et al.* PI3K/AKT pathway as a key link modulates the multidrug resistance of cancers. **Cell Death & Disease**, v. 11, n. 9, p. 797, Sept. 2020b.

LIVER TOX: clinical and research information on drug-induced liver injury [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2012-. Taxanes. [Updated 2020 Sep 7]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548797>. Acesso em: 19 dez. 2022.

LÓPEZ-LÁZARO, M. How many times should we screen a chemical library to discover an anticancer drug? **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 2, p. 167–169, Feb. 2015.

LU, Y. *et al.* Upregulated cyclins may be novel genes for triple-negative breast cancer based on bioinformatic analysis. **Breast Cancer**, v. 27, n. 5, p. 903–911, Sept. 2020.

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**, v. 10, n. 1, p. 21-30, Mar. 2016.

MACKEY, J. R. *et al.* Long-term outcomes after adjuvant treatment of sequential versus combination docetaxel with doxorubicin and cyclophosphamide in nodepositive breast cancer: BCIRG-005 randomized trial. **Annals of Oncology**, v. 27, p. 1041–1047, June 2016.

MASSACCI, G.; PERFETTO, L.; SACCO, F. The cyclin-dependent kinase 1: more than a cell cycle regulator. **British Journal of Cancer**, v. 129, n. 11, p. 1707–1716, Nov. 2023.

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

MARTÍNEZ-ALONSO, D.; MALUMBRES, M. Mammalian cell cycle cyclins. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 107, p. 28-35, Nov. 2020.

MEEGAN, M.J. *et al.* Piperlongumine (piplartine) and analogues: antiproliferative microtubule-destabilising agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.125, p. 453-463, 2017.

MEIRELLES, M. *et al.* A synthesis of nitrogen-containing goniothalamin analogues with higher cytotoxic activity and selectivity against cancer cells. **ChemMedChem**, v. 14, n.15, p.1403-1417, Aug. 2019.

MILLETTI, G.; COLICCHIA, V.; CECCONI, F. Cyclers' kinases in cell division: from molecules to cancer therapy. **Cell Death & Differentiation**, v. 30, n. 9, p. 2035–2052, Sept. 2023.

MØRCH, L. S. *et al.* Contemporary hormonal contraception and the risk of breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 377, p. 2228–2239, Mar. 2018.

MORGAN, D. O. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 13, p. 261-291, 1997.

NEWMAN, D. J, CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p.770-803, 2020.

NIK-ZAINAL, S. *et al.* Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. **Nature**, 534, 47–54, June 2016.

NÚÑEZ ABAD, M. *et al.* Update on systemic treatment in early triple negative breast cancer. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 13, p. 175883592098674, Jan. 2021.

NURSE, P. A long twentieth century of the cell cycle and beyond. **Cell**, v. 100, p.71-78, Jan. 2000.

OLIVEIRA, M. D. S. *et al.* A novel platinum complex containing a piplartine derivative exhibits enhanced cytotoxicity, causes oxidative stress and triggers apoptotic cell death by ERK/p38 pathway in human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells. **Redox Biology**, v. 20, p. 182–194, Jan. 2019.

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

PAN, C. *et al.* Research progress of claudin-low breast cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 13, p. 1226118, Oct. 2023.

PARAMA, D. *et al.* The promising potential of piperlongumine as an emerging therapeutics for cancer. **Exploration of Targeted Anti-tumor Therapy**, Aug. 2021.

PARKER, J. S. *et al.* Supervise drisk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 8, p. 1160 – 1167, Mar. 2009.

PEROU, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v.406, n. 6797, p. 747–752, Aug. 2000.

PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 45e–445, May 2001.

PILLI, R. A. *et al.* Goniothalamine-related styryl lactones: isolation, synthesis, biological activity and mode of action. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 41, p. 7372-7451, 2019.

PISKA, K. *et al.* Piperlongumine (piplartine) as a lead compound for anticancer agents – synthesis and properties of analogues: a mini-review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 156, p. 13-20, Aug. 2018.

PRAT, A. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 12, R68, 2010.

PRAT, A.; PEROU, C. M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. **Molecular Oncology**, v. 5, n. 1, p. 5-23, Feb. 2011.

PUNGANURU, S. R. *et al.* Selective killing of human breast cancer cells by the styryl lactone (R)-goniothalamine is mediated by glutathione conjugation, induction of oxidative stress and marked reactivation of the R175H mutant p53 protein. **Carcinogenesis**, July 2018.

RAKHA, E.; REIS-FILHO, J.; ELLIS, I. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 120, n.2, p. 293– 308, Apr. 2010.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J. M.; DEPREZ, R. H.; MOORMAN, A. F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neurosci Lett**. v. 339, n. 1, p. 62-6, Mar. 2003.

REDZA-DUTORDOIR, M.; AVERILL-BATES, D. A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 12, p. 2977–2992, Dec. 2016.

RUSSNES, H. G. *et al.* Breast cancer molecular stratification: from intrinsic subtypes to integrative clusters. **The American Journal of Pathology**, v. 187, n. 10, p.2152–2162, Oct. 2017.

SANTOS, M. D. O. *et al.* Estimativa de incidência de câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, n. 1, fev. 2023.

SARKAR, S. *et al.* Cancer development, progression, and therapy: an epigenetic overview. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 10, p. 21087–21113, Oct. 2013.

SCHMITT, C. A.; WANG, B.; DEMARIA, M. Senescence and cancer — role and therapeutic opportunities. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 19, n. 10, p. 619–636, Oct. 2022.

SEMPREBON, S. C. *et al.* Antiproliferative activity of goniothalamine enantiomers involves DNA damage, cell cycle arrest and apoptosis induction in MCF-7 and HB4a cells. **Toxicology in Vitro**, v. 30, n. 1, p. 250–263, Dec. 2015.

SEKIGUCHI, M.; MATSUSHITA, N. DNA damage response regulation by histone ubiquitination. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 15, p. 8187, July 2022.

SEYED, M. A.; JANTAN, I.; BUKHARI, S. N. Emerging anticancer potentials of goniothalamine and its molecular mechanisms. **BioMed Research International**, 2014.

SHAMLOO, B.; USLUER, S. p21 in cancer research. **Cancers**, v. 11, n. 8, p. 1178, Aug. 2019.

SHIOVITZ, S.; KORDE, L. A. Genetics of breast cancer: a topic in evolution. **Annals of Oncology**, v.26, p. 1291–1299, July 2015.

SHMULEVICH, R.; KRIZHANOVSKY, V. Cell senescence, DNA damage, and metabolism. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 34, n. 4, p. 324–334, Feb. 2021.

SIES, H. Oxidative stress: concept and some practical aspects. **Antioxidants**, v. 9, n. 9, p. 852, Sept. 2020.

SOFI, S. *et al.* Cyclin-dependent kinases in breast cancer: expression pattern and therapeutic implications. **Medical Oncology**, v. 39, n. 6, p. 106, Apr. 2022.

SOPHONNITHIPRASERT, T. *et al.* Interaction between goniothalamine and peroxisomal multifunctional enzyme type 2 triggering endoplasmic reticulum stress. **Heliyon**, v. 6, n. 10, p. e05200, Oct. 2020.

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**, v. 98, n. 19, p. 10869–10874, 2001.

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

SRINIVAS, U. S. *et al.* ROS and the DNA damage response in cancer. **Redox Biology**, v. 25, p. 101084, July 2019.

STOPE, M. Phosphorylation of histone H2A.X as a DNA-associated biomarker (review). **World Academy of Sciences Journal**, v. 3, n. 3, p. 31, Apr. 2021.

SUGIURA, R.; SATOH, R.; TAKASAKI, T. ERK: A double-edged sword in cancer. ERK-dependent apoptosis as a potential therapeutic strategy for cancer. **Cells**, v. 10, n. 10, p. 2509, Sept. 2021.

SUN, X. *et al.* Prognostic and clinicopathological significance of cyclin B expression in patients with breast cancer: A meta-analysis. **Medicine**, v. 96, n. 19, p. e6860, May 2017b.

SUN, Y.S. *et al.* Risk factors and preventions of breast cancer. **International Journal of Biological Sciences**, v.13, n.11, p. 1387-1397, Nov. 2017a.

TANGCHIRAKHAPHAN, S. *et al.* Mechanism of apoptosis induction associated with ERK1/2 upregulation via goniiothalamine in melanoma cells. **Exp Ther Med**, v. 15, n. 3, p. 3052-3058, Mar. 2018.

THONGNUANJAN, P. *et al.* Protective effect of panduratin A on cisplatin-induced apoptosis of human renal proximal tubular cells and acute kidney injury in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 44, n. 6, p. 830–837, June 2021.

THONGSOM, S. *et al.* Piperlongumine induces G2/M phase arrest and apoptosis in cholangio carcinoma cells through the ROS-JNK-ERK signaling pathway. **Apoptosis**, v. 22, n. 11, p. 1473-1484, Nov. 2017.

TRIBBY, A. L. *et al.* Pd-catalyzed conversion of aryl iodides to sulfonyl fluorides using SO<sub>2</sub> surrogate DABSO and selectfluor. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 82, n. 4, p. 2294–2299, Feb. 2017.

TUTT, A. Carboplatin in BRCA1/2-mutated and triple-negative breast cancer BRCAness subgroups: the TNT trial. **Nature Medicine**, v. 24, n. 5, p. 628 – 637, May. 2018.

VENDRAMINI-COSTA, D.B. *et al.* Effect of goniiothalamine on the development of Ehrlich solid tumor in mice. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 18, p. 6742-6747, Sept. 2010.

VICHAJ, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1112–1116, 2006.

VISCONTI, R.; DELLA MONICA, R.; GRIECO, D. Cell cycle checkpoint in cancer: a therapeutically targetable double-edged sword. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 35, n. 1, p. 153, Dec. 2016.

WAKS, A. G; WINER, E. P. Breast cancer treatment: a review. **JAMA**, v.321, n. 3, p. 288-300, Jan. 2019.

WANG, F. *et al.* Piperlongumine induces apoptosis and autophagy in human lung cancer cells through inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 28, n. 3, p. 362-373, Sept. 2015.

WANG, H. *et al.* Piperlongumine increases sensitivity of colorectal cancer cells to radiation: Involvement of ROS production via dual inhibition of glutathione and thioredoxin systems. **Cancer Letters**, v. 450, p. 42–52, May 2019.

WEAVER, B.A. How taxol/paclitaxel kills cancer cells. **Molecular biology of the cell**, v. 25, n.18, p. 2677-2681, Sept. 2014.

WEIGEL, M. T.; DOWSETT, M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. **Endocrine-Related Cancer**, v. 17, n. 14, p. 245–262, Sept. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Câncer**. [S. l]: WHO, Feb. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 24 jul. 2023.

XIONG, X. X, *et al.* Piperlongumine induces apoptotic and autophagic death of the primary myeloid leukemia cells from patients via activation of ROS-p38/JNK pathways. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 36, n. 3, p. 362-374, Mar. 2015.

YOKOYAMA, C. *et al.* Induction of oxidative stress by anticancer drugs in the presence and absence of cells. **Oncology Letters**, Sept. 2017.

YUAN, M. *et al.* Targeting strategies for enhancing paclitaxel specificity in chemotherapy. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 626910, Mar. 2021.

YUE, J.; LÓPEZ, J. M. Understanding MAPK signaling pathways in apoptosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 7, p. 2346, Mar. 2020.

ZARNESHAN, S. N. *et al.* Exploiting pivotal mechanisms behind the senescence-like cell cycle arrest in cancer. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v. 135, p. 1–19, 2023.

ZHANG, C. Z.; PELLMAN, D. Cancer genomic rearrangements and copy number alterations from errors in cell division. **Annual Review of Cancer Biology**, v. 6, n. 1, p. 245–268, Apr. 2022.

ZHANG, D. X. *et al.* ERK1/2/p53 and NF- $\kappa$ B dependent-PUMA activation involves in doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 20, n. 11, p. 2435–2442, June 2016a.

ZHANG, J. *et al.* ROS and ROS-mediated cellular signaling. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1–18, 2016b.

ZHANG, Q. *et al.* Piperlongumine, a novel TrxR1 inhibitor, induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells by ROS-mediated ER stress. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 1180, Oct. 2019.

ZHAO, Y. *et al.* Cancer metabolism: the role of ROS in DNA damage and induction of apoptosis in cancer cells. **Metabolites**, v. 13, n. 7, p. 796, June 2023.

ZHU, P. *et al.* Overview of piperlongumine analogues and their therapeutic potential. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 220, p. 113471, Aug. 2021.

ZOU, P. *et al.* Piperlongumine as a direct TrxR1 inhibitor with suppressive activity against gastric cancer. **Cancer Letters**, v. 375, n. 1, p. 114–126, May 2016.