

Giulia Rodrigues Stringhetta

Avaliação da atividade antitumoral e toxicidade *IN VITRO* de drogas híbridas (2-ARILQUINAZOLINOCHALCONAS) em linhagens tumorais de mama

Projeto apresentado ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Renato José da Silva Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Dennis Russowsky

Barretos, SP
2024

Giulia Rodrigues Stringhetta

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E TOXICIDADE *IN VITRO* DE DROGAS
HÍBRIDAS (2-ARILQUINAZOLINOCHALCONAS) EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA**

Projeto apresentado ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Renato José da Silva Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Dennis Russowsky

Barretos, SP
2024

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através de Auxílio à Pesquisa – Regular (processos números 2022/05597-4 e 2023/02032-9).

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

Esta dissertação foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos.

Os pesquisadores declaram não ter qualquer conflito de interesse relacionado a este estudo

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Renato José da Silva de Oliveira por ter me orientado e me guiado ao longo desta jornada. Pela paciência, pelo auxílio e por todo carinho com que me acolheu desde o princípio. Agradeço pelas excelentes sugestões e por se fazer sempre presente.

Ao Prof. Dr. Dennis Russowsky pela coorientação e pelo fornecimento dos compostos que serviram como base para o desenvolvimento deste projeto. Agradeço pelas sugestões, ensinamentos e pela colaboração.

Ao Dr. Eduardo Bustos Mass e ao laboratório de sínteses orgânicas da UFRGS pela síntese e fornecimento dos compostos que deram origem a este projeto.

Aos membros das Bancas de Acompanhamento e Defesa Prof. Dra. Lídia Rebolho Arantes, Dra. Giovanna Barbarini Longato e Dr. Norival Alves Santos Filho por dedicarem seu tempo e conhecimento para colaborar com melhorias em nosso projeto, por meio de excelentes sugestões e críticas construtivas que serão de grande importância para o aprimoramento desta pesquisa.

A toda equipe do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM) pelo fornecimento de todo o suporte técnico e material necessário para o desenvolvimento das metodologias deste projeto.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Desafios do tratamento oncológico	1
1.2	Derivados de chalconas	2
1.3	Derivados de quinazolininas.....	3
1.4	Conceito de terapias combinadas (híbridas) e potencial antitumoral	4
2	JUSTIFICATIVA.....	7
3	OBJETIVOS.....	8
3.1	Objetivo geral	8
3.2	Objetivos específicos	8
4	MATERIAL E MÉTODOS	9
4.1	Avaliação <i>in silico</i> e busca de potenciais alvos dos compostos híbridos	9
4.2	Linhagens celulares	9
4.3	Obtenção das moléculas híbridas	10
4.4	<i>One dose screening</i> e seleção das melhores moléculas.....	11
4.5	Avaliação <i>in silico</i> dos parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos (ADMET) 12	
4.6	Cálculos dos valores de IC ₅₀ e índice de seletividade (IS).....	13
4.7	Análise de morte e ciclo celular por citometria de fluxo.....	13
4.8	Análise das vias de proliferação e morte celular alteradas	14
4.9	Ensaio <i>cellevent</i> TM caspase-3/7	14
4.10	Ensaio ROS-GLO TM H ₂ O ₂	14
4.11	Validação dos resultados por <i>western blotting</i>	15
4.12	Migração.....	16
4.13	Validação dos resultados modelos de cultura tumoral 3D	16
4.14	Forma de análise dos resultados	17
4.15	Aspectos éticos	17
5	RESULTADOS	19
5.1	Busca por similaridade <i>in silico</i>	19
5.2	<i>One-dose screening</i>	19
5.3	Análise <i>in silico</i>	22
5.3.1	Alvos Moleculares	22
5.3.2	Parâmetros físico-químicos e <i>Druglikeness</i>	23
5.3.3	Absorção	24
5.3.4	Distribuição.....	25
5.3.5	Metabolismo	26
5.3.6	Excreção.....	26
5.3.7	Toxicidade	27
5.4	Níveis de citotoxicidade e seletividade	28
5.5	Avaliação da citotoxicidade dos compostos em cultura 3D	33
5.6	Análise de ciclo celular.....	34
5.6.1	Citometria de Fluxo	34
5.6.2	Análise de modulação de fatores associados a progressão do ciclo celular	35
5.7	Análise de modulação de vias proliferativas	37
5.8	Análise de morte celular	41
5.8.1	Citometria de Fluxo	41
5.8.2	Análise da modulação das vias de morte celular	42
5.9	Análise de vias de sinalização de dano DNA	46
5.10	Migração celular	47

6	DISCUSSÃO.....	48
6.1	Triagem da atividade antitumoral <i>in vitro</i> e relação estrutura atividade (SAR) de compostos inéditos de 2-arilquinazolinochalconas	48
6.2	Características físico-químicas e farmacocinéticas <i>in silico</i> dos compostos R2 e R14	49
6.2.1	Parâmetros físico-químicos e <i>Druglikeness</i>	49
6.2.2	Absorção	50
6.2.3	Distribuição.....	51
6.2.4	Metabolismo	51
6.2.5	Excreção.....	51
6.2.6	Toxicidade	52
6.3	Níveis de citotoxicidade e seletividade dos compostos R2 e R14.....	53
6.4	Análise de citotoxicidade de R2 e R14 em modelo 3D de esferoides	54
6.5	R2 e R14 induzem a parada do ciclo celular por meio do aumento da expressão de p27 e inibição de CDK2.....	55
6.6	R2 e R14 induzem estresse oxidativo e morte celular, principalmente por via extrínseca.....	59
6.7	R2 e R14 causam danos ao DNA e inibem a via ATR/CHK1	61
7	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura molecular de uma chalcona.	2
Figura 2 -	Estrutura molecular de uma quinazolina.	4
Figura 3 -	Gráficos <i>One Dose Screening</i> .	19
Figura 4 -	Diagrama de Edwards-Venn representando diferentes perfis de toxicidade dos compostos para as linhagens testadas	20
Figura 5 -	Principais alvos moleculares <i>in silico</i> dos compostos R2 e R14.	22
Figura 6 -	Parâmetros físico-químicos preditivos para as moléculas R2 e R14.	23
Figura 7 -	Parâmetros de absorção preditivos para as moléculas R2 e R14.	24
Figura 8 -	Parâmetros de distribuição preditivos para as moléculas R2 e R14.	25
Figura 9 -	Probabilidade das moléculas R2 e R14 inibirem ou servirem como substrato para as isoenzimas do citocromo p450.	26
Figura 10 -	Parâmetros de eliminação preditivos para as moléculas R2 e R14	27
Figura 11 -	Parâmetros de toxicidade preditivos para as moléculas R2 e R14.	27
Figura 12 -	Gráficos das curvas dose-resposta dos compostos R2 e R14.	28
Figura 13 -	Gráficos das curvas dose-resposta do quimioterápico 5-FU	29
Figura 14 -	Gráficos das curvas dose-resposta do quimioterápico Cisplatina	29
Figura 15 -	Gráficos das curvas dose-resposta do quimioterápico Paclitaxel	30
Figura 16-	Gráfico de comparação de citotoxicidade entre os compostos R2 e R14 e os quimioterápicos 5-FU, Cisplatina e Paclitaxel.	33
Figura 17 -	Efeito citotóxico de R2 e R14 em modelo 3D de esferoides.	33
Figura 18 -	Análise de ciclo celular por citometria de fluxo.	35

Figura 19 -	Análise por <i>western blotting</i> dos conteúdos de Geminina e Timidina Quinase	35
Figura 20 -	Análise por <i>western blotting</i> dos conteúdos de inibidores de CDK (CDKIs), CDKs e Ciclina D1.	37
Figura 21 -	<i>Phospho-MAPK Array</i>	38
Figura 22 -	<i>Phospho-RTK Array</i>	39
Figura 23 -	Análise por <i>western blotting</i> do conteúdo proteico das MAPKs ERK, AKT e JNK.	40
Figura 24 -	Análise de morte celular por citometria de fluxo.	41
Figura 25 -	Análise de alteração da expressão de fatores relacionados a morte celular, utilizando o kit <i>Proteome Profile Human Apoptosis Array</i> , após tratamento com as moléculas R2 e R14.	43
Figura 26 -	Análise de <i>western blotting</i> das formas ativadas das Caspases 8 e 9.	44
Figura 27 -	Imagens de fluorescência do Ensaio Caspase-3/7 CellEvent™.	45
Figura 28 -	Níveis de ROS (H ₂ O ₂) produzido após o tratamento com os compostos R2 e R14	46
Figura 29 -	Análise por <i>western blotting</i> do conteúdo proteico das proteínas sinalizadoras do dano de DNA	46
Figura 30 -	Ensaio de migração.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Identificação e características químicas das moléculas híbridas (2-Arilquinazolino-chalconas).	10
Tabela 2 - Diferentes desfechos de atividade citotóxica das moléculas-teste na viabilidade das linhagens testadas em relação à presença de radicais e suas posições.	21
Tabela 3 - <i>Score</i> de <i>Druglikeness</i> para as moléculas R2 e R14, de acordo com a regra dos 5 de Lipinski.	24
Tabela 4 - Valores de IC ₅₀ das moléculas R2 e R14 para cada linhagem, e valores IS em relação às linhagens não tumorais HFF-1 e HaCat.	30
Tabela 5 - Valores de IC ₅₀ dos controles positivos 5-FU, cisplatina e paclitaxel para cada linhagem, e valores IS em relação às linhagens não tumorais HFF-1 e HaCat.	31

LISTA DE ABREVIações

FDA	Food and Drug Administration
TFD	Terapia Fotodinâmica
COX	Ciclooxigenase
HSP90	<i>Heat-Shock Protein 90</i>
HDAC	Histonas Deacetilases
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidermal
ABC	<i>ATP-Binding Cassette</i>
RTK	Receptor de Tirosina Quinase
IC ₅₀	Concentração Inibitória 50%
CDDI	<i>Cortellis Drug Discover Intelligence</i>
HER2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
DMSO	Dimetilsulfóxido
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
SRB	Sulforrodamina B
TCA	Ácido Tricloroacético
ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
IS	Índice de Seletividade
5-FU	5-fluorouracila
IP	Iodeto de Propídeo
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
BCRP	<i>Breast Cancer Resistance Protein</i>
ABCG2	<i>ATP-Binding Cassette Subfamily G Member 2</i>
PgP-1	Glicoproteína P1
TPSA	Área de Superfície Polar Topológica
HIA	Absorção Intestinal Humana
PPB	<i>Plasma Protein Binding</i>
BBB	<i>Blood-Brain Barrier</i>
hERG	Gene humano relacionado ao éter-a-go-go
HT	Hepatotoxicidade
DILI	<i>Drug-induced liver injury</i>
CDK	Quinase Dependente de Ciclina
CDKI	Inibidor de CDK
FADD	<i>Fas-Associated protein with Death Domain,</i>
HIF	<i>Hypoxia-Inducible Factor 1</i>
PHD	Prolil Hidroxilases Dependentes de Oxigênio
HSP60	<i>Heat-Shock Protein 60</i>

ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SAR	Relação Estrutura Atividade
H2AX	Histona da Família H2A, Membro X
ATM	Proteína Ataxia-telangiectasia Mutada
ATR	Proteína Relacionada ao Rad3
CHK1	Quinase do Ponto de Checagem 1
HNSCC	Câncer de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço
NSCLC	Câncer de Pulmão Não Pequenas Células
Cdt1	Fator de licenciamento da cromatina e replicação de DNA 1
TS	Timidilato Sintase
TNF-R	Receptor do Fator de Necrose Tumoral
TRADD	Proteína associada ao domínio de morte do TNF-R
SSB	Quebras de Fita Simples
DSB	Quebras de Fita Dupla
DDR	Resposta ao Dano de DNA
SsDNA	DNA de cadeia simples
RPA	<i>Replication Protein A</i>
ATRIP	<i>ATR-interacting protein</i>
HR	Recombinação Homóloga
PARP	Poli (ADP-Ribose) Polimerase

LISTA DE ABREVIações

%	Porcentagem
α	Alfa
β	Beta
λ	Gama
=	Igual
>	Maior
<	Menor
\geq	Maior Igual
\leq	Menor igual
CO ₂	Dióxido de Carbono
H	Hidrogênio
OCH ₃	Metoxila
Cl	Cloreto
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
O ₂	Superóxido
OH	Hidroxila
°C	Graus Celsius
\pm	Mais-menos

RESUMO

Stringhetta GR. Avaliação da atividade antitumoral e toxicidade *in vitro* de drogas híbridas (2-arylquinazolinochalconas) em linhagens tumorais de mama. **Dissertação (Mestrado)**. Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2024.

INTRODUÇÃO: Apesar de seu sucesso inicial, grande parte das terapias-alvo enfrentam desafios, principalmente relacionados ao desenvolvimento de resistência tumoral. Assim, as moléculas híbridas têm sido destacadas por suas atividades antitumorais sinérgicas, levando à menor resistência tumoral e superando as desvantagens de combinações terapêuticas convencionais. Chalconas e quinazolininas são compostos com promissora atividade antitumoral por meio da inibição de proteínas envolvidas na sobrevivência e resistência celular. **OBJETIVOS:** Avaliar o potencial antitumoral e toxicidade *in vitro* de moléculas híbridas inéditas de chalconas e quinazolininas. **METODOLOGIA:** Quinze moléculas de 2-arylquinazolinochalcona (R1-R15) foram triadas quanto à citotoxicidade em linhagens tumorais de mama em modelo 2D, utilizando os protocolos de One e Five-Dose Screening, adaptados Instituto Nacional do Câncer. A partir dos valores de IC₅₀ obtidos, foram calculados os índices de seletividade (IS) dos compostos, usando linhagens celulares não tumorais como controle. Perfis de citotoxicidade foram validados em cultura 3D, utilizando calceína e iodeto de propídio (IP) como marcadores fluorescentes para viabilidade e morte celular, respectivamente. Padrões de morte celular e ciclo celular foram analisados por citometria de fluxo, e a expressão de proteínas relacionadas à proliferação celular, morte celular e vias de sinalização do ciclo celular foi avaliada usando arrays comerciais de análise proteica e western blotting. Os melhores compostos foram caracterizados quanto às suas propriedades ADMET utilizando plataformas *in silico*. **RESULTADOS:** R2 e R14 mostraram as maiores taxas de citotoxicidade e seletividade, com valores de IC₅₀ inferiores a 5 µM e elevada seletividade para a linhagem de câncer de mama triplo-negativo MDA-MB-231. Em cultura 3D de esferoides, R2 e R14 levaram redução de viabilidade e aumento de morte celular. Ambos os compostos levaram ao aumento de morte celular, principalmente por ativação de via extrínica, e a parada de ciclo celular em G0/G1, possivelmente através do aumento da expressão de p27 e subsequente redução dos níveis de CDK2. Além disso, podem desencadear estresse oxidativo e danos no DNA, como evidenciado por elevados níveis de ativação de H2AX, e comprometer as vias de reparo de DNA mediadas por ATR e CHK1. **CONCLUSÃO:** Considerando as limitações e falhas frequentes dos tratamentos oncológicos existentes, e a necessidade contínua do desenvolvimento de novos agentes antitumorais, R2 e R14 surgem como candidatos promissores, uma vez que seus mecanismos de ação diversificados podem ajudar a superar os mecanismos de resistência desenvolvidos pelas células tumorais.

PALAVRAS-CHAVE: Câncer de mama; triplo-negativo; hibridização molecular; ciclo celular; morte celular.

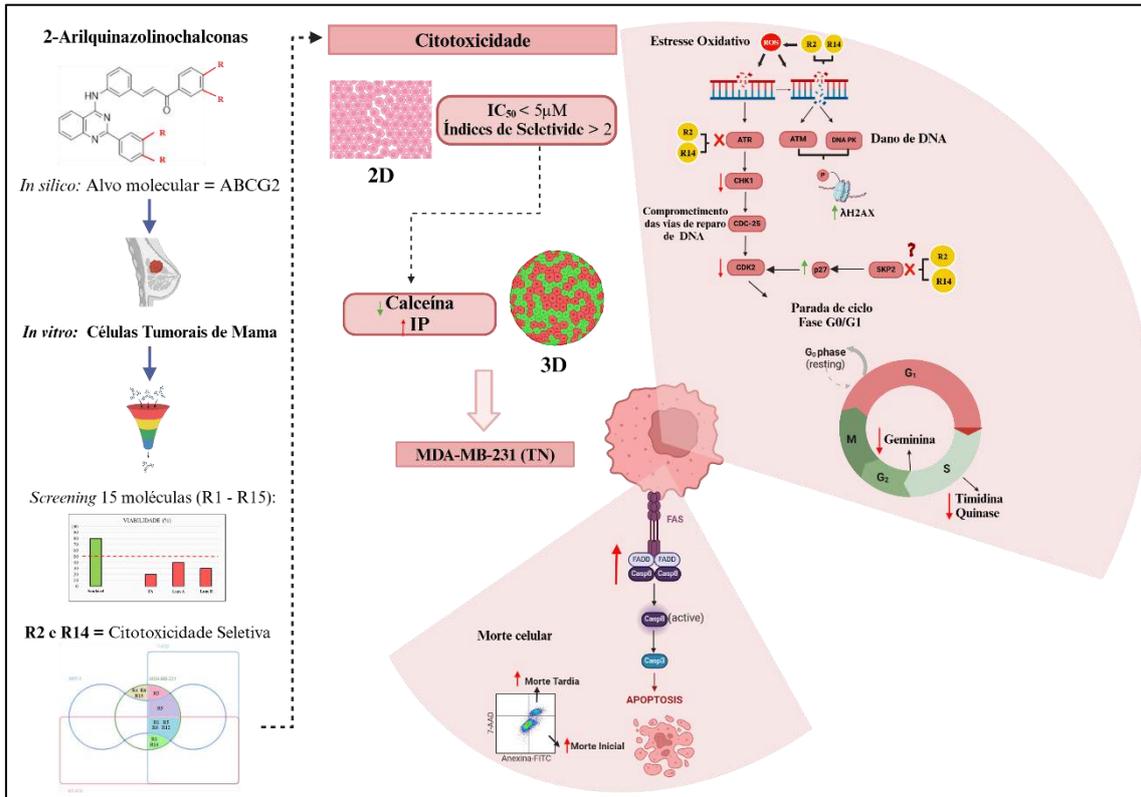
ABSTRACT

Stringhetta GR. Evaluation of antitumor activity and *in vitro* cytotoxicity of hybrid drugs (2-arylquinazolinochalcones) in breast cancer cell lines. **Dissertation (Master's degree)**. Barretos: Barretos Cancer Hospital; 2024.

BACKGROUND: Despite their initial success, many targeted therapies face significant challenges, primarily due to the development of tumor resistance. Hybrid molecules have been highlighted for their synergistic antitumor activities, leading to reduced tumor resistance and overcoming the disadvantages of conventional therapeutic combinations. Chalcones and quinazolines are compounds with promising antitumor activity through the inhibition of proteins involved in cell survival and resistance. **AIM:** To evaluate the antitumor potential and *in vitro* cytotoxicity of novel quinazoline-chalcone hybrids. **METHODOLOGY:** Fifteen 2-arylquinazolinochalcone molecules (R1-R15) were screened for cytotoxicity against 2D breast cancer cell lines using One and Five-Dose Screening protocols adapted from the National Cancer Institute. IC₅₀ values were determined, and selectivity indexes (SI) were calculated using non-tumoral cell lines as control. Cytotoxicity profiles were validated in 3D culture using calcein and propidium iodide (PI) as fluorescent markers for viability and cell death, respectively. Cell death and cell cycle patterns were analyzed via flow cytometry, and protein expression related to cell proliferation, cell death, and cell cycle signaling pathways was evaluated using commercial protein arrays and western blotting. **RESULTS:** Compounds R2 and R14 exhibited the highest cytotoxicity and selectivity rates, with IC₅₀ values below 5 μM and high selectivity for the triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231. In 3D spheroid culture, R2 and R14 decreased viability and increased cell death. Both compounds induced cell death primarily through the extrinsic pathway and caused cell cycle arrest in G0/G1, possibly through increased expression of p27 and subsequent reduction in CDK2 levels. Additionally, they may trigger oxidative stress and DNA damage, as evidenced by elevated levels of H2AX activation, and compromise DNA repair pathways mediated by ATR and CHK1. Despite high hydrophobicity values, *in silico* results showed that both compounds have good absorption and distribution parameters, with a low probability of blood-brain barrier penetration. **CONCLUSION:** Given the limitations and frequent failures of existing oncological treatments, and the ongoing need for the development of new antitumor agents, R2 and R14 emerge as promising candidates, once their diverse mechanisms of action could potentially help overcome the resistance mechanisms developed by tumor cells.

KEY-WORDS: breast cancer; triple-negative; molecular hybridization; cell cycle; cell death.

RESUMO GRÁFICO



1 INTRODUÇÃO

1.1 Desafios do tratamento oncológico

Dada a reconhecida necessidade de novos medicamentos oncológicos, grandes empresas farmacêuticas e de biotecnologia dedicaram esforços intensos nos últimos anos na busca e desenvolvimentos de novas moléculas. No entanto, apenas algumas terapias foram aprovadas nas últimas décadas, e o desenvolvimento de medicamentos para oncologia continua sendo um grande desafio¹. Uma estimativa aponta que de 529 moléculas envolvidas em fases pré-clínicas entre os anos de 2004 e 2005, apenas 45 receberam alguma aprovação de uso oncológico até o ano de 2013. Esta análise mostra que 7,5% dos medicamentos oncológicos que entraram em fase I conseguem finalmente ser aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA)².

Entretanto, o desenvolvimento de resistência é considerado o ponto fraco das terapias oncológicas atuais, sendo caracterizado pela falha ou inefetividade de um agente terapêutico. Entre os mecanismos associados à resistência podemos destacar o papel exercido por fatores ligados ao indivíduo, como por exemplo má absorção, rápido metabolismo e excreção do princípio ativo, e até mesmo baixos níveis de tolerância quando se faz necessário uso de doses reduzidas³. Embora o câncer possa ser tratado por cirurgia, radiação, terapia biológica, terapia hormonal, terapia fotodinâmica (TFD), quimioterapia e imunoterapia, as estratégias combinatórias devem ser consideradas no tratamento oncológico devido à complexidade da biologia do tumor e comunicação cruzada entre as diferentes vias de sinalização no ambiente intratumoral⁴. Usando como exemplo de combinação terapêutica eficiente o uso da TFD e luz para causar dano seletivo ao tecido alvo, que tem sido usada para cânceres acessíveis a luz⁵. Outro fato importante no desenvolvimento de resistência às terapias oncológicas são os perfis de heterogeneidade tumoral, que exercem uma seleção poderosa sobre os tratamentos oncológicos. Neste contexto cada célula tumoral pode ser atingida pela ativação de oncogêneses distintos e inativação de diferentes supressores tumorais, onde embora clonalmente derivados, cada câncer exibe uma enorme variedade celular que pode ser afetada de maneiras diferentes pelas terapias utilizadas⁶.

O pipeline de descoberta e desenvolvimento de drogas convencionais tem quatro componentes principais: identificação de alvo, descoberta de pistas,

desenvolvimento pré-clínico e desenvolvimento clínico⁷. Um programa de descoberta de drogas é iniciado após pesquisar a inibição ou ativação de uma proteína ou via e explicar o efeito terapêutico potencial. Isso leva à seleção de um alvo biológico, muitas vezes exigindo uma validação extensiva antes da fase de descoberta do medicamento principal. Esta fase envolve a busca por uma pequena molécula viável semelhante a um fármaco ou terapia biológica, denominada “candidata”. O medicamento candidato progredirá para o desenvolvimento pré-clínico e, se for bem-sucedido, para o desenvolvimento clínico. Um estudo recente concluiu que o tempo médio de desenvolvimento de um agente antineoplásico, incluindo todas as etapas que se iniciam com a triagem de novas moléculas e as abordagens experimentais clínicas, é de 8,9 anos para câncer de mama; 6,7 anos para câncer colorretal e 6,6 anos para câncer de pulmão de células não pequenas⁸. Entre os fatores que influenciam, podemos listar a falha do desenho do estudo nas etapas iniciais que poderiam selecionar medicamentos com maior probabilidade de sucesso em fases futuras de desenvolvimento⁸.

1.2 Derivados de chalconas

As chalconas são cetonas aromáticas de ocorrência natural, consideradas um dos primeiros compostos de origem vegetal isolados, e possuem uma estrutura formada por dois anéis aromáticos conectados por um sistema de carbonil insaturado de três carbonos. Quimicamente as chalconas ou 1,3-difenil-2-propen-1-ona, como podem ser chamadas, são definidas como cetonas $\alpha\beta$ -insaturadas, onde se liga tanto na carbonila quanto na porção olefínica dos grupamentos aromáticos, comumente chamados de anel A e anel B (**Figura 1**).

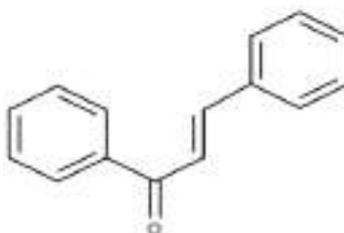


Figura 1. Estrutura molecular de uma chalcona.

Na natureza, as chalconas são precursores de moléculas como os flavonoides, e possuem naturalmente cor amarelada, podendo ser isolados de várias partes vegetais,

tendo sido isoladas pela primeira vez em 1800⁹. Entretanto, as chalconas foram sintetizadas em laboratórios pela primeira vez em 1910⁹, e desde então o potencial biológico da molécula vem sendo explorado em vários contextos de pesquisa. Embora tenha uma estrutura relativamente simples, possuem atividades farmacológicas como potencial inibitório das enzimas α -amilase e α -glicosidase, comprovado em modelos *in vitro* e *in vivo*^{10,11}; inibição da resposta inflamatória, através da inibição de ciclooxigenase (COX- 1 e COX-2)¹²; atividade antimicrobiana contra organismos multirresistentes¹³, antifúngica¹⁴ e antiparasitária, especificamente antileishmanial¹⁵. Recentemente, a atividade antineoplásica das chalconas ganhou destaques e alguns dos seus mecanismos alvos se tornaram conhecidos. Alguns estudos demonstram que as chalconas sintéticas podem ter um efeito inibidor de HSP90 (*heat-shock proteins 90*)¹⁶, induzir significativamente a parada do ciclo celular de linhagens tumorais de mama, além de reverter o fenótipo de transição epitélio mesenquimal neste mesmo tipo tumoral¹⁷. Um estudo recente mostrou que diferentes derivados de chalconas sintéticas foram selecionados e testados quanto ao seu efeito na inibição de histonas desacetilases (HDACs) de linhagens tumorais de mama. Os resultados indicam que a estrutura das chalconas pode desempenhar um papel importante no controle da proliferação destas células, principalmente nas linhagens triplo negativas com mutações epigenéticas já conhecidas¹⁸. Além disso uma investigação *in vitro* e *in vivo* demonstrou a alta seletividade de uma chalcona e sua atuação nos mecanismos de migração, invasão e regulação de marcadores de transição epitélio mesenquimal de células tumorais de esôfago¹⁹.

Baseado nestas evidências acreditamos que as chalconas podem servir como protótipos para o desenvolvimento de novas biomoléculas, possibilitando a análise das relações estrutura-atividade, assim como permitindo ligeiras modificações em seu esqueleto com intuito de torná-los menos tóxicos e mais eficazes.

1.3 Derivados de quinazolininas

Sintetizadas pela primeira vez em 1869, as quinazolininas são compostos formados por uma estrutura de anel duplo que contém um sistema de anel de benzeno fundido à pirimidina em dois átomos de carbono adjacentes (**Figura 2**).

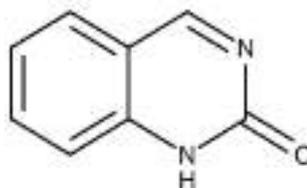


Figura 2. Estrutura molecular de uma quinazolina.

As quinazolininas e seus derivados representam uma classe importante de compostos, pois possuem uma ampla gama de atividades farmacológicas já descritas como analgésica²⁰, antioxidante, anti-inflamatória²¹, anti-convulsivante²², antibacteriana²³, antiviral e anticâncer²⁴. Os efeitos biológicos das quinazolininas no contexto oncológico são descritos da seguinte forma: a) capacidade de inibição de receptores tirosina quinases como por exemplo, os derivados de quinazolininas com capacidade de inibir o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) que se encontra super ativado em vários tumores sólidos; b) atividade de inibição de tubulinas; c) indução de apoptose; d) inibição da via de sinalização PI3K/AKT; e) inibição dos transportadores da família *ATP-binding cassette* (ABC) para superar a multirresistência de tumores.

Existem inúmeros compostos baseados em quinazolininas apresentados na literatura científica, e isso deve-se a sua síntese relativamente simples, e as altas expectativas quanto a suas atividades biológicas ainda desconhecidas²⁵. Entre todos os alvos mencionados acima com capacidade antitumoral de quinazolininas e seus derivados, os inibidores do receptor de tirosina quinases (RTK), principalmente os inibidores de EGFR, receberam os maiores créditos nos últimos anos. Em razão da ativação, superexpressão ou mutações do EGFR, uma história de sucesso se desenhou com a aprovação de uso do inibidor de EGFR de 1ª e 2ª geração como gefitinib e afatinib, ambos derivados das quinazolininas, para o tratamento de adenocarcinomas de pulmão (EGFR mutantes)²⁶.

1.4 Conceito de terapias combinadas (híbridas) e potencial antitumoral

Com a descoberta de oncogenes e genes supressores de tumores nas décadas de 1970 e 1980, e a consequente elucidação das vias de transdução de sinais celulares, foi desenvolvido um novo conceito aplicado à terapia oncológica: o uso de moléculas de

baixo peso molecular, que têm como alvos mutações e fatores específicos que levam à progressão de cada tipo tumoral. Assim, em 2001, surge o fármaco Imatinib como a primeira terapia-alvo utilizada no tratamento oncológico, direcionado a leucemia mieloide crônica, por meio da inibição da proteína mutante BCR-ABL²⁷.

Ainda assim, durante uso clínico, grande parte das terapias-alvo antitumorais enfrentam desafios relacionados ao desenvolvimento de resistência tumoral, que pode estar associada a diferentes mecanismos, incluindo mutações genéticas ou epigenéticas, ampliações, efluxo de drogas, desregulação do processo apoptótico, entre outros²⁸. Com isso, surge o conceito de polifarmacologia, a princípio em forma de combinações terapêuticas, como coquetéis de fármacos ou fármacos multicomponentes. No entanto, tais abordagens terapêuticas ainda enfrentam desvantagens, principalmente em relação à possível toxicidade e interação medicamentosa dos componentes dessas combinações, além de diferentes níveis de solubilidade, biodisponibilidade e características farmacocinéticas de cada fármaco, podendo levar a desfechos clínicos desfavoráveis²⁹.

Assim, surge o conceito de drogas híbridas, que consiste na união de duas moléculas com diferentes atividades biológicas em uma única molécula, que pode atingir diferentes alvos moleculares ao mesmo tempo, e podem ser obtidas. As moléculas híbridas podem ser obtidas tanto por meio da união de drogas inteiras quanto pela junção de porções farmacofóricas dessas moléculas, através de um desenho racional baseado no reconhecimento de subunidades ativas que mantêm características pré-selecionadas de suas estruturas originais. A hibridização é então obtida através de metodologias de fusão direta, sobreposição das moléculas, ou por meio do auxílio de um conector ou “spacer”, responsável pela ligação entre as duas moléculas²⁸.

O desenho de drogas híbridas está em constante evolução e demonstra avanços para a descoberta de drogas anticâncer inovadoras e potentes. Um recente estudo demonstrou que um híbrido de chalconas e quinazolininas apresentou atividade antitumoral contra as linhagens tumorais de gliomas (IC₅₀ 3,75 e 0,72 µg/mL) L929 e U87-MG, além de inibir proteínas associadas ao controle do ciclo celular, como a proteína p21³⁰. Em seguida, ensaios *in vivo* deste mesmo grupo, mostraram que após a injeção de 30 mg/kg do composto híbrido, houve uma significativa redução no tamanho e peso dos tumores dos animais. A síntese e incorporação das duas moléculas pode

interferir no efeito antitumoral, e de acordo com um amplo estudo de revisão, que abrange o efeito destas moléculas híbridas, a posição do grupamento carbonil interfere na potência de ação das mesmas³¹. Adicionalmente, o efeito de algumas moléculas híbridas demonstrou uma potência ainda maior que terapias convencionais, como 5-fluorouracil³². Com foco nos mecanismos de ação destas moléculas híbridas, um estudo demonstrou um conjunto de alterações moleculares obtidos após o tratamento das linhagens celulares tumorais Mia-Paca-2 e Panc-1 (pâncreas), A549 (pulmão), MCF7 (mama), PC-3 (próstata) e HCT116 (intestino). Entre eles, podemos destacar a indução à apoptose, aumento da população de células na fase sub- G0, inibição da sinalização da via PI3K/AKT e redução da razão entre as proteínas pró e antiapoptóticas Bcl-2 e Bax³³. Considerando a atividade antitumoral das chalconas e quinazolininas, a hibridização destas duas moléculas pode representar uma oportunidade para desenvolver novos agentes com ação em células tumorais.

2 JUSTIFICATIVA

Embora as terapias atuais apresentem resultados positivos no tratamento oncológico, os mecanismos pelos quais os tipos de câncer escapam ao tratamento ainda são desafiadores incentivando a busca por novas moléculas terapêuticas. Neste contexto, o conceito de moléculas híbridas representa uma estratégia em potencial para o tratamento oncológico, uma vez que podem agir em diferentes alvos, de forma seletiva, driblando mecanismos de resistência das células tumorais. Moléculas de chalconas e quinazolininas vêm sendo conhecidas na literatura como promissoras candidatas a compostos antitumorais, e, portanto, após a síntese e obtenção de moléculas híbridas inéditas de chalconas e quinazolininas apresentadas nesta proposta, justifica-se a avaliação da atividade antitumoral e toxicidade *in vitro* dessas moléculas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antitumoral e toxicidade *in vitro* de moléculas híbridas inéditas de chalconas e quinazolininas.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar os compostos através da busca por similaridade em bancos de dados *in silico*;
- Triar e identificar as melhores moléculas em culturas de célula 2D, utilizando o protocolo adaptado de *One Dose Screening* do *National Cancer Institute* (NCI)³¹;
- Caracterizar os parâmetros físico-químicos, farmacocinéticos e alvos moleculares das melhores moléculas usando preditores *in silico* ADMETLab e SwissADME;
- Estabelecer os níveis de citotoxicidade (IC₅₀) e seletividade das melhores moléculas em linhagens tumorais (2D);
- Avaliar e classificar a atividade citotóxica das melhores moléculas em combinações terapêuticas como sinérgicas, aditivas ou antagônicas.
- Investigar a influência das melhores moléculas híbridas na regulação de morte e ciclo celular por meio de citometria de fluxo;
- Avaliar o efeito biológico do tratamento das melhores moléculas híbridas na modulação das principais vias de proliferação e morte celular por arranjos proteicos;
- Validar os resultados obtidos nas análises de interferência dos processos de morte, ciclo e proliferação celular por meio da análise do conteúdo das principais proteínas envolvidas nestes processos por *western blotting*;
- Avaliar a influência das melhores moléculas nos processos de migração celular;
- Avaliar a reprodutibilidade dos resultados obtidos em cultura tridimensional 3D de esferoides.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Avaliação *in silico* e busca de potenciais alvos dos compostos híbridos

Para direcionamento e desenho do projeto foi realizada uma avaliação *in silico* usando a plataforma Cortellis™ *Drug Discovery Intelligence* (CDDI) da Clarivate™. A ferramenta foi utilizada para busca e caracterização de estruturas idênticas ou similares aos compostos sintetizados propostos neste projeto. Essa plataforma dispõe de dados químicos, biológicos e farmacológicos de quase 600 mil fármacos e potenciais fármacos, curados manualmente para o suporte à pesquisa na descoberta de novas drogas. A partir do composto de menor massa molecular (EB367), foi realizada uma busca por similaridade utilizando índice de Tanimoto no nível de 80%. Os resultados desta caracterização *in silico* inicial direcionaram a escolha das linhagens tumorais de mama, bem como o desenho experimental associados a este projeto, tendo como ponto inicial da triagem das moléculas híbridas candidatas.

4.2 Linhagens celulares

Foram utilizadas linhagens de câncer de mama MDA-MB-231 e BT-20 (triplo negativas), T-47D e MCF-7 (Luminal A), BT-474 (Luminal B) e SKBR3 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2* - HER2 - superexpresso) e as linhagens não tumorais HFF-1 (linhagem fibroblástica não tumoral) e HaCat (Queratinócito não tumoral), armazenadas no Banco de Células do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM) do Hospital de Amor, gentilmente cedidas pelo Dr. Rui M. Reis. De maneira geral, as células são cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% SFB (Soro Fetal Bovino - Gibco) e 1% de P/S (Penicilina/streptomicina) em frascos de cultura e incubadas à 37 °C, 5% de CO₂ e 90% de umidade, até atingirem confluência. Após confluência, as células são tripsinizadas, plaqueadas e mantidas nas condições acima descritas para os estudos de caracterização biológica e de resposta terapêutica. Para evitar a identificação incorreta e/ou contaminação cruzada, as linhagens celulares foram autenticadas por análise de STR³⁴. Alíquotas do cultivo foram regularmente testadas para contaminação por micoplasma utilizando o *MycoAlert™ PLUS Mycoplasma Detection Kit* (Lonza, Walkersville, MD, EUA).

4.3 Obtenção das moléculas híbridas

As moléculas híbridas de 2-Arilquinazolino-chalconas, aqui referidas como moléculas “R” (R1 – R15), foram desenvolvidas pela equipe do Laboratório de Síntese Orgânicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sob responsabilidade do Dr. Dennis Russowsky que possui uma parceria colaborativa com os pesquisadores do Hospital de Câncer de Barretos. Aproximadamente 5-6 mg de cada um dos compostos liofilizado foram encaminhados ao CPOM, para futuras diluições conforme o protocolo estabelecido neste estudo. As diluições padrões serão realizadas em Dimetilsulfóxido (DMSO), de acordo com o peso molecular (**Tabela 1**) a fim de se obter uma solução estoque inicial de 10 mM.

Tabela 1. Identificação e características químicas das moléculas híbridas (2-Arilquinazolino-chalconas).

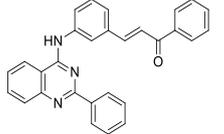
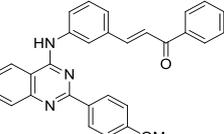
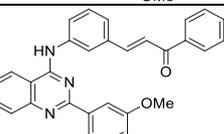
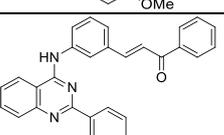
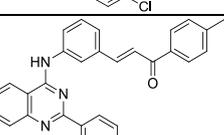
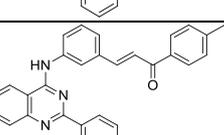
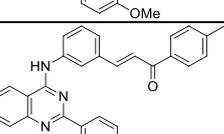
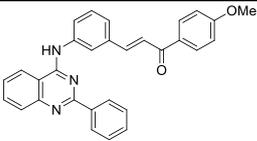
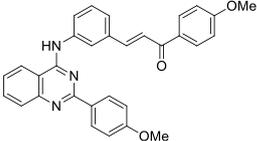
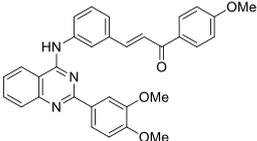
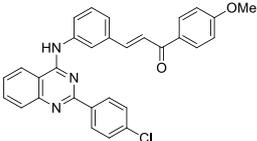
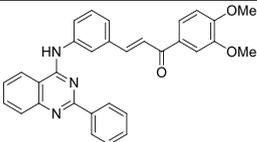
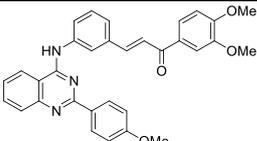
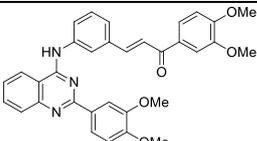
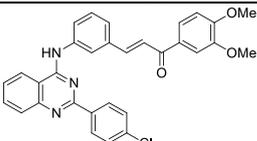
Código	Estrutura molecular	Massa Molar (g/mol)	Massa (mg)
RQC01		427,50	6,0
RQC02		457,52	5,7
RQC03		487,55	6,0
RQC04		461,94	6,0
RQC05		441,52	5,3
RQC06		471,55	5,8
RQC07		475,97	5,8

Tabela 1 (Continuação). Identificação e características químicas das moléculas híbridas (2-Arilquinazolino-chalconas).

RQC08		457,52	6,4
RQC09		487,55	5,2
RQC10		517,57	5,7
RQC11		491,97	5,9
RQC12		487,55	5,8
RQC13		517,57	5,4
RQC14		547,60	5,8
RQC15		521,99	5,5

4.4 One dose screening e seleção das melhores moléculas

Para triagem e seleção das melhores moléculas, foi utilizado o protocolo *One-Dose Screening*³⁵ adaptado do *National Cancer Institute* (NCI) em cultura de células 2D, utilizando as linhagens tumorais MDA-MB-231, T-47D, BT-474 e a linhagem não-tumoral HFF-1. As células foram semeadas em placas de 96 poços a 10.000 células/poço em meio de cultura, com volume final de 100 μ L. Após a adesão e formação de monocamadas, as células foram tratadas com os compostos na concentração de 10 μ M em quadruplicatas. Para os controles negativos, foi adicionado DMSO a 1%. Após 72h de tratamento, a citotoxicidade dos compostos foi avaliada por meio do ensaio da Sulforrodamina B

(SRB). As células foram fixadas com 100 µL de Ácido Tricloroacético 10% (TCA) à 4 °C por 1 hora e então lavadas cinco vezes com água corrente. Após completa secagem foram adicionados 50 µL do corante SRB 0,04%, preparado em ácido acético 1%, e as placas foram incubadas em temperatura ambiente por 30 minutos. O excesso de corante foi removido com ácido acético 1% seguido de secagem completa das placas e adição de tampão Tris Base 10 mM para solubilização do corante ligado às proteínas de membrana das células fixadas. As placas foram então submetidas à agitação por 5 minutos e lidas à 565 nm em leitor de microplaca (*Varioskan – Thermo Cientific*).

As moléculas responsáveis por inibirem mais de 50% da viabilidade celular de três linhagens tumorais de mama utilizadas (uma de cada subtipo molecular), mas que não exerceram o mesmo efeito na linhagem saudável (HFF-1), foram selecionadas para as próximas etapas do projeto.

4.5 Avaliação *in silico* dos parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos (ADMET)

Para avaliação *in silico* dos parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade foram usadas as plataformas ADMETLab e SwissADME. Ambas são compostas de modelos matemáticos preditores capazes de avaliar as características toxicológicas e cinéticas de moléculas a partir de sua sequência SMILE. Estes ensaios *in silico* tem capacidade de prever a predisposição a reações idiossincráticas, formação de metabólitos reativos e antecipar a exposição da substância em humanos. Os parâmetros ADMET foram interpretados e compilados para determinação das propriedades como por exemplo: pKa, solubilidade, estabilidade química, lipofilicidade, capacidade de interação com o sistema oxidativo Citocromo P450 e afinidade de ligação às proteínas plasmáticas. A partir dos parâmetros físico-químicos previstos, foi possível realizar o cálculo do *score* de *Druglikeness* para as melhores moléculas, baseado na regra dos 5 de Lipinski ³⁶, que leva em considerações os fatores: peso molecular (≤ 500), LogP (≤ 5), número de doadores de Hidrogênio (≤ 10) e número de receptores de Hidrogênio (≤ 5). São consideradas como moléculas passíveis de boa biodisponibilidade oral aquelas que apresentarem pelo menos dois destes parâmetros dentro dos valores esperados.

4.6 Cálculos dos valores de IC₅₀ e índice de seletividade (IS)

Para obtenção dos valores de IC₅₀ das melhores moléculas, foi utilizado o protocolo do *Five-Dose Screening* adaptado do NCI³⁵. Nesta etapa, foram utilizadas as linhagens tumorais MDA-MB-231, BT-20, T-47D, MCF-7, BT-474 e SKBR3 e as linhagens não tumorais HFF-1 e HaCat. As células foram semeadas em placas de 96 poços numa densidade de 10.000 células/poço em meio de cultura, com volume final de 100 µL. Após a adesão e formação de monocamadas, as células foram tratadas com os compostos em concentrações de 0 a 35 µM em triplicatas. Para controles positivos foram estabelecidas curvas dose-resposta para os quimioterápicos 5-FU (concentrações de 0 a 35 µM), cisplatina (concentrações de 0 a 50 µM) e paclitaxel (concentrações de 0 a 0,05 µM). Para os controles negativos foi adicionado DMSO a 1%. Após 72h de tratamento, a citotoxicidade dos compostos foi avaliada por meio do ensaio SRB, como descrito previamente. Posteriormente, foram calculados os índices de seletividade (IS) dos compostos testados por meio da divisão do IC₅₀ das linhagens não tumorais pelo IC₅₀ de cada linhagem tumoral. Serão considerados seletivos compostos com índices de seletividade igual ou superior a 2, de acordo com Suffness e Pezzuto, 1991³⁷.

4.7 Análise de morte e ciclo celular por citometria de fluxo

Para as análises de morte e ciclo celular, a linhagem MDA-MB-231 foi tratada com os melhores compostos na concentração de 5µM (menor concentração que abrange os valores de IC₅₀ obtidos para as melhores moléculas selecionadas) nos tempos de 24, 48 e 72 horas de tratamento, utilizando como controle positivo o 5-FU (na mesma concentração) e DMSO 1% como controle negativo. Posteriormente, as células foram submetidas à marcação com anexina V (marcador de morte celular inicial) e com 7-AAD (marcador de morte celular tardia) utilizando o kit comercial *Annexin V- FITC Apoptosis Detection Kit I* (BD Biosciences) conforme as recomendações do fabricante. Para avaliar a interferência no ciclo celular, após 72 horas de tratamento, as células foram incubadas, com IP (iodeto de propídio – FITC) utilizando o kit comercial *Cycle Test Plus* (BD Biosciences) conforme as instruções do fabricante. A aquisição dos dados foi realizada no citômetro de fluxo BD Accuri C6 (BD Biosciences) e analisada com o programa BD Accuri C6 (BD Biosciences).

4.8 Análise das vias de proliferação e morte celular alteradas

A linhagem MDA-MB-231 foi cultivada em garrafas de cultura T25 e ao atingir 90% da confluência foi tratada com os melhores compostos a 5 μ M e DMSO 1% por 24 horas. Logo em seguida o meio foi desprezado e as células lisadas com o tampão de acordo com as instruções do fabricante. O conteúdo proteico de cada garrafa foi quantificado pelo método de Bradford e foram utilizados 750 – 1000 μ g de proteína nas sucessivas etapas do ensaio. Após a obtenção do conteúdo proteico foram caracterizadas a influência dos compostos sobre as principais vias de sinalização utilizando arranjos proteicos pelo método *Proteome Profiler Human phospho-RTK Array*, *Human phospho-MAPK array* e *Proteome Profiler Human Apoptosis Array* (R&D Systems) conforme a descrição do fabricante. Os resultados foram detectados por quimioluminescência ECL e fotodocumentadas na plataforma *Image Quant LAS 4000mini* (GE, *Health Science*).

4.9 Ensaio CellEvent™ caspase-3/7

Para o ensaio de detecção das formas ativadas das caspases 3/7, a linhagem MDA-MB-231 foi plaqueada numa densidade de 10.000 células/poço (em triplicatas) em placas de 96 poços escuras com fundo transparente. As células foram tratadas com os compostos R2 e R14 a 5 μ M durante o período de 12 horas, sendo adicionado 1% de DMSO em poços referentes ao controle negativo. Foi então realizado o ensaio CellEvent™ Caspase-3/7 de acordo com as instruções do fabricante. Por meio dos reagentes utilizados, foi possível a obtenção de substratos fluorogênicos subsequentes à ativação das Caspases 3/7, que foram possíveis de serem observados e fotografados em microscópio de fluorescência invertido, utilizando o filtro FITC. A análise de intensidade de fluorescência obtida para cada condição de tratamento foi realizada por meio da plataforma ImageJ.

4.10 Ensaio ROS-GLO™ H₂O₂

Para o ensaio de detecção de H₂O₂, a linhagem MDA-MB-231 foi plaqueada numa densidade de 10.000 células/poço (em triplicatas) em placas de 96 poços escuras com fundo transparente. As células foram tratadas com os compostos R2 e R14 a 5 μ M durante o período de 24 horas. Nos poços referentes aos controles negativos foi

adicionado DMSO 1%. Foi então realizado ensaio de detecção de ROS utilizando o kit comercial ROS-GLO™ H₂O₂ de acordo com as instruções do fabricante. O H₂O₂ produzido pelas células foi detectado por luminescência em leitor de microplaca (*Varioskan – Thermo Cientific*).

4.11 Validação dos resultados por *western blotting*

A linhagem MDA-MB-231 foi cultivada em garrafas de cultura T25 e ao atingir 90% da confluência foi tratada com os melhores compostos e 5-FU a 5 µM, e DMSO 1% por 24 e 48 horas. Para análise de proteínas das vias das MAP Quinases, as células foram deixadas em meio 0% SFB por duas horas, para privação de nutrientes. As células em seguida foram tratadas com os compostos durante o período de duas horas, e posteriormente estimuladas com a adição de Fator de Crescimento Epidermal (EGF) 10ng/mL por 15 minutos.

Após o período de tratamento, o meio foi desprezado e as células lisadas por meio de tampão de lise contendo inibidores de protease (metaloprotease, fenilmetanosulfonila, leupeptina, aprotinina e pepstatina). O conteúdo proteico de cada garrafa foi quantificado pelo método de *Bradford* e foram utilizados entre 20 e 35 µg de proteínas para este ensaio. As proteínas, diluídas em tampão laemmli, foram submetidas a eletroforese em géis de 10, 12 e 15% de poliacrilamida, utilizando kits comerciais de Tris-Glycine eXtended (TGX™) FastCast™ (Bio-Rad), durante 120 minutos a 90mV. As proteínas foram então transferidas para membranas de nitrocelulose por meio de um sistema semi-seco de transferência durante 4 horas a 70mA.

Em seguida, as membranas foram bloqueadas por 1 hora em leite Molico diluído em TBS-Tween (5%) e as proteínas-alvo foram detectadas por incubação overnight a 4°C com anticorpos primários diluídos em BSA (1:1000), adquiridos comercialmente pela empresa *Cell Signalling Technology* (CST): *Thymidine Kinase 1* E2H7Z (#28755); *Geminin* E5Q9S (#52508); *Cyclin D1* 92G2 (#2926); *CDK6* DCS83 (#3136); *CDK2* 78B2 (#2546); p27 D69C12 (#3686); p21 Waf1/Cip1 12D1 (#2947); *phospho-p53* (Ser15) 16G8 (#9286); *phospho-AKT* C31E5E (#2965); *Akt* (pan) C67E7 (#4691); *phospho-SAPK/JNK* 81E11 (#4668); *JNK/SAPK* (#9252); *phospho-p44/42* MAPK (Erk1/2) (#4370); p44/42 MAPK (Erk1/2) 137F5 (#4695); *Caspase-8* 1C12 (#9746); *Caspase-9* (#9502); *phospho-Histone*

H2A.X (Ser139) 20E3 (#9718); *phospho*-ATM (Ser1981) D6H9 (#5883); *phospho*-ATR (Ser428) #2853; *phospho*-Chk1 (Ser345) 133D3 (#2348); β -Actin 8H10D10 (#3700).

Posteriormente as membranas foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente com anticorpos secundários *anti-mouse* (*Anti-mouse* IgG, *HRP-linked Antibody* #7076) ou *anti-rabbit* (*Anti-rabbit* IgG, *HRP-linked Antibody* #7074) diluídos em leite Molico (1:5000), previamente diluídos em TBST. A reação foi então quantificada por Quimioluminescência ECL e fotodocumentadas na plataforma *Image Quant* LAS 4000mini (GE, *Health Science*). A β -actina foi utilizada como controle endógeno. Os resultados foram quantificados com auxílio da plataforma ImageJ.

4.12 Migração

O nível de migração celular foi analisado por meio do ensaio de migração *transwell*. Neste ensaio a linhagem MDA-MB-231 foi semeada em insertos *transwell* numa densidade de $1,5 \times 10^5$ células/inserto em um volume final de 500 μ L de meio DMEM (0% SFB), contendo os respectivos tratamentos (DMSO 1% e melhores compostos na concentração de 5 μ M) em duplicatas. Os insertos são inseridos em poços de placa de 24 poços contendo 750 μ L de meio DMEM (10% SFB), e após 24 horas de tratamento os insertos foram retirados, incubados em DPBS (5 minutos) e fixados com metanol (5 minutos). Células da parte superior dos insertos foram então removidas com auxílio de cotonetes, e as células fixadas na parte inferior dos insertos foram coradas com hematoxilina (15 minutos) e eosina (15 minutos). As membranas dos insertos com as células fixadas foram então analisadas em microscópio óptico na objetiva de 10x e foram fotografadas para quantificação utilizando a plataforma ImageJ.

4.13 Validação dos resultados modelos de cultura tumoral 3D

Para estabelecimento de uma cultura de esferoides foram utilizados micromoldes obtidos comercialmente (Bioedtech) para formação de gel de agarose em micropoços. Os micromoldes possibilitam a formação de 216 esferoides por poço, em placa de 12 poços. Na placa de 12 poços foram aliquotados 500 μ L de agarose diluída em DPBS (2%). Após incubação de 15 minutos em temperatura ambiente para solidificação do gel, foram aliquotados de 350 a 400 μ L de agarose nos poços, onde os micromoldes foram então inseridos e incubados por meia hora. Após a retirada dos

micromoldes, os micropoços de agarose formados foram lavados 3x com meio DMEM por 15 minutos e a placa incubada em luz UV, durante meia hora, para esterilização. As células das linhagens T-47D, BT-474, MDA-MB-231 foram então semeadas em uma densidade de 5×10^6 células por poço em um volume final de 1mL de meio DMEM (10% SFB) e incubadas por 24 horas para sedimentação das células e formação dos esferoides. Após incubação, os esferoides foram então tratados com os compostos em concentrações de $25 \mu\text{M}$ (doses 5x mais concentradas que a dose utilizada nos ensaios 2D) em volume final de 1mL de DMEM (0,5% SFB). Nos poços referentes aos controles negativos foi adicionado DMSO 1%. Para análise de viabilidade celular os esferoides foram incubados com calceína ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) durante 5 horas e com Iodeto de Propídio (IP) ($0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$) por 15 minutos, em um volume final de $500 \mu\text{L}$ de DPBS, e fotografados em microscópio de fluorescência utilizando os filtros FITC e Texas Red. A análise de intensidade de fluorescência dos esferoides foi então realizada por meio das plataformas Fiji e ImageJ.

4.14 Forma de análise dos resultados

Os parâmetros de ADMET (absorção, distribuição metabolismo, excreção e toxicidade) serão analisados de acordo com os descritores da plataforma ADMETlab e SwissADME, logo após a inclusão da sequência SMILE de cada molécula híbrida dentro das plataformas.

As análises dos experimentos *in vitro* serão realizadas em triplicata biológica e experimental. Para as comparações simples entre as diferentes situações estudadas serão utilizados os testes T de *student*, e as diferenças entre os grupos serão testadas utilizando as análises de variância ANOVA de uma e duas vias, seguidas do pós-teste de *Dunnet*. Todas as análises estatísticas serão realizadas utilizando-se o software *GraphPadPrism* versão 8.

4.15 Aspectos éticos

Por se tratar de um conjunto de experimentações *in vitro* que utilizará linhagens celulares imortalizadas, onde nenhum material e tão pouco algum tratamento será oferecido aos pacientes, o projeto não será submetido ao comitê de ética em pesquisa desta instituição. Todas as etapas do projeto seguirão as normas de boas práticas

laboratoriais do CPOM, que consiste em um curso oferecido aos alunos ingressantes na instituição com carga horária de 2 horas.

5 RESULTADOS

5.1 Busca por similaridade *in silico*

A busca de similaridade *in silico* na plataforma CDDI localizou os compostos 950382 e 945037 com similaridades de 83,94 e 81,55%, respectivamente, ao composto de menor massa molecular (EB367). Ambos os compostos também são derivados de chalcona e quinazolina, indicados como inibidores da proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP – *Breast Cancer Resistance Protein*; ABCG2 - *ATP-Binding Cassette Subfamily G Member 2*), característica que direcionou a seleção de linhagens tumorais de mama para o seguimento deste projeto. Nesta análise inicial não foram encontrados compostos idênticos, ensaios clínicos ou patentes associadas a este nível de similaridade.

5.2 *One-dose screening*

Após o tratamento com 15 diferentes moléculas da classe 2-arylquinazolino-chalconas a 10 μ M durante o período de 72 horas, foram determinadas as porcentagens de viabilidade celular das linhagens tumorais MDA-MB-231 (triplo negativa), T-47D (luminal A), BT-474 (luminal B) e da linhagem não tumoral HFF-1, para cada composto. Como controle negativo foi utilizado DMSO a 1% (**Figura 3**).

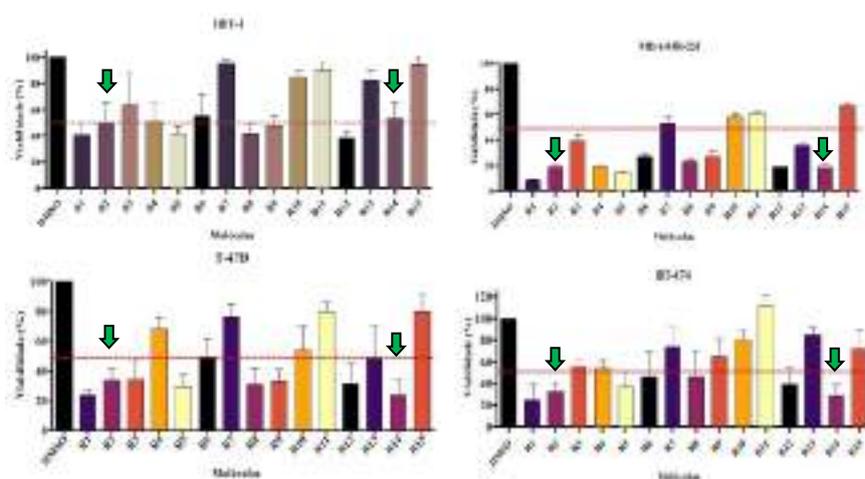


Figura 3. Gráficos *One Dose Screening*. Viabilidade celular das linhagens HFF-1, MDA-MB-231, T-47D e BT-474 tratadas com 15 diferentes moléculas híbridas da classe das 2-arylquinazolino-chalconas, na concentração de 10 μ M, normalizada com o DMSO. As barras de erro representam a média \pm desvio padrão de no mínimo dois experimentos independentes. As setas indicam as moléculas R2 e R14, as quais mostraram atividades seletivas para as linhagens tumorais (MDA-MB-231, T-47D e BT-474), quando comparadas à linhagem não tumoral (HFF-1).

Considerando que a inibição de viabilidade celular para todas as células tumorais tratadas com as moléculas R2 e R14 foi superior à 50%, enquanto para a linhagem não tumoral (HFF1) a inibição foi igual ou inferior a 50%, ambas as moléculas foram consideradas como as mais seletivas para as linhagens tumorais e, portanto, foram selecionadas para as próximas etapas do projeto. Após o tratamento com as moléculas R2 e R14 foram encontradas, respectivamente, as porcentagens de viabilidade 8,45% ($\pm 1,23$) e 18,26% ($\pm 5,64$) para a linhagem MDA-MB-231; 33,71% ($\pm 14,37$) e 23,23% ($\pm 17,83$) para a linhagem T-47D; e 32,95% ($\pm 9,96$) e 28,68 ($\pm 14,29$) para a linhagem BT-474. Já para a linhagem não-tumoral HFF-1, após o tratamento com as moléculas R2 e R14, foram encontradas as porcentagens de viabilidade 49,83% ($\pm 26,76$) e 53,69% ($\pm 20,14$), respectivamente.

Foram comparados a taxas de resposta das linhagens celulares com os diferentes radicais nas estruturas das moléculas candidatas (**Figura 4; Tabela 2**).

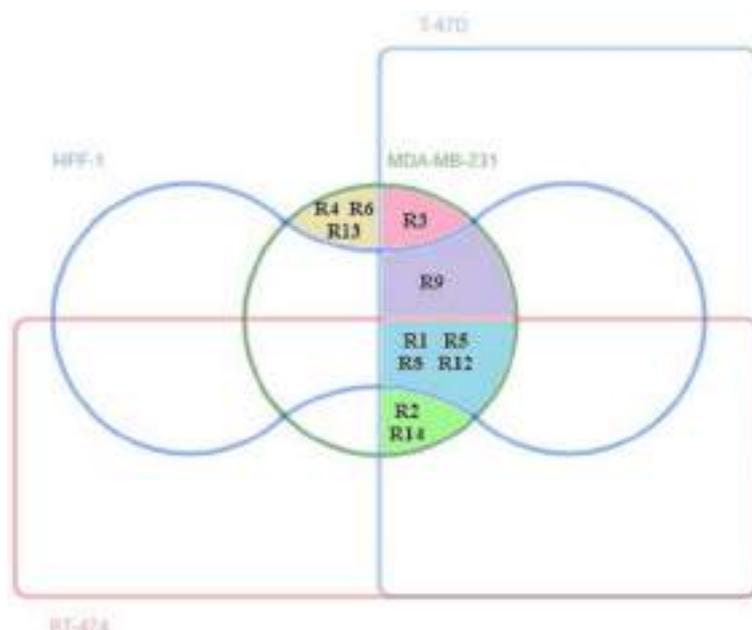
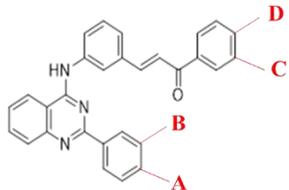


Figura 4. Diagrama de Edwards-Venn representando diferentes perfis de toxicidade dos compostos para as linhagens testadas. Região amarela: compostos seletivos para MDA-MB-231; região rosa: compostos seletivos para MDA-MB-231 e T-47D; região lilás: compostos que representaram toxicidade para as linhagens MDA-MB-231, T-47D e para a linhagem não tumoral HFF-1; região azul: compostos que representaram toxicidade para todas as linhagens testadas (MDA-MB-231, T-47D, BT-474 e HFF-1); região verde: compostos seletivos para as linhagens MDA-MB-231, T-47D e BT-474. Fonte: diagrama desenvolvido utilizando a plataforma digital disponível em <https://goodcalculators.com/venn-diagram-maker/>.

Tabela 2. Diferentes desfechos de atividade citotóxica das moléculas-teste na viabilidade das linhagens testadas em relação à presença de radicais e suas posições (posições A e B referentes à porção da Arilquinazolina e posições C e D referentes à porção da Chalcona).

Classificação	Composto	Arilquinazolina		Chalcona	
		A	B	C	D
Tóxicas para todas as linhagens	R1	H	H	H	H
	R5	H	H	H	CH ₃
	R8	H	H	H	OCH ₃
	R12	H	H	OCH ₃	OCH ₃
Tóxica para MDA, T-47D e HFF-1	R9	OCH ₃	H	H	OCH ₃
Seletiva para MDA-MB-231 e T-47D	R3	OCH ₃	OCH ₃	H	H
Seletivas para MDA-MB-231	R4	Cl	H	H	H
	R6	OCH ₃	H	H	CH ₃
	R13	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃
Seletivas para MDA, T-47D e BT-474	R2	OCH ₃	H	H	H
	R14	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
Não Tóxicas	R7	Cl	H	H	CH ₃
	R10	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃
	R11	Cl	H	H	OCH ₃
	R15	Cl	H	OCH ₃	OCH ₃



Menores pesos moleculares, como no caso das moléculas R1 (427,5 g/mol) e R5 (441,52 g/mol), ou a presença dos radicais metila ou metoxila ligados apenas ao anel benzeno que compõe a estrutura da chalcona das moléculas, como nas moléculas R5, R8 e R12, são fatores que pareceram influenciar em uma citotoxicidade não seletiva, ou seja, inibição de mais de 50% de viabilidade celular para todas as linhagens celulares testadas, sejam elas tumorais ou não tumoral. Já a presença do radical cloreto associado aos radicais metil ou metoxila (moléculas R7, R11 e R15) apresentaram uma baixa citotoxicidade para todas as linhagens utilizadas, uma vez que inibiu menos de 50% de suas viabilidades, enquanto a presença de radicais metoxila ligados ao anel benzeno

pertencente à estrutura das quinazolinonas pareceu influenciar em uma maior seletividade do efeito citotóxico para as células tumorais. Este foi o caso das moléculas R2 e R14, seletivas para todas as linhagens tumorais testadas.

5.3 Análise *in silico*

5.3.1 Alvos Moleculares

Por meio da análise *in silico*, utilizando a plataforma SwissADME, foi possível prever de forma comparativa os principais alvos moleculares das 2-arylquinazolinonas-chalconas (Figura 5).

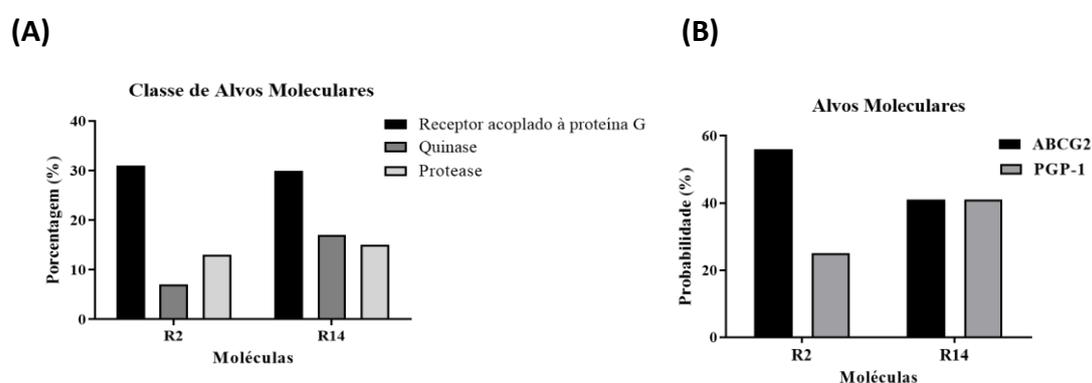


Figura 5. Principais alvos moleculares *in silico* dos compostos R2 e R14. **(A)** Porcentagem de prováveis alvos pertencentes às classes de receptores acoplados à proteína G, quinases e proteases; **(B)** probabilidade das proteínas ABCG2 e PGP-1 serem alvos dos compostos-teste.

Analisando as duas moléculas mais seletivas (R2 e R14), observa-se que a maior parte dos alvos moleculares desses compostos pertencem à classe dos receptores acoplados à proteína G (**Figura 5-A**), representando aproximadamente 30% dos alvos moleculares para ambos os compostos, seguida das classes das quinases, enzimas e proteases. No entanto, as estruturas que apresentam maiores probabilidades de servirem como alvos para estes compostos são proteínas pertencentes à classe das proteínas do transporte ativo primário, como o ABCG2, com 56 e 41% de probabilidade para as moléculas R2 e R14, respectivamente; e a glicoproteína-P 1 (PGP-1) com 25 e 41% de probabilidade para as moléculas R2 e R14, respectivamente (**Figura 5-B**). Ambas as proteínas estão associadas aos mecanismos de multirresistência de células tumorais de mama.

5.3.2 Parâmetros físico-químicos e *Druglikeness*

Foi realizada uma análise *in silico*, para a predição de valores referentes a parâmetros físico-químicos das principais moléculas analisadas neste estudo, pela plataforma ADMETLab 2.0. Esta plataforma utiliza dados experimentais de alta qualidade e modelos personalizados de relação estrutura-propriedade quantitativa (QSPR), permitindo análises de *druglikeness* e previsões da maioria das propriedades relacionadas ao ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Eliminação e Toxicidade)³⁸.

Os parâmetros físico-químicos analisados foram: peso molecular, hidrofobicidade (LogP), hidrossolubilidade (LogS), hidrofobicidade em pH fisiológico – 7,4 (LogD), número de carbonos com a hibridização sp³ (Fsp³), número de átomos doadores e receptores de hidrogênio, área de superfície polar (TPSA), e número de ligações rotacionáveis (Figura 6).

	Massa Molar	LogP	LogS	LogD	Fsp ³	Doador H	Receptor H	TPSA	Ligações rotacionáveis
R2	457,18	5,881	-6,301	4,518	0,033	1	5	67,34	6
R14	547,21	5,276	-5,803	3,931	0,121	1	8	95,03	9

Figura 6. Parâmetros físico-químicos preditivos para as moléculas R2 e R14. Estão representados com a cor verde valores que são considerados ideais, de acordo com os valores de referência validados pela plataforma ADMETLab 2.0, e em vermelho, aqueles valores que extrapolam os limites máximos e mínimos estipulados pela predição. Valores de referência: massa molar – entre 100 e 600 g/mol; LogP – entre 0 e 3; LogS – entre -4 e 0,5; LogD – entre 1 e 3; Fsp³ - $\geq 0,42$; Doador de H – entre 0 e 12; Receptor de H – entre 0 e 7; TPSA – entre 0 e 140; Ligações Rotacionáveis – entre 0 e 11.

Ambas as moléculas apresentaram valores de peso molecular, TPSA, números de ligações rotacionáveis, de receptores e de doadores de hidrogênio desejáveis para um fármaco em desenvolvimento. No entanto, R2 e R14 apresentaram valores elevados do logaritmo do coeficiente de distribuição n-octanol/água (LogP), mesmo em pH fisiológico (logD 7,4), e valores do logaritmo de solubilidade aquosa (LogS) e fração de hibridização sp³ (Fsp³) reduzidos.

De acordo com a regra dos 5 de Lipinski (RO5)³⁶, para predição de boa biodisponibilidade oral de compostos ativos, deve-se levar em consideração 4

características físico-químicas: peso molecular (≤ 500 g/mol), logP (≤ 5), presença de doadores de Hidrogênio (≤ 10) e de receptores de hidrogênio (≤ 5). São consideradas como moléculas passíveis de boa biodisponibilidade oral aquelas que apresentarem pelo menos dois destes parâmetros dentro dos valores esperados. Apesar de apresentar elevado valor de LogP, a molécula R2 se encontra dentro dos parâmetros exigidos pela RO5 para predição de boa biodisponibilidade oral, por apresentar valores de peso molecular, números de doadores e receptores de hidrogênio dentro dos limites desejáveis (**Tabela 3**). Já a molécula R14, além de apresentar um valor elevado de LogP, também possui altos valores de peso molecular e número de doadores de hidrogênio, o que compromete seu perfil de *Druglikeness* segundo os critérios de Lipinski.

Tabela 3 – Score de *Druglikeness* para as moléculas R2 e R14, de acordo com a regra dos 5 de Lipinski.

	R2	R14	LIPINSKI
Peso Molecular	457,18	547,21	≤ 500
LogP	5,881	5,276	≤ 5
Doador H	1	1	≤ 10
Receptor H	5	8	≤ 5
Druglikeness	SIM	NÃO	

5.3.3 Absorção

Foram também obtidos, por análises *in silico*, os valores preditivos para os parâmetros de absorção dos compostos-teste (**Figura 7**).

	Caco-2	MDCK	Inibidor PgP	Substrato PgP	HIA	F20	F30
R2	-5,017	0,000009	0,996	0,005	0,011	0,044	0,075
R14	-5,138	0,000014	1,000	0,885	0,006	0,002	0,201

Figura 7. Parâmetros de absorção preditivos para as moléculas R2 e R14. Estão representados com a cor verde valores que são considerados ideais, de acordo com os valores de referência validados pela plataforma ADMETLab 2.0, e em vermelho, aqueles valores que extrapolam os limites máximos e mínimos estabelecidos. Valores de referência: Permeabilidade em Caco-2: $> -5,15$ log cm/s; Permeabilidade em MDCK: $> 0,000002$ cm/s; Probabilidade de Inibição e Substrato de Glicoproteína-P (PgP): entre 0 e 0,3; Absorção Intestinal Humana (HIA): entre 0 e 0,3. Biodisponibilidades orais F20% e F30%: entre 0 e 0,3.

Os parâmetros analisados foram: permeabilidade *in vitro* nas linhagens Caco-2 e Madin-Darby canine kidney (MDCK), probabilidade de as moléculas inibirem ou servirem de substrato para a Glicoproteína-P, além de valores preditivos de Absorção Intestinal Humana (HIA) e Biodisponibilidade Oral F20% e F30%.

Em geral, as moléculas R2 e R14 apresentaram valores preditivos desejáveis de absorção *in vitro* pelas linhagens Caco-2 e MDCK, o que possivelmente influenciou em valores preditivos desejáveis para HIA, e para a biodisponibilidade oral nas porcentagens de F20% e F30%.

Como já visto nos resultados de predição de alvos moleculares dos compostos em estudo, ambas as moléculas apresentaram como um de seus alvos mais prováveis a glicoproteína P-1, pertencente à classe das proteínas do transporte ativo primário. Assim, tanto a molécula R2 quanto a molécula R14, são possíveis inibidoras de Pgp-1, e a molécula R14 também apresentou elevada probabilidade de servir como substrato para esta proteína.

5.3.4 Distribuição

Quanto aos parâmetros de distribuição fornecidos pela plataforma ADMETLab 2.0, foram analisados os perfis de Ligação a Proteínas Plasmáticas (ou *Plasma Protein Binding* - PPB), Volume de Distribuição (VD), Penetração em Barreira Hematoencefálica (ou *Blood-Brain Barrier* BBB) e Fração do Fármaco não ligado (Fu) (**Figura 8**).

	PPB	VD	BBB Penetration	Fu
R2	102,5	0,738	0,083	0,756
R14	99,81	0,363	0,005	0,745

Figura 8. Parâmetros de distribuição preditivos para as moléculas R2 e R14. Estão representados com a cor verde valores que são considerados ideais, de acordo com os valores de referência validados pela plataforma ADMETLab 2.0, e em vermelho, aqueles valores que extrapolam os limites máximos e mínimos estabelecidos. Valores de referência: Ligação a Proteínas Plasmáticas (PPB) - <90%; Volume de Distribuição (VD) - entre 0,04 e 20 L/kg; Penetração em Barreira Hematoencefálica – entre 0 e 0,3; Fração do fármaco não ligado (Fu) - ≥ 5%.

Ambas as moléculas apresentaram probabilidades elevadas de bom volume de distribuição e baixa probabilidade de ultrapassagem da barreira hematoencefálica. No entanto, as moléculas R2 e R14 mostraram valores preditivos elevados de porcentagem de ligação a proteínas plasmáticas (PPB), e possíveis valores reduzidos de fração do fármaco não ligado a proteínas (Fu).

5.3.5 Metabolismo

As análises *in silico* de predição das moléculas R2 e R14 inibirem as isoenzimas do citocromo P450 (CYP450) ou de servirem como substrato para estas enzimas estão disponibilizadas na **Figura 9**.

	Inibidor					Substrato				
	Cyp1A2	Cyp2C19	Cyp2C9	Cyp2D6	Cyp3A4	Cyp1A2	Cyp2C19	Cyp2C9	Cyp2D6	Cyp3A4
R2	+++	+++	++	-	++	-	-	+++	++	-
R14	++	+++	++	+	++	+++	-	+++	+++	+++

Figura 9. Probabilidade das moléculas R2 e R14 inibirem ou servirem como substrato para as isoenzimas Cyp1A2, Cyp2C19, Cyp2C9, Cyp2D6, Cyp3A4 do citocromo p450. Estão representados com a cor verde, os citocromos que apresentam probabilidade negativa de interagirem com as moléculas estudadas (seja por inibição dos citocromos pela molécula ou seja pelo uso das moléculas como substrato pelo citocromo) e em vermelho, aqueles apresentam probabilidade positiva de interagirem com os compostos-teste.

Ambas as moléculas mostraram elevada probabilidade de inibirem quase todas as isoenzimas analisadas, com exceção da isoenzima Cyp2D6 para a molécula R2. Tanto a molécula R2 quanto a molécula R14 também apresentam elevada probabilidade de servirem como substrato para as enzimas Cyp2CP e Cyp2D6, e o mesmo ocorreu para as isoenzimas Cyp1A2 e Cyp3A4 para a molécula R14. Já a isoenzima Cyp2C19 possivelmente não representa possibilidade de interação enzima-substrato com as moléculas estudadas.

5.3.6 Excreção

Os parâmetros analisados *in silico* referentes à excreção das moléculas analisadas foram os de depuração (ou *Clearance*) e tempo de meia-vida ($T_{1/2}$) (**Figura 10**).

	Clearance	T 1/2
R2	2,578	0,116
R14	0,005	0,745

Figura 10. Parâmetros de eliminação preditivos para as moléculas R2 e R14. Estão representados com a cor verde, valores que são considerados ideais, de acordo com os valores de referência validados pela plataforma ADMETLab 2.0, e em vermelho, aqueles valores que extrapolam os limites máximos e mínimos estipulados. Valores de referência: *Clearance* - ≥ 5 ml/min/kg; Tempo meia-vida (probabilidade de tempo de meia-vida ≤ 3) - entre 0 e 0,3.

Ambas as moléculas apresentaram valores preditivos de *Clearance* reduzidos, o que influencia em dificuldades de excreção dessas moléculas, tanto por via renal, quanto por via hepática. Já quanto ao tempo de meia-vida, a molécula R2 mostrou baixa probabilidade de um tempo de meia-vida reduzido (≤ 3), enquanto a molécula R14 mostrou elevada probabilidade de um tempo de meia-vida reduzido.

5.3.7 Toxicidade

Os parâmetros de toxicidade analisados *in silico* foram: bloqueio ao gene humano relacionado ao éter-a-go-go (hERG); hepatotoxicidade (HT); Lesão Hepática Induzida por Drogas (ou *Drug-induced liver injury* - DILI); teste AMES de mutagenicidade; carcinogenicidade; corrosão e irritabilidade aos olhos; toxicidades respiratória e oral; e sensibilidade da pele (**Figura 11**).

	hERG	HT	DILI	AMES	Carcinogenicidade	Corrosão Olhos	Irritabilidade Olho	Toxicidade Respiratória	Toxicidade Oral	Sensibilidade Pele
R2	0,315	0,311	0,946	0,915	0,771	0,003	0,945	0,552	0,045	0,626
R14	0,458	0,205	0,951	0,887	0,802	0,003	0,419	0,769	0,054	0,162

Figura 11. Parâmetros de toxicidade preditivos para as moléculas R2 e R14. Os valores representam a probabilidade (de 0 a 1) dos compostos apresentarem os parâmetros de toxicidade apresentados. Valores de Referência: 0-0,3: excelente (verde); 0,3-0,7: médio (amarelo); 0,7-1,0: ruim (vermelho).

Ambas as moléculas apresentaram moderados riscos de bloqueio de hERG, além de elevados riscos de hepatotoxicidade (levando em consideração parâmetros DILI), mutagenicidade AMES e carcinogenicidade. Os compostos também apresentaram baixos riscos de corrosão aos olhos e toxicidade oral. As probabilidades de hepatotoxicidade pelo parâmetro HT foi de baixo, para a molécula R14, a moderado, para a molécula R2. As moléculas também apresentarem probabilidades moderada (R14) e elevada (R2) de irritabilidade aos olhos e foram também encontrados riscos moderado e elevado de toxicidade respiratória para as moléculas R2 e R14, respectivamente, além de riscos moderado (R2) ou baixo (R14) de sensibilidade da pele.

5.4 Níveis de citotoxicidade e seletividade

Os níveis de citotoxicidade dos compostos R2 e R14 (**Figura 12**), assim como dos quimioterápicos (controles positivos) 5-FU (**Figura 13**), Cisplatina (**Figura 14**) e Paclitaxel (**Figura 15**) foram determinados por meio da obtenção de curvas dose-resposta.

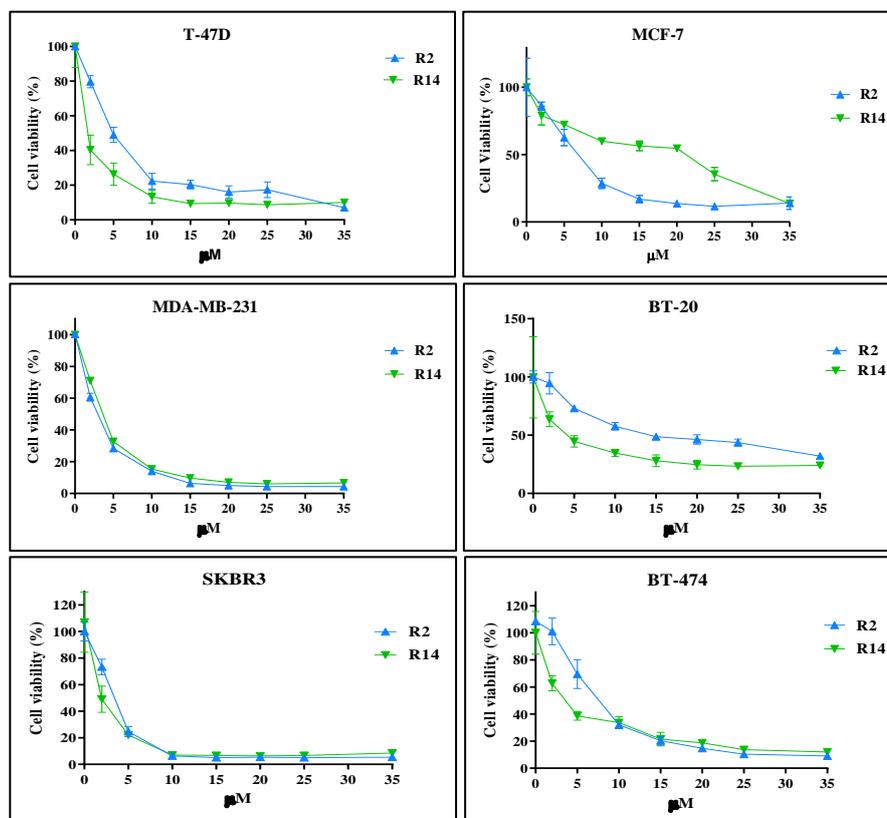


Figura 12. Gráficos das curvas dose-resposta dos compostos R2 e R14 obtidas para as linhagens dos subtipos luminal A (T-47D e MCF-7), triplo-negativo (BT-20 e MDA-MB-231), luminal B (BT-474) e HER2 superexpresso (SKBR3).

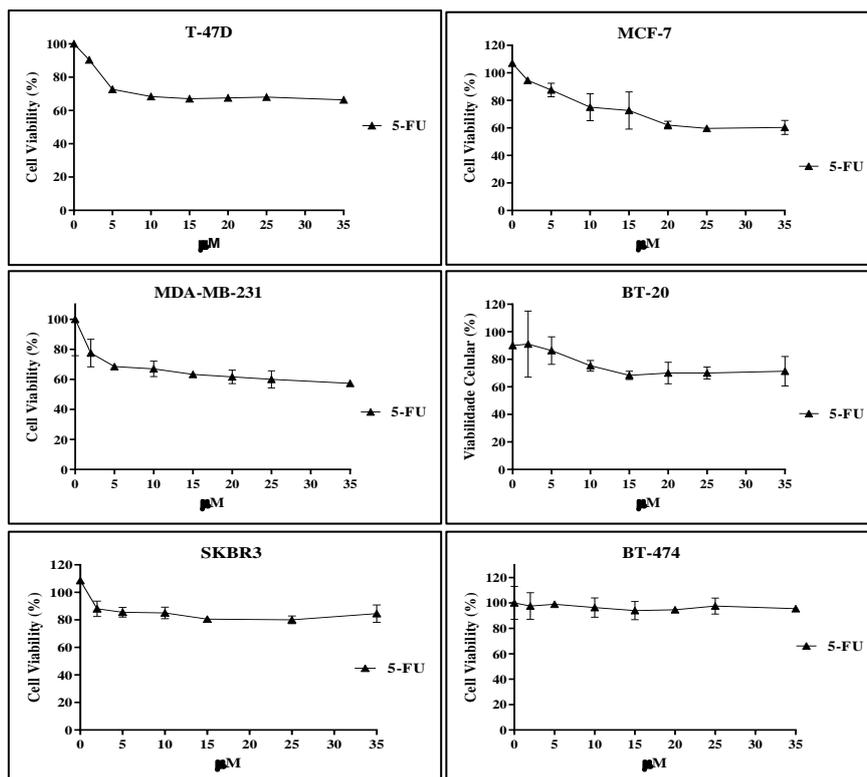


Figura 13. Gráficos das curvas dose-resposta do quimioterápico 5-FU obtidas para as linhagens dos subtipos luminal A (T-47D e MCF-7), triplo-negativo (BT-20 e MDA-MB-231), luminal B (BT-474) e HER2 superexpresso (SKBR3).

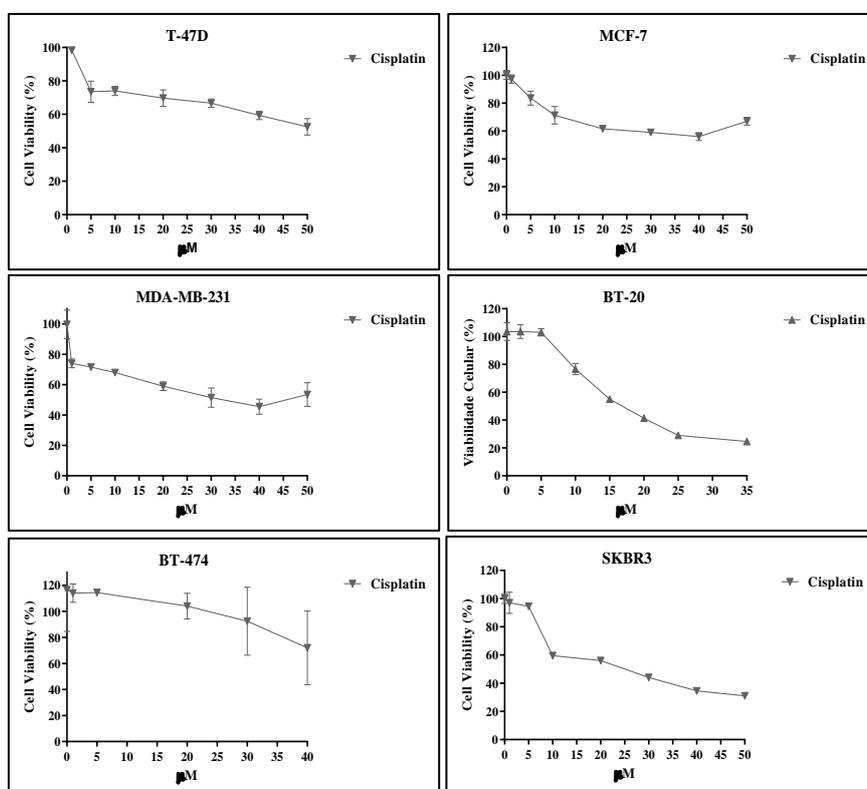


Figura 14. Gráficos das curvas dose-resposta do quimioterápico Cisplatina obtidas para as linhagens dos subtipos luminal A (T-47D e MCF-7), triplo-negativo (BT-20 e MDA-MB-231), luminal B (BT-474) e HER2 superexpresso (SKBR3).

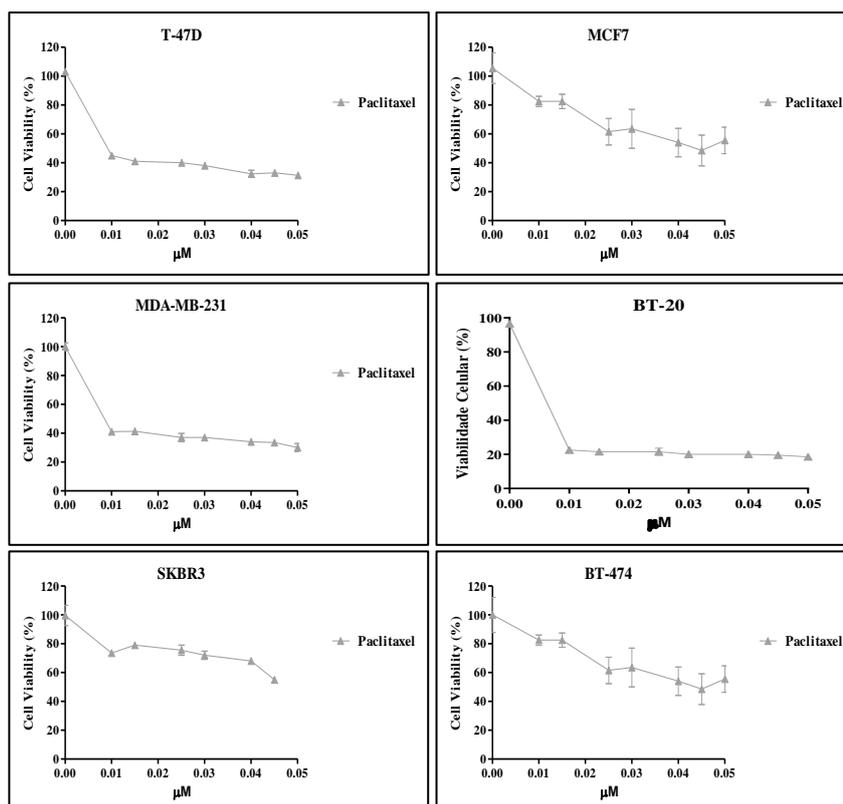


Figura 15. Gráficos das curvas dose-resposta do quimioterápico Paclitaxel obtidas para as linhagens dos subtipos luminal A (T-47D e MCF-7), triplo-negativo (BT-20 e MDA-MB-231), luminal B (BT-474) e HER2 superexpresso (SKBR3).

Por meio dos valores de IC_{50} dos compostos R2 e R14 (**Tabela 4**) e dos controles positivos 5-FU, Cisplatina e Paclitaxel (**Tabela 5**) foi possível calcular os valores de IS para cada linhagem tumoral testada em comparação ao IC_{50} de linhagens não tumorais (HFF-1 e HaCat).

Tabela 4. Valores de IC_{50} das moléculas R2 e R14 para cada linhagem, e valores IS em relação às linhagens não tumorais HFF-1 e HaCat.

Linhagens	IC_{50} (μ M)	DP	Índice de Seletividade (IS)	
			HFF-1	HaCat
R2				
T-47D	4,07	$\pm 1,28$	1,31	2,64
MDA-MB-231	2,93	$\pm 0,35$	1,83	3,68
SKBR3	3,63	$\pm 0,45$	1,47	2,97
BT-474	8,63	$\pm 2,91$	0,62	1,25
BT-20	17,87	$\pm 2,70$	0,30	0,60
MCF-7	7,52	$\pm 2,69$	0,71	1,43
HFF-1	5,35	$\pm 0,38$		
HaCat	10,77	$\pm 2,46$		

Tabela 4 (Cont.). Valores de IC₅₀ das moléculas R2 e R14 para cada linhagem, e valores IS em relação às linhagens não tumorais HFF-1 e HaCat.

R14				
T-47D	1,21	± 0,04	6,96	9,27
MDA-MB-231	2,45	± 1,31	3,43	4,57
SKBR3	2,67	± 2,55	3,15	4,2
BT-474	5,72	± 2,04	1,47	1,96
BT-20	6,85	± 2,17	1,23	1,63
MCF7	2,01	± 2,69	4,19	5,58
HFF-1	8,40	± 0,42		
HaCat	11,19	± 2,66		

DP: desvio padrão

Tabela 5. Valores de IC₅₀ dos controles positivos 5-FU, cisplatina e paclitaxel para cada linhagem, e valores IS em relação às linhagens não tumorais HFF-1 e HaCat.

Linhagens	IC ₅₀ (µM)	DP	Índice de Seletividade (IS)	
			HFF-1	HaCat
5-FU				
T-47D	54,80	± 11,98	N.D.	N.D.
MDA-MB-231	74,255	± 7,34	N.D.	N.D.
SKBR3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
BT474	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
BT-20	68,82	± 47,77	N.D.	N.D.
MCF7	27,87	± 18,83	N.D.	N.D.
HFF-1	N.D.	N.D.		
HaCat	N.D.	N.D.		
Cisplatina				
T-47D	81,42	± 8,3	0,61	0,31
MDA-MB-231	56,7	± 9,36	0,88	0,45
SKBR3	23,22	± 0,36	2,15	1,10
BT474	41,75	± 6,97	1,07	0,54
BT-20	15,75	± 7,27	3,181	1,62
MCF7	83,94	± 18,52	0,59	0,30
HFF-1	50,11	± 1,83		
HaCat	25,63	± 3,19		
Paclitaxel				
T-47D	0,003	± 0,004	> 10	1,98
MDA-MB-231	0,014	± 0,016	5,95	0,50
SKBR3	0,042	± 0,006	1,21	0,10
BT474	0,03	± 0,027	1,64	0,13
BT-20	2,98 x 10 ⁻⁶	± 3 x 10 ⁻⁶	> 10	> 10
MCF7	0,085	± 0,112	0,94	0,07
HFF-1	0,081	± 0,032		
HaCat	0,007	± 0,001		

DP: desvio padrão; N.D: não determinado.

As linhagens mais sensíveis, que apresentaram valores de IC_{50} inferiores a 5 μM tanto para R2 quanto para R14, foram as linhagens T-47D ($4,07\mu M \pm 1,28$ e $1,21\mu M \pm 0,04$), MDA-MB-231 ($2,93\mu M \pm 0,35$ e $2,45\mu M \pm 1,31$) e SKBR3 ($3,63\mu M \pm 0,45$ e $2,67 \mu M \pm 2,55$). Já as linhagens com sensibilidade intermediária, que apresentaram valores de IC_{50} entre 5 - 10 μM para R2 e R14, foram as linhagens tumorais BT-474 ($8,31 \mu M \pm 2,14$ e $5,79 \mu M \pm 1,94$) e MCF7 ($7,52 \mu M \pm 2,69$ e $5,81 \mu M \pm 2,70$) e a linhagem não tumoral HFF-1 ($5,35\mu M \pm 0,38$ e $8,40\mu M \pm 0,42$). A linhagem tumoral BT-20 apresentou baixa sensibilidade para R2 ($17,63\mu M \pm 2,34$) e sensibilidade intermediária para R14 ($8,55\mu M \pm 6,37$). Já a linhagem que apresentou baixa sensibilidade a R2 e R14 foi a linhagem não tumoral HaCat ($10,77\mu M \pm 2,46$ e $11,19\mu M \pm 2,66$).

As moléculas R2 e R14 apresentaram os maiores índices de seletividade em relação à linhagem HFF-1 para as linhagens T-47D (1,31 e 6,96), MDA-MB-231 (1,83 e 3,43) e SKBR3 (1,47 e 3,15), sendo a molécula R14 mais seletiva, com valores de IS superiores a 2. As moléculas R2 e R14 mostraram o mesmo padrão de seletividade para a linhagem não tumoral HaCat com valores de IS superiores a 2 para as linhagens T-47D (2,64 e 9,27), MDA-MB-231 (3,68 e 4,57) SKBR3 (2,97 e 4,2). A molécula R14 também mostrou elevada seletividade para a linhagem MCF7, tanto em comparação com a linhagem HFF-1 (4,19) quanto com a linhagem HaCat (5,58). Já as linhagens BT-474 e BT-20 apresentaram menores valores de IS tanto em relação à HFF-1, quanto em relação à HaCat, para ambas as moléculas.

Por outro lado, o antimetabólito 5-FU, usado como controle positivo, apresentou apenas valores de IC_{50} superiores a 25 μM tanto para linhagens celulares tumorais quanto para linhagens não tumorais. A maioria das linhagens celulares também foi mais resistente ao agente alquilante cisplatina quando comparado aos compostos R2 e R14, com valores de IC_{50} chegando até 83,94 μM para MCF7. A única exceção foi a linhagem BT-20, que mostrou perfis de sensibilidade semelhantes para cisplatina e R2. Cisplatina também foi seletiva para SKBR3 e BT-20, mas apenas quando comparada à célula não tumoral HFF-1. No entanto, o paclitaxel mostrou alta atividade citotóxica quando comparado aos compostos R2 e R14 e outros quimioterápicos, com valores médios de IC_{50} abaixo de 0,1 μM .

A comparação das médias dos valores de IC₅₀ dos compostos-teste com os valores de IC₅₀ encontrados para os quimioterápicos utilizados como controles-positivos pode ser visualizada na **Figura 16**.

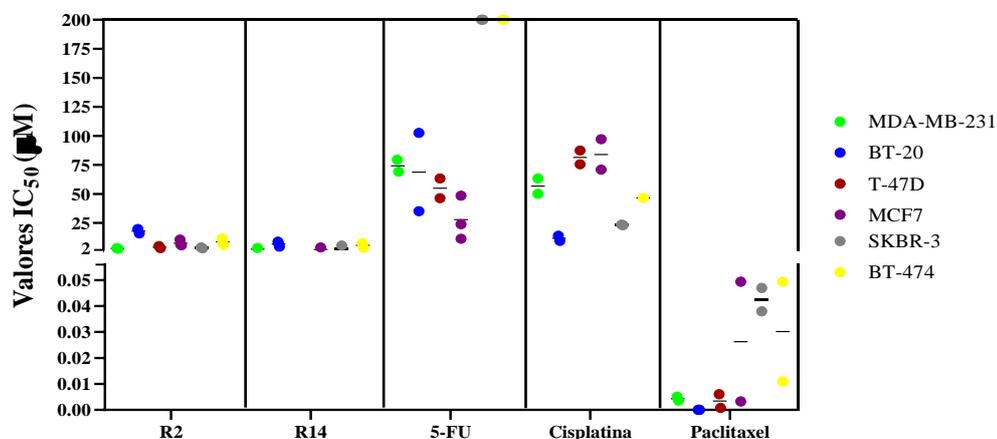


Figura 16. Gráfico de comparação de citotoxicidade entre os compostos R2 e R14 e os quimioterápicos 5-FU, Cisplatina e Paclitaxel. Cada símbolo representa uma réplica de valor de IC₅₀ utilizado para o cálculo da média (representada por traços). Cada cor indica uma linhagem tumoral diferente. Símbolos localizados no limite superior do gráfico, representam valores de IC₅₀ que extrapolaram os limites calculáveis pelo programa estatístico.

5.5 Avaliação da citotoxicidade dos compostos em cultura 3D

O efeito citotóxico de R2 e R4 foi então avaliado em cultura 3D usando análise de viabilidade de esferoides. Para isto, esferoides das linhagens MDA-MB-231, T-47D e BT-474 foram tratados com os compostos R2, R14 e 5-FU a 25 µM durante 72 horas, e a viabilidade celular foi obtida por meio do uso de marcadores fluorescentes de viabilidade (calceína) e morte celular (IP) (**Figura 17**).

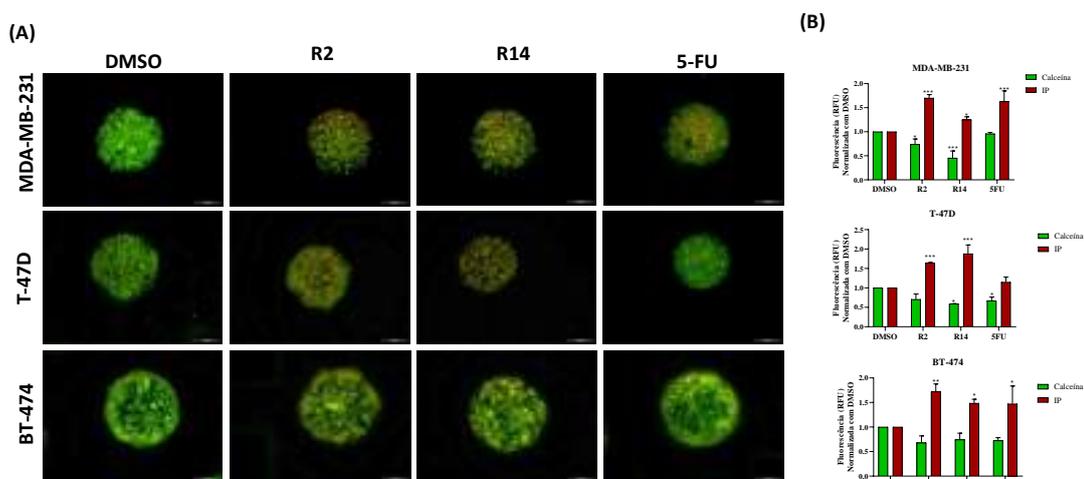


Figura 17. Efeito citotóxico de R2 e R14 em modelo 3D de esferoides. **(A)** Esferoides de cada linhagem celular (MDA-MB-231, T-47D e BT-474) tratados com os compostos R2, R14 e 5-FU a uma concentração de 25 µM por 72 horas, corados com os marcadores fluorescentes Calceína e IP. Imagens analisadas e capturadas em um microscópio de fluorescência invertido sob objetiva de 10x.

(B) Gráficos de barras representando os valores médios de intensidade de fluorescência para Calceína (Verde) e IP (Vermelho) para cada condição de tratamento, normalizados em relação ao controle negativo (DMSO 1%). As barras de erro representam a média \pm desvio padrão de no mínimo dois experimentos independentes. Após análise estatística ANOVA de duas vias com pós-teste de *Dunnet*, foram classificados como diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

Os resultados obtidos em cultura 3D de esferoides mostram que tanto R2 quanto R14 foram capazes de reduzir a viabilidade celular e/ou aumentar a morte celular em esferoides de linhagens celulares de câncer de mama de três subtipos moleculares diferentes, como evidenciado pela quantificação das intensidades fluorescentes de Calceína e IP. O tratamento com R2 levou a um aumento significativo nos níveis de IP em MDA-MB-231 ($1,70 \pm 0,07$, $p = 0,0001$), T-47D ($1,64 \pm 0,012$, $p = 0,001$) e BT-474 ($1,73 \pm 0,15$, $p = 0,004$), enquanto R14 levou a um aumento de IP apenas em T-47D ($1,88 \pm 0,23$, $p = 0,0001$) e BT-474 ($1,49 \pm 0,08$, $p = 0,04$) quando comparado ao controle negativo DMSO. Os níveis de Calceína também foram reduzidos após tratamento com o composto R14 nas linhagens celulares MDA-MB-231 ($0,45 \pm 0,15$, $p = 0,0004$) e T-47D ($0,59 \pm 0,002$, $p = 0,0001$), e após tratamento com R2 em MDA-MB-231 ($0,74 \pm 0,11$, $p = 0,026$).

Considerando que a linhagem MDA-MB-231 representa o subtipo molecular (triplo negativo) com menores opções terapêuticas convencionais, mas que mostrou maiores níveis de sensibilidade e seletividade aos compostos aqui testados, sendo também suscetível aos compostos em modelo de cultura 3D, esta linhagem foi selecionada para as próximas etapas do projeto.

5.6 Análise de ciclo celular

5.6.1 Citometria de Fluxo

Após tratamento com as moléculas R2 e R14 durante 72 horas, a linhagem MDA-MB-231 foi submetida à análise de ciclo celular por citometria de fluxo, utilizando o marcador IP-FITC (intercalante de DNA), e células foram classificadas de acordo com o estágio de ciclo celular em que se encontram (**Figura 18**). Após análise de ciclo celular, foi observado que a molécula R2 em uma concentração de $5\mu\text{M}$ foi responsável por um aumento retenção de células entre as fases G0/G1 ($85,3\% \pm 4,31$; $p < 0,0001$) e redução de células em fase S ($5,3\% \pm 1,5$; $p = 0,0479$), quando comparado ao controle negativo DMSO (G0/G1: $74,8\% \pm 1,56$; S: $9,7 \pm 1,6$), enquanto o quimioterápico 5-FU promoveu

uma redução de células na fase G0/G1 ($68,4\% \pm 4,34$; $p = 0,0003$) e retenção de células em fase S ($14\% \pm 0,7$; $p = 0,479$).

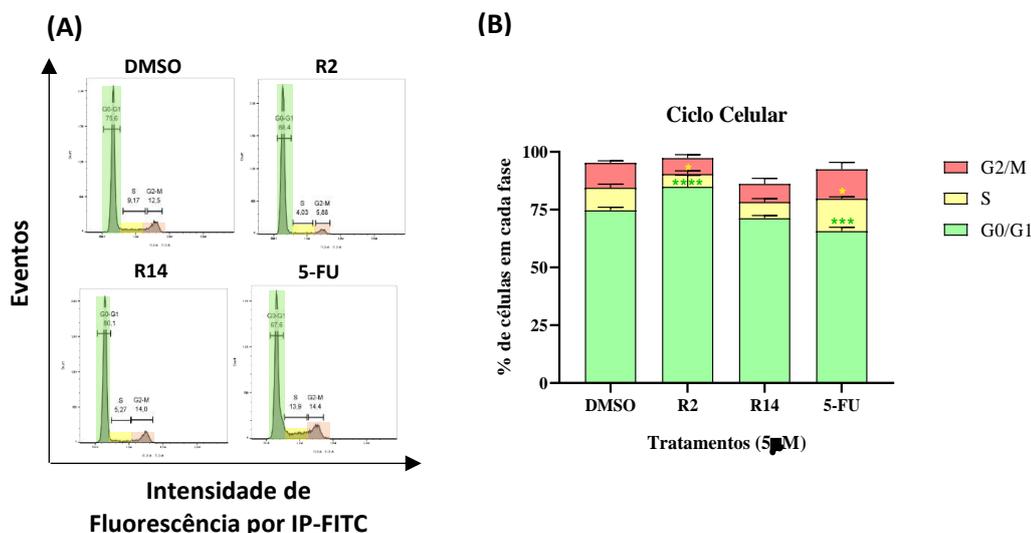


Figura 18. Análise de ciclo celular por citometria de fluxo. **(A)** Gráficos obtidos após análise de ciclo celular da linhagem MDA-MB-231 em diferentes condições de tratamento (DMSO, R2, R14 e 5-FU), por citometria de fluxo. O eixo X refere-se à intensidade de fluorescência por IP-FITC e o eixo Y refere-se à porcentagem de eventos obtidos. As fases do ciclo celular foram classificadas em G0/G1, S e G2/M; quanto maior a intensidade de fluorescência de IP-FITC, maior o conteúdo de DNA da célula, e, portanto, mais avançada a célula se encontra no ciclo **(B)** Classificação das células de acordo com a fase do ciclo celular após 72 horas de tratamento. As barras de erro representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. Após análise estatística ANOVA de duas vias com pós-teste de *Dunnett*, foram classificados como diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

5.6.2 Análise de modulação de fatores associados a progressão do ciclo celular

Para validação dos resultados obtidos por citometria, foi realizada análise do conteúdo das proteínas Timidina Quinase e Geminina da linhagem MDA-MB-231 após diferentes condições de tratamento (DMSO, R2, R14 e 5-FU), utilizando a técnica de *western blotting* **(Figura 19)**.

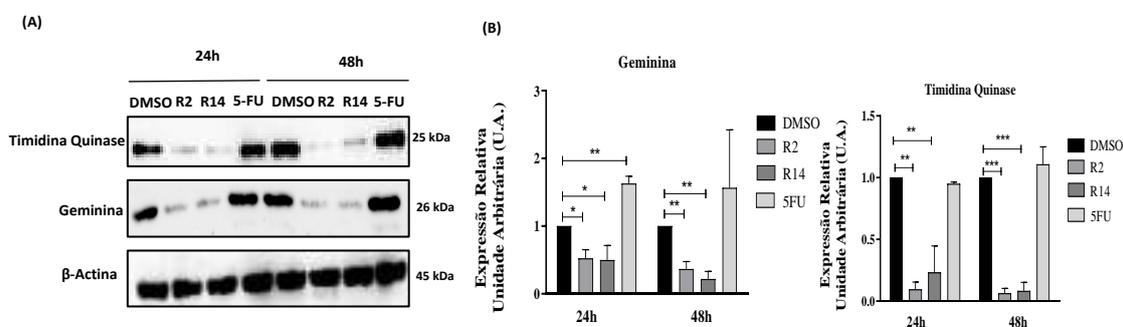


Figura 19. Análise por *western blotting* dos conteúdos de Geminina e Timidina Quinase. **(A)** Imagens do conteúdo de Timidina Quinase e Geminina por *western blotting* após tratamento com os compostos a 5 μ M durante os períodos de 24 e 48 horas, utilizando β -actina como controle

endógeno. **(B)** Quantificação dos resultados obtidos em expressão relativa de Unidade Arbitrária (U.A.), após normalização com os valores de β -actina e com o controle negativo (DMSO). As barras de erro representam a média \pm desvio padrão de no mínimo dois experimentos independentes. Após análise estatística ANOVA de duas vias com pós-teste de Dunnet, foram classificados como diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

Após quantificação do conteúdo de Timidina Quinase, foi observado que ambas as moléculas R2 e R14 promoveram uma redução da expressão desta proteína em relação ao controle negativo, nos tempos de 24 horas ($p < 0,01$; R2: $0,095 \pm 0,06$; R14: $0,234 \pm 0,214$) e 48 horas ($p < 0,001$; R2: $0,065 \pm 0,038$; R14: $0,083 \pm 0,070$), enquanto o controle positivo 5-FU demonstrou perfil similar de expressão de Timidina Quinase em relação ao DMSO.

A análise da expressão de Geminina após o tratamento com os compostos R2 e R14, demonstrou reduções significativas após 24 horas ($p < 0,05$; R2: $0,523 \pm 0,128$; R14: $0,498 \pm 0,216$) e 48 horas de tratamento ($p < 0,01$; R2: $0,366 \pm 0,112$; R14: $0,218 \pm 0,112$). Já após o tratamento com 5-FU após 24h, levou a um aumento significativo ($p < 0,01$) da expressão de geminina ($1,629 \pm 0,107$) em relação ao controle negativo.

O progresso do ciclo celular depende principalmente da ativação dos complexos de Ciclina e Quinases Dependentes de Ciclina (CDKs). Os complexos ciclina D-CDK4/CDK6 e ciclina E-CDK2 desempenham um papel importante durante o ponto de checagem do ciclo celular G1, ativando o fator de transcrição E2F, o que leva à expressão de genes relacionados à proliferação celular mediados por esse fator³⁹. Dado que os compostos R2 e R14 estão prevenindo a progressão do ciclo celular da fase G0/G1 para a fase S, investigamos também se algumas dessas proteínas poderiam estar servindo como alvos potenciais para R2 e R14 por meio de análise por *western blotting* (**Figura 20**).

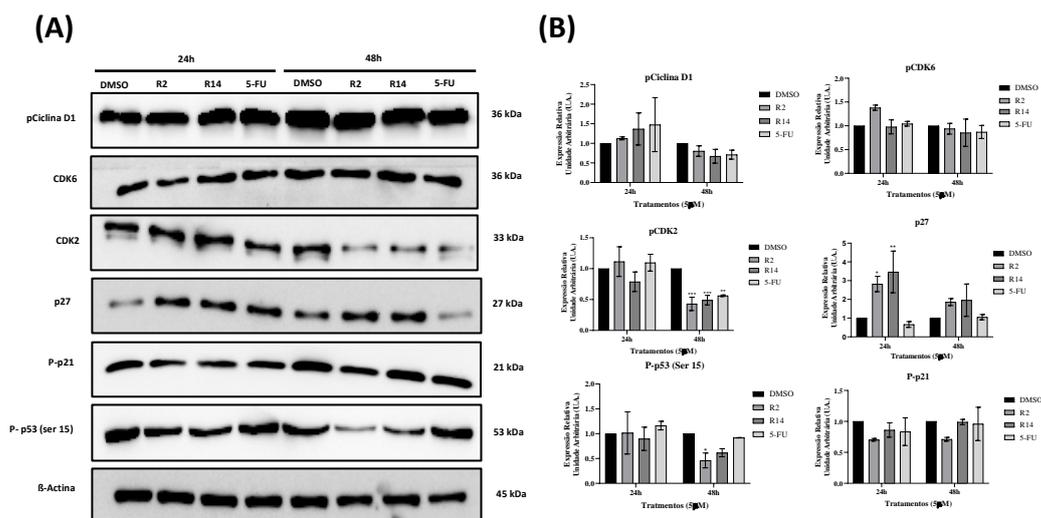


Figura 20. Análise por *western blotting* dos conteúdos de inibidores de CDK (CDKIs), CDKs e Ciclina D1. **(A)** Imagens de *western blotting* do conteúdo proteico dos inibidores de CDK (P-p53, P-p21 e p27), CDKs (CDK 2 e CDK 6), e Ciclina D1, após 24 e 48 horas de tratamento com os compostos R2, R14 e 5-FU a uma concentração de 5 μ M. β -Actina foi usada como controle endógeno. **(B)** Quantificação por densitometria das bandas de *western blotting* normalizadas em relação ao controle negativo DMSO. As barras de erro representam a média \pm desvio padrão de no mínimo dois experimentos independentes. Após análise estatística ANOVA de duas vias com pós-teste de *Dunnet*, foram classificados como diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

Foi observado que não houve diferenças significativas nos níveis de expressão de ciclina D1 e CDK6 após 24 e 48 horas de tratamento com R2 e R14 a uma concentração de 5 μ M. No entanto, os níveis de CDK2 foram consideravelmente reduzidos após 48 horas de tratamento com ambos os compostos (R2: $0,43 \pm 0,108$, $p = 0,0002$; R14: $0,49 \pm 0,078$, $p = 0,0006$) e com 5-FU ($0,56 \pm 0,012$, $p = 0,0047$).

Foram também analisadas as expressões dos inibidores CDK (CDKIs) p27, p21 e p53. Os resultados mostraram significativo aumento de expressão de p27 após 24 horas de tratamento com os compostos R2 ($2,82 \pm 0,410$; $p = 0,0285$) e R14 ($3,46 \pm 1,112$; $p = 0,0052$). R2 foi ainda responsável por reduzir significativamente os níveis de p53 após 48 horas de tratamento ($0,46 \pm 0,149$, $p = 0,046$), e ambos os compostos promoveram discretas reduções nos níveis de p21 após 24 e 48 horas de tratamento, embora essas alterações não tenham sido estatisticamente significativas.

5.7 Análise de modulação de vias proliferativas

Para início da compreensão de possíveis mecanismos envolvidos na parada de ciclo celular desencadeada pelos compostos R2 e R14, foi realizada uma análise de modulação das principais vias proliferativas da célula, utilizando os kits de arranjos

proteicos *phopho-MAPK array* (**Figura 21**) e *phopho-RTK array* (**Figura 22**). Estes ensaios permitem verificar se as moléculas são responsáveis pelo aumento ou redução da expressão das formas ativas de fatores associados à proliferação celular, exemplificados por RTKs e MAP Quinases. Para isso, a linhagem MDA-MB-231 foi tratada com as moléculas R2 e R14 durante 24 horas, e submetida aos ensaios de acordo com as instruções do fabricante.

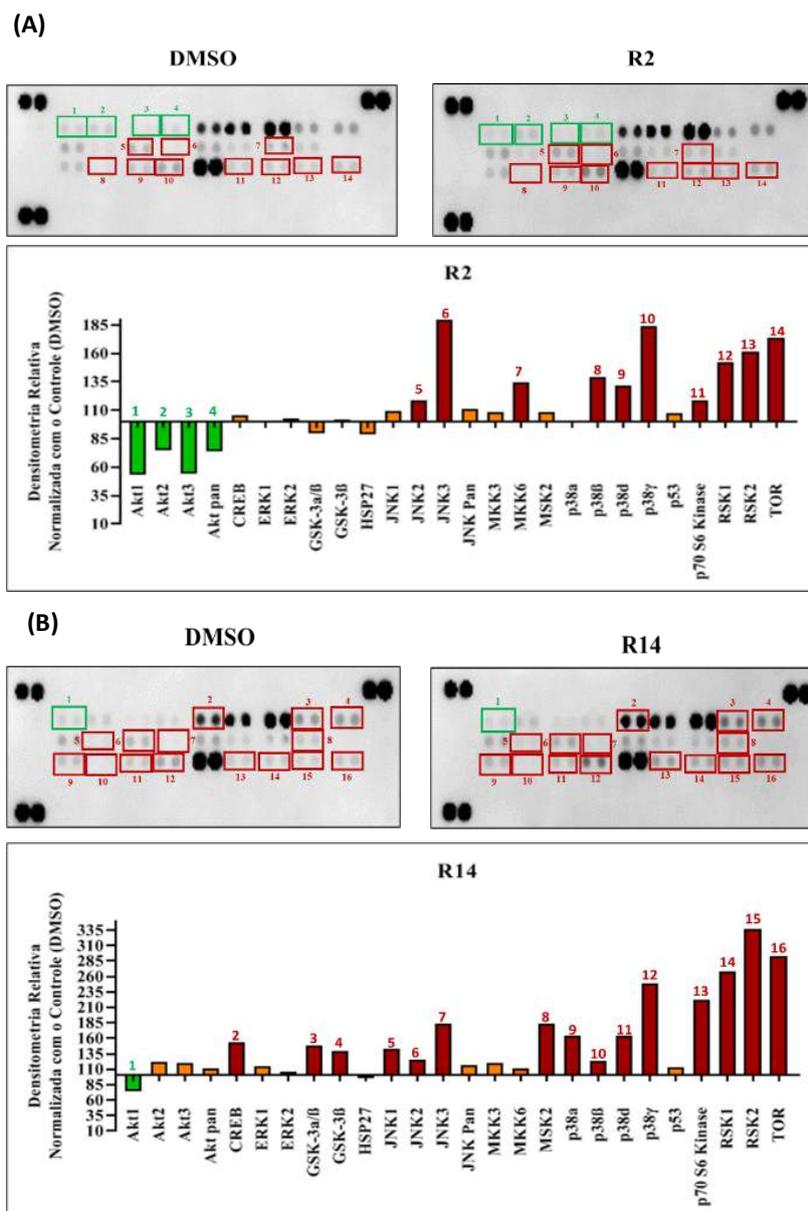


Figura 21. *Phopho-MAPK array*. **(A)** Análise de alteração da expressão da forma ativa de fatores relacionados à via das MAP Quinases após tratamento R2, em comparação ao controle negativo DMSO; **(B)** Análise de alteração da expressão da forma ativa de fatores relacionados à via das MAP Quinases após tratamento R14, em comparação ao controle negativo DMSO; As barras na cor verde representam redução superior a 20% da expressão em relação ao DMSO; barras na cor laranja representam redução ou aumento em até 20% da expressão em relação ao DMSO; já as barras na cor vermelha representam aumento superior a 20% da expressão em relação ao DMSO.

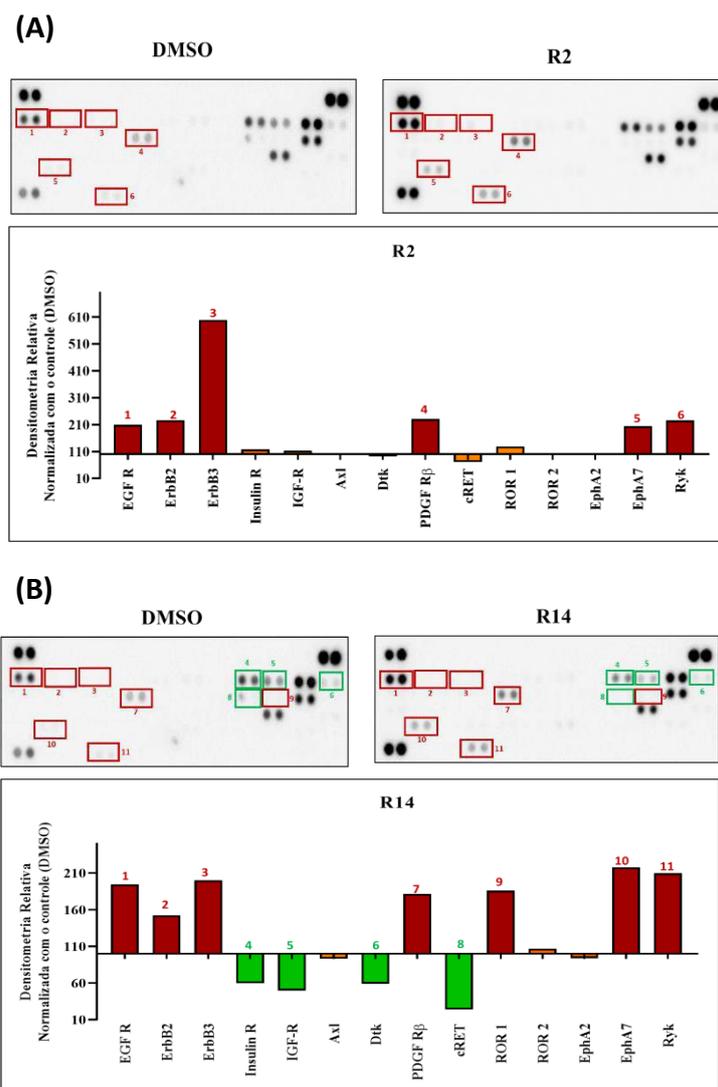


Figura 22. Phospho-RTK array (A) Análise de alteração da expressão da forma ativada de RTKs após tratamento com R2 em comparação ao controle negativo DMSO; **(B)** Análise de alteração da expressão da forma ativada de RTKs após tratamento com R14 em comparação ao controle negativo DMSO. As barras na cor verde representam redução superior a 20% da expressão em relação ao DMSO; barras na cor laranja representam redução ou aumento em até 20% da expressão em relação ao DMSO; já as barras na cor vermelha representam aumento superior a 20% da expressão em relação ao DMSO.

A molécula R2, em comparação ao controle negativo (DMSO), foi responsável pelo aumento de expressão de JNK (nas isoformas 2 e 3), MKK6, p38 (nas isoformas β , δ e γ), p 70 S6 Quinase, RSK (nas isoformas 1 e 2) e mTOR, e pela redução da expressão de Akt (nas isoformas 1, 2, 3 e pan) (**Figura 21-A**). Já a molécula R14 promoveu o aumento da expressão de GSK-3 (nas isoformas β e α/β), CREB, JNK (nas isoformas 1, 2 e 3), MSK2, p38 (nas isoformas α , β , δ e γ), p 70 S6 Quinase, RSK (nas isoformas 1 e 2) e mTOR e pela redução da expressão de Akt1 (**Figura 21-B**).

Após análise de modulação de RTKs, foi observado que, em comparação ao DMSO, a molécula R2 foi responsável pelo aumento das expressões de EGFR, ErbB (nas isoformas 2 e 3), PDGF R β , EphA7 e RyK (**Figura 22-A**). Já a molécula R14 apresentou perfil similar de expressão de RTKs à molécula R2, no entanto também promoveu aumento da expressão de ROR1, e redução da expressão dos receptores de Insulina, IGF-I, Dtk e cRet (**Figura 22-B**).

Alguns dos resultados obtidos nos ensaios de arranjos proteicos foram então validados por *western blotting*, em que foram analisados os conteúdos de ERK, AKT e JNK, em suas formas fosforiladas e totais, na linhagem MDA-MB-231 após o tratamento com os compostos R2 e R14 (**Figura 23**).

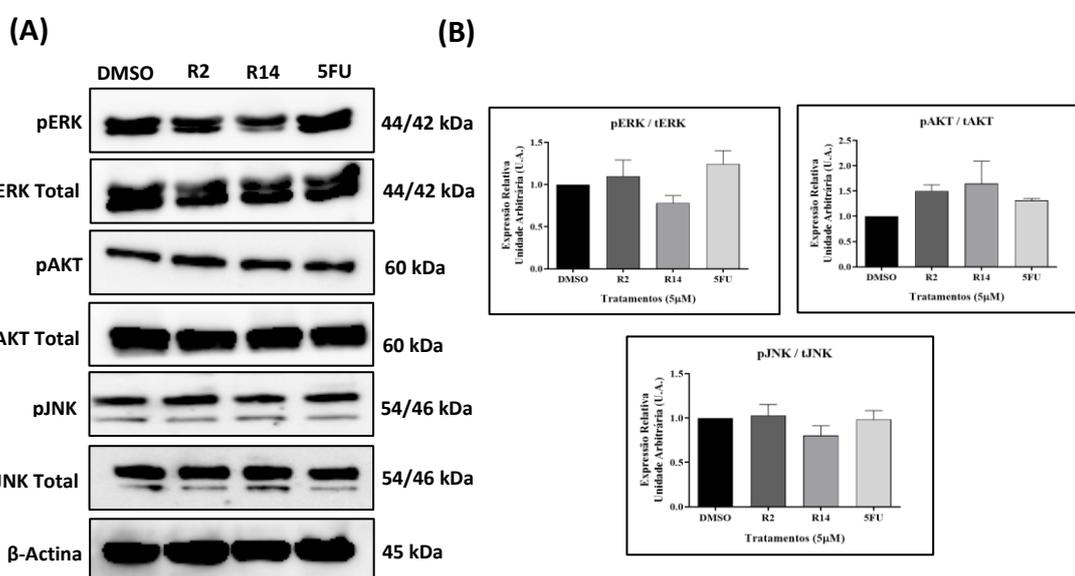


Figura 23. Análise por *western blotting* do conteúdo proteico das MAPKs ERK, AKT e JNK. **(A)** Imagens de *western blotting* do conteúdo proteico da linhagem MDA-MB-231 por após o tratamento com os compostos R2, R14 e 5-FU na concentração de 5 μ M por 2 horas, após privação de nutrientes e posterior estimulação da ativação das vias das MAPKs por EGF. Foram realizadas as análises de ERK fosforilado (pERK), ERK total, AKT fosforilado (pAKT), AKT total, JNK fosforilado (pJNK) e JNK total, utilizando β -actina controle endógeno. **(B)** Quantificação dos resultados obtidos em expressão relativa de Unidade Arbitrária (U.A.), após normalização das formas fosforiladas com suas formas totais, com os valores de β -actina e com o controle negativo (DMSO). As barras de erro representam a média \pm desvio padrão de no mínimo dois experimentos independentes. Após análise estatística ANOVA de uma via com pós-teste de *Dunnet*, foi observado que não houve diferenças estatisticamente significativas da expressão das proteínas após o tratamento com os compostos em relação ao controle negativo (DMSO).

Após tratamento da linhagem MDA-MB-231 com os compostos R2, R14 e 5-FU, não foram observadas diferenças significativas da expressão das proteínas pERK (R2: $p = 0,918$; R14: $p = 0,448$; 5-FU: $p = 0,5341$), pAKT (R2: $p = 0,390$; R14: $p = 0,246$; 5-FU: $p =$

0,684) e pJNK (R2: $p = 0,990$; R14: $p = 0,429$; 5-FU: $p = 0,999$), em comparação ao controle negativo (DMSO).

5.8 Análise de morte celular

5.8.1 Citometria de Fluxo

Após tratamento com as moléculas R2 e R14 nos tempos de 24, 48 e 72 horas, a linhagem MDA-MB-231 foi submetida à análise de morte celular por citometria de fluxo e células foram classificadas de acordo com o estágio de morte celular em que se encontram (**Figura 24**).

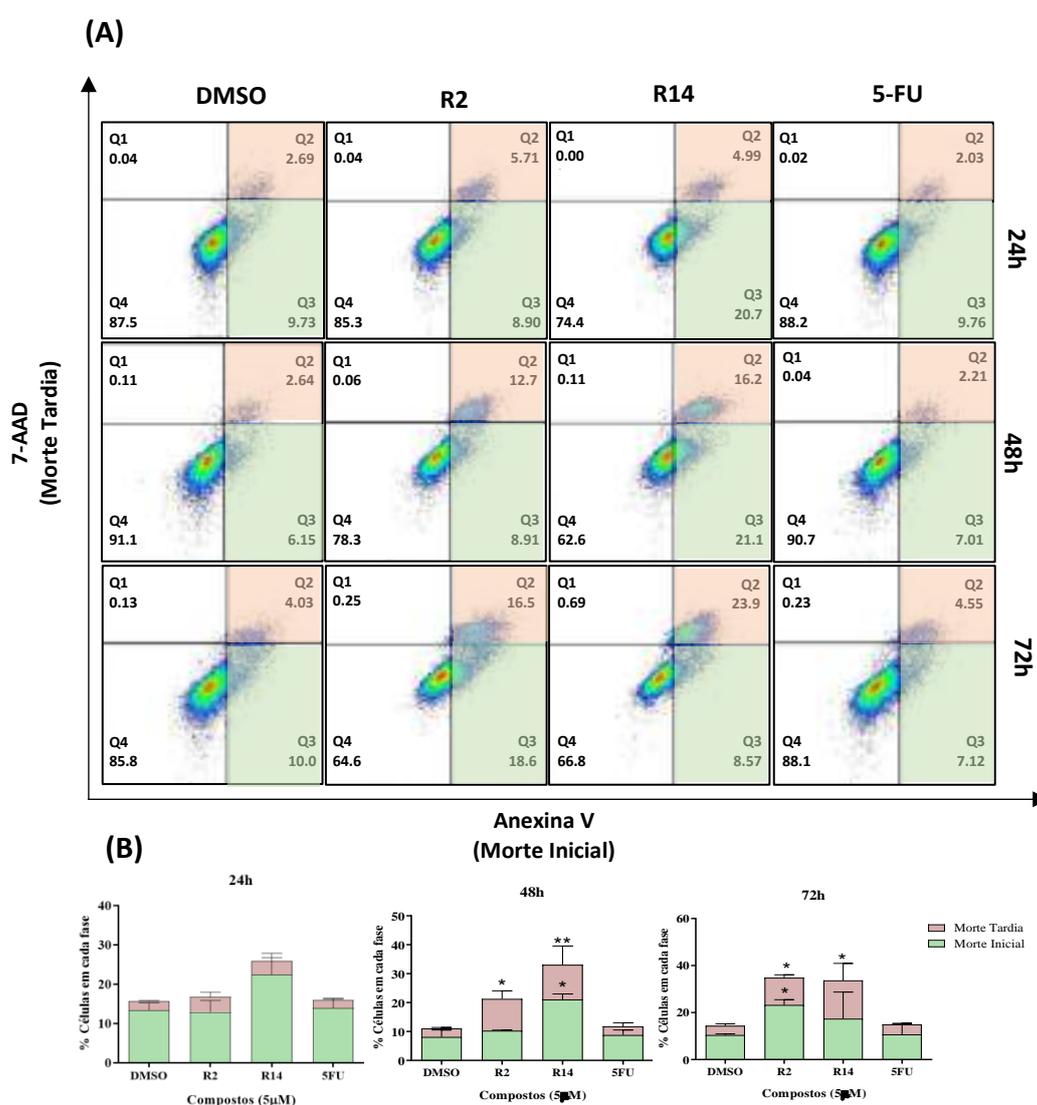


Figura 24. Análise de morte celular por citometria de fluxo. (A) Gráficos obtidos após análise de morte celular da linhagem MDA-MB-231 em diferentes condições de tratamento (DMSO, R2, R14 e 5-FU), por citometria de fluxo. O eixo X refere-se ao eixo de marcação por Anexina V, enquanto o eixo Y representa o eixo de marcação por 7-AAD. O quadrante 1 (Q1) dos gráficos representa células não marcadas (viáveis); o Quadrante 2 (Q2) representa células marcadas apenas com Anexina V (morte inicial); o Quadrante 3 (Q3) representa células duplamente marcadas com Anexina V e 7-AAD

(morte tardia); o Quadrante 4 (Q4) representa células marcadas apenas com 7-AAD (necrose). **(B)** Classificação de células em morte inicial e tardia, após 24, 48 e 72 horas de tratamento. As barras de erro representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. Após análise estatística ANOVA de duas vias com pós-teste de *Dunnett*, foram classificados como diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

Foram classificadas como células em morte inicial, aquelas marcadas com anexina V, marcador que apresenta afinidade à fosfatidilserina, estrutura exposta na membrana celular em seus estágios iniciais de morte. Já as células classificadas em estágio tardio de morte celular, foram aquelas duplamente marcadas com anexina V e 7-AAD, marcador intercalante de DNA, e que, portanto, é capaz de identificar células que apresentam ruptura de membrana nuclear, evento que caracteriza estágios finais de morte celular.

Após análise por citometria de fluxo, foi observado que em 24 horas de tratamento a $5\mu\text{M}$, a molécula R14 promoveu o aumento de células em morte inicial ($22,4\% \pm 5,44$) em relação ao DMSO ($13,4\% \pm 1,83$), ainda que de forma não estatisticamente significativa. Após 48 horas de tratamento, a molécula R2 foi responsável pelo aumento significativo de células em morte tardia ($11\% \pm 2,82$; $p < 0,05$), enquanto a molécula R14 foi responsável pelo aumento de células tanto em morte inicial ($21\% \pm 1,9$; $p < 0,05$), quanto em morte tardia ($12\% \pm 6,5$; $p < 0,01$) em relação ao DMSO (Inicial: $8,1\% \pm 2,4$; tardia: $2,9\% \pm 0,35$). Já após 72 horas de tratamento foi observado que a molécula R2 promoveu aumento de células em morte inicial ($23,2\% \pm 2,26$; $p < 0,05$) e tardia ($11,6\% \pm 1,27$; $p < 0,05$), enquanto a molécula R14 foi responsável pelo aumento de células em morte tardia ($16,3\% \pm 7,2$; $p < 0,05$) em relação ao DMSO (Inicial: $10,4\% \pm 0,49$; tardia: $3,9\% \pm 0,84$).

Nota-se também que o controle positivo 5-FU manteve um mesmo padrão de morte celular inicial e tardia quando comparado ao controle negativo, nos tempos de 24 horas (Inicial: $13,9\% \pm 2,26$; tardia: $2\% \pm 0,49$), 48 horas (Inicial: $8,7\% \pm 1,76$; tardia: $3\% \pm 1,27$) e 72 horas de tratamento (Inicial: $10,7\% \pm 4,52$; tardia: $4,25\% \pm 0,49$).

5.8.2 Análise da modulação das vias de morte celular

Para início da investigação dos mecanismos e vias que desencadearam os processos de morte celular identificados pela metodologia da citometria de fluxo, foi utilizado o kit de arranjos proteicos *Proteome Profile Human Apoptosis Array* (**Figura**

25). Para isso, a linhagem MDA-MB-231 foi tratada com as moléculas R2 e R14 a 5 μ M durante 12 horas, e o ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Este ensaio permite verificar se as moléculas foram responsáveis pelo aumento ou redução da expressão de fatores associados ao processo de morte celular, e permite direcionar a classificação do tipo de morte celular que está sendo desencadeada (morte celular intrínseca ou extrínseca).

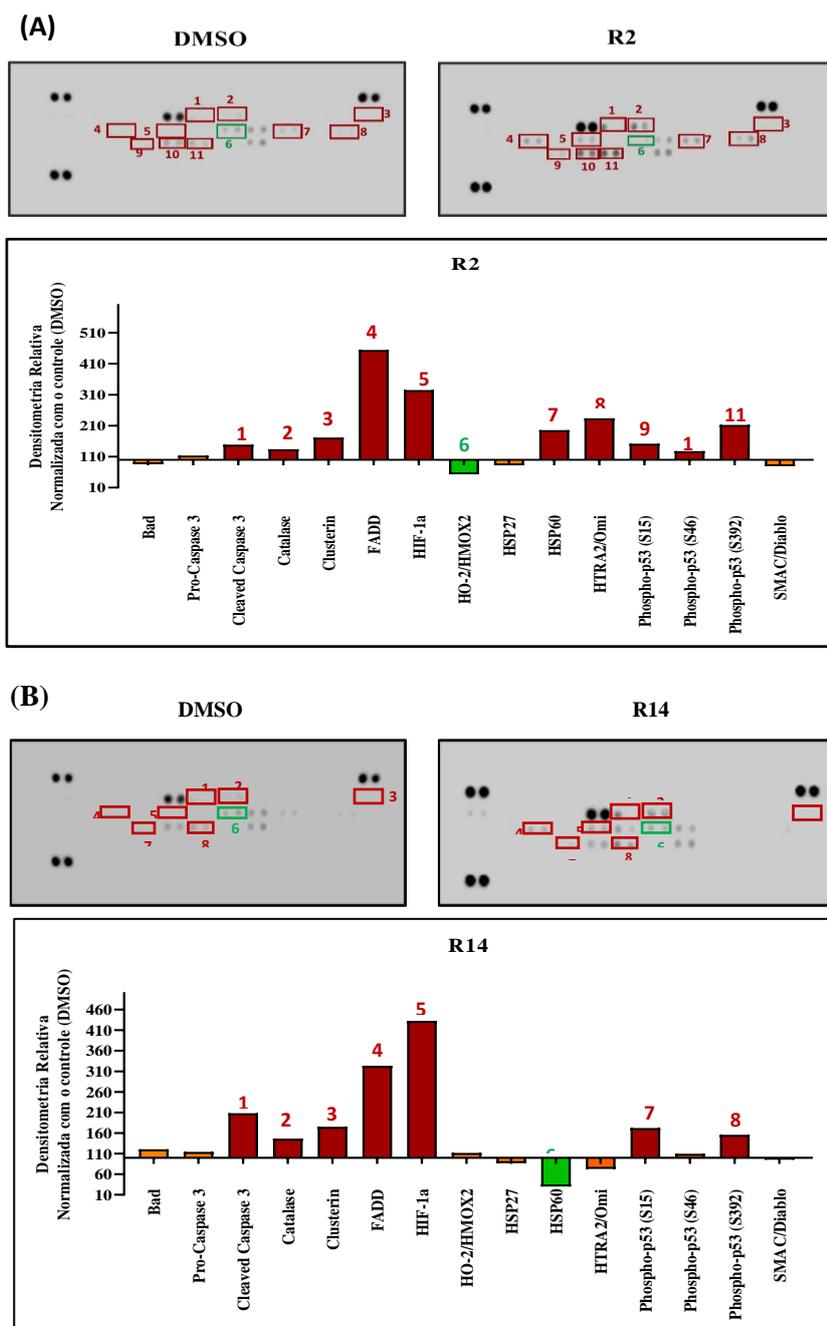


Figura 25. Análise de alteração da expressão de fatores relacionados a morte celular, utilizando o kit *Proteome Profile Human Apoptosis Array*, após tratamento com as moléculas R2 e R14. **(A)** Análise da expressão de fatores relacionados a morte celular após tratamento com R2, em comparação ao DMSO; **(B)** Análise da expressão de fatores relacionados a morte celular após tratamento com R14,

em comparação ao DMSO. As barras na cor verde representam redução superior a 20% da expressão em relação ao DMSO; barras na cor laranja representam redução ou aumento em até 20% da expressão em relação ao DMSO; já as barras na cor vermelha representam aumento superior a 20% da expressão em relação ao DMSO.

Tanto a molécula R2 (**Figura 25-A**) quanto a molécula R14 (**Figura 25-B**), em comparação ao controle negativo (DMSO), foram responsáveis pelo aumento de expressão de Caspase 3 clivada, catalase, clusterina, *Fas-Associating protein with Death Domain* (FADD) e *Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha* (HIF-1 α). R2 ainda levou a aumentos nas expressões de *Heat Shock Protein 60* (HSP60), *High Temperature Requirement protein A2* (HTRA2/Omi), e das formas ativadas da proteína p53, fosforiladas em Serina 15 (S15), serina 46 (S46) e serina 392 (S392), além da redução de Heme-Oxigenase-2 (HO-2/HMOX2). Já a molécula R14 foi responsável pelo aumento das proteínas das formas ativadas da proteína p53 (S15 e S392), e pela redução de HSP60.

Por meio da técnica de *western blotting*, foi também realizada análise dos níveis de caspases 8 (associada à morte celular extrínseca) e 9 (associada à morte celular intrínseca) em suas formas clivadas/ativadas (**Figura 26**). Embora os tratamentos com os compostos R2 e R14 a 5 μ M por 12 horas tenham levado a uma elevação nos níveis de clivagem de ambas as caspases 8 (R2: $2,57 \pm 0,24$; R14: $2,73 \pm 0,016$) e 9 (R2: $1,49 \pm 0,44$; R14: $1,85 \pm 1,31$) em comparação com o controle negativo, as diferenças foram estatisticamente significativas apenas para a caspase 8 (R2: $p = 0,0022$; R14: $p = 0,0015$).

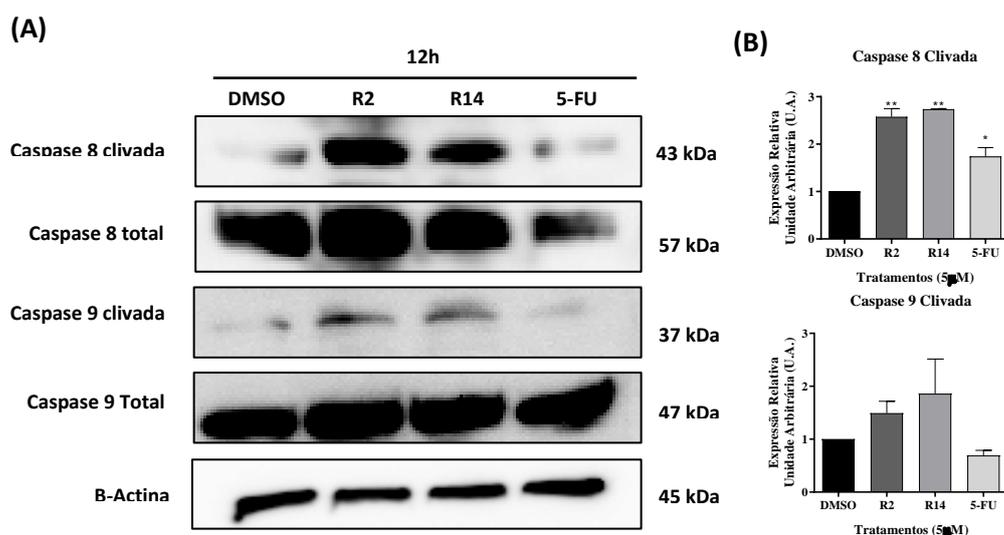


Figura 26. Análise de *western blotting* das formas ativadas das Caspases 8 e 9. **(A)** Imagens de *western blotting* das formas clivadas das Caspases 8 e 9 após 12 horas de tratamento com 5 μ M de R2, R14 e 5-FU. Caspases totais e β -Actina foram usadas como controles endógenos. **(B)** Quantificação por densitometria das bandas de *western blotting* normalizadas ao controle negativo DMSO. As barras de erro representam a média \pm desvio padrão de no mínimo dois experimentos independentes. Após análise estatística ANOVA de uma via com pós-teste de *Dunnet*, foram

classificados como diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

Já a análise dos níveis das Caspases 3 e 7 (caspases efetoras comuns às vias extrínseca e intrínseca) foi realizada por meio do ensaio *CellEvent™ Caspase-3/7*, que permite a identificação da ativação das caspases 3 e 7 por meio da detecção de fluorescência (**Figura 27**).

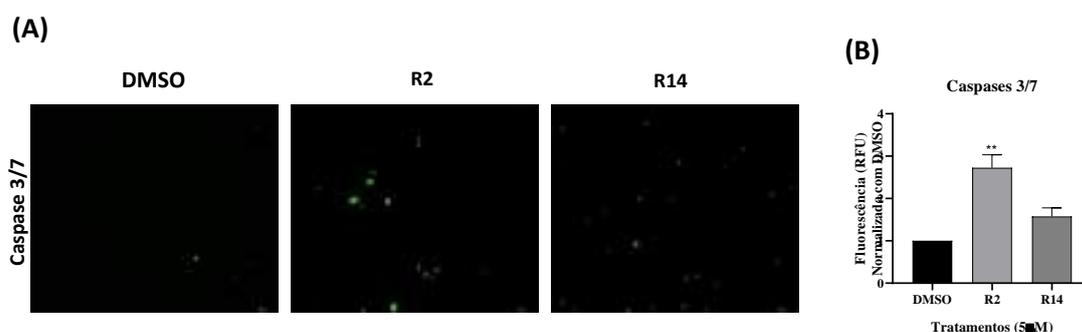


Figura 27. Imagens de fluorescência do Ensaio Caspase-3/7 CellEvent™. **(A)** Células MDA-MB-231 tratadas com R2 e R14 (5 μM) por 12 horas, coradas com os Reagentes de Detecção de Caspase-3/7 CellEvent™. Imagens analisadas e capturadas por microscópio de fluorescência invertido com objetiva de 10x. **(B)** Quantificação da intensidade de fluorescência das células expressando caspases 3/7, normalizada ao controle negativo (DMSO). As barras de erro representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. Após análise estatística ANOVA de uma via com pós-teste de *Dunnett*, foram classificados como diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

A quantificação da fluorescência mostrou que R2 e R14 levaram a aumento nos níveis de ativação das caspases efetoras 3/7 quando comparado ao DMSO (R2: $2,72 \pm 0,30$; R14: $1,57 \pm 0,20$), no entanto, a diferença foi apenas estatisticamente significativa para R2 ($p = 0,0065$).

Considerando aumentos nos níveis de HIF1- α , clusterina e catalase observados pelo ensaio do *Human Apoptosis Array*, foi também investigado se a morte celular desencadeada pelos compostos R2 e R14 não poderia estar associada à indução da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS), utilizando o ensaio ROS-GLO™ H₂O₂. Resultados obtidos demonstraram que o composto R2 foi responsável pela elevação significativa dos níveis de H₂O₂ em relação ao controle negativo DMSO ($2,45 \pm 0,15$; $p = 0,0031$) (**Figura 28**).

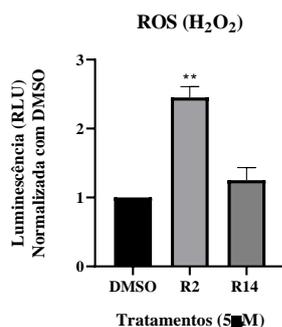


Figura 28. Níveis de ROS (H₂O₂) produzido após o tratamento com os compostos R2 e R14. As células MDA-MB-231 foram tratadas com os compostos a 5 μM por 24 horas e submetidas ao ensaio ROS-Glo™ H₂O₂, no qual o conteúdo de H₂O₂ foi determinado por detecção de luminescência. Os valores são apresentados em Unidade Relativa de Luminescência (RLU) normalizadas em relação ao controle negativo DMSO. As barras de erro representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. Após análise estatística ANOVA de uma via com pós-teste de *Dunnet*, foram classificados como diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

5.9 Análise de vias de sinalização de dano DNA

Posteriormente, foi analisado se os compostos R2 e R14 poderiam estar causando danos ao DNA ou interferir nas vias de reparo de dano de DNA, através da análise de proteínas sinalizadoras de dano ao DNA, como a Histona da Família H2A, Membro X ativada (H2AX), Proteína Ataxia-telangiectasia Mutada (ATM), Proteína Relacionada ao Rad3 (ATR) e Quinase do Ponto de Checagem 1 (CHK1) (**Figura 29**).

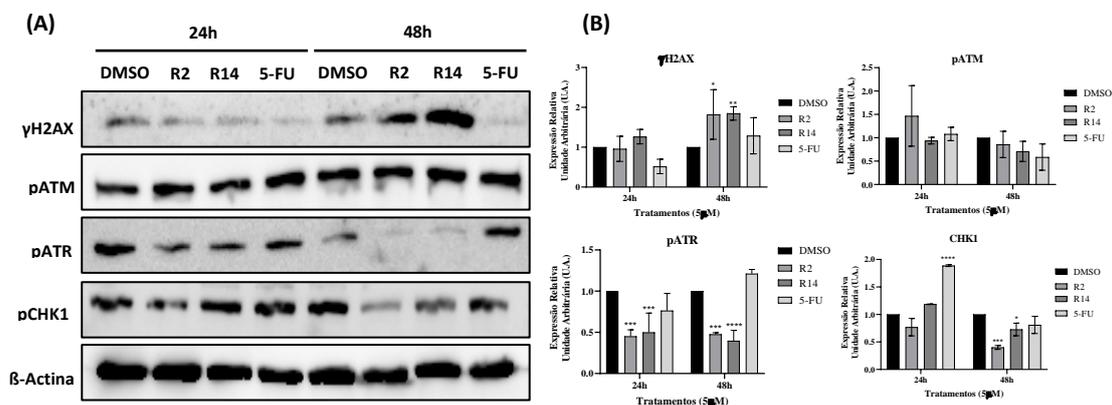


Figura 29. Análise por *western blotting* do conteúdo proteico das proteínas sinalizadoras do dano de DNA (A) Imagens de *western blotting* do conteúdo proteico das proteínas sinalizadoras de dano ao DNA γH2AX, ATM, ATR e CHK1 na linhagem MDA-MB-231 após 24 e 48 horas de tratamento com os compostos R2, R14 e 5-FU a uma concentração de 5 μM. β-Actina foi usada como controle endógeno. (B) Quantificação por densitometria das bandas de *western blotting* normalizadas em relação ao controle negativo DMSO. As barras de erro representam a média ± desvio padrão de no mínimo dois experimentos independentes. Após análise estatística ANOVA de uma via com pós-teste de *Dunnet*, foram classificados como diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

Os resultados de *western blotting* demonstraram que ambos os compostos levaram ao aumento significativo dos níveis de γ H2AX após 48 horas de tratamento em comparação com o controle negativo (R2: $1,82 \pm 0,62$, $p = 0,012$; R14: $1,84 \pm 0,16$, $p = 0,009$), mesmo sem interferência nos níveis de ATM. Ambos os compostos também diminuíram significativamente os níveis de ATR após 24 horas (R2: $0,45 \pm 0,08$, $p = 0,0002$; R14: $0,49 \pm 0,23$, $p = 0,0006$) e 48 horas de tratamento (R2: $0,47 \pm 0,02$, $p = 0,0004$; R14: $0,39 \pm 0,12$, $p < 0,0001$), também levando a um impacto nos níveis de CHK1, mas somente após 48 horas de tratamento (R2: $0,41 \pm 0,03$, $p = 0,0003$; R14: $0,72 \pm 0,11$, $p = 0,025$).

5.10 Migração celular

Após tratamento com os compostos a $5\mu\text{M}$ durante 24 horas, foi realizado o ensaio de migração *transwell* utilizando a linhagem MDA-MB-231. Os resultados deste ensaio demonstraram que não houve diferenças estatisticamente significativas do nível de migração da linhagem MDA-MB-231 após tratamento com R2 e R14 (**Figura 30**).

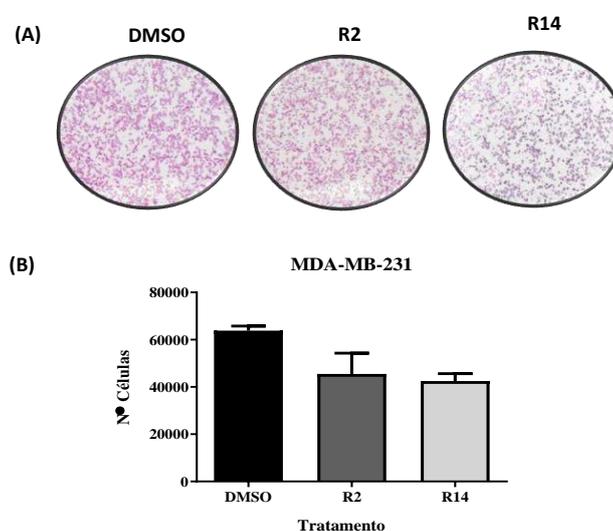


Figura 30. Ensaio de migração. **(A)** Imagens representativas dos insertos *transwell* após tratamento com DMSO, R2 e R14. **(B)** Níveis de migração celular após as diferentes condições de tratamento. As barras de erro representam a média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes. Após análise estatística ANOVA de uma via com pós-teste de *Dunnett*, foi observado que não houve diferenças estatisticamente significativas da expressão das proteínas após o tratamento com os compostos em relação ao controle negativo (DMSO).

6 DISCUSSÃO

6.1 Triagem da atividade antitumoral *in vitro* e relação estrutura atividade (SAR) de compostos inéditos de 2-arylquinazolinochalconas

No presente estudo, 15 moléculas inéditas de 2-arylquinazolinochalconas (R1-R15) foram recebidas e analisadas quanto a sua atividade antitumoral em linhagens tumorais de mama. Foi então realizada uma triagem inicial levando em consideração os níveis de citotoxicidade dos compostos em linhagens tumorais de mama dos subtipos moleculares luminal A (T-47D), luminal B (BT-474) e triplo-negativo (MDA-MB-231), em dose única de 10 μ M durante o período de 72 horas. A partir deste ensaio, foi observado que apenas os compostos R2 e R14 apresentaram atividade seletiva, uma vez que foram responsáveis por uma redução de viabilidade das linhagens tumorais em mais de 50%, afetando em menores proporções a linhagem não-tumoral (HFF-1), que apresentou taxa de viabilidade maior que 50% após tratamento.

Foi também observado que a presença de diferentes radicais na estrutura molecular dos compostos pareceu influenciar em diferentes perfis de citotoxicidade. Fatores como menor peso molecular ou a presença de agrupamentos metil/metoxila, ligados ao anel benzênico associado à porção da chalcona, pareceram influenciar em uma citotoxicidade não seletiva, ou seja, na redução de viabilidade tanto de linhagens tumorais, quanto da linhagem não-tumoral. Por outro lado, a presença de cloro acompanhada da presença de grupos metil ou metoxila foi fortemente associada a uma menor citotoxicidade, levando a níveis de viabilidade superiores a 50% em todas as linhagens celulares testadas.

Corroborando com estes resultados, dados da literatura mostram que, em derivados de quinazolino-chalconas, a substituição do anel fenólico da porção da chalcona por agrupamentos doadores de elétrons, como no caso de agrupamentos de metoxila, levou a uma citotoxicidade significativa contra várias linhagens tumorais (ex: leucemia, melanoma, câncer colorretal, ovariano e de mama). No entanto, substituições por elementos eletronegativos, como os radicais de cloro e flúor, tanto nas porções de quinazolina quanto nas porções de chalcona, parecem diminuir a atividade antitumoral dos compostos, como também demonstrado no presente estudo^{40,41}.

Apesar da grande citotoxicidade demonstrada por compostos com radicais associados à porção das chalconas, a presença de radicais de metoxila ligados ao anel

benzênico da porção das quinazolininas parece influenciar em uma maior seletividade para as linhagens tumorais do que para a célula saudável, como no caso de R2 e R14, os compostos mais seletivos para todas as linhas celulares tumorais testadas. Devido à maior seletividade destes compostos para linhagens tumorais, R2 e R14 foram as moléculas selecionadas para as próximas etapas do projeto.

6.2 Características físico-químicas e farmacocinéticas *in silico* dos compostos R2 e R14

6.2.1 Parâmetros físico-químicos e *Druglikeness*

A determinação da similaridade de fármacos em desenvolvimento com fármacos já aplicados na prática clínica ("*druglikeness*") leva em consideração a influência das propriedades físico-químicas dessas moléculas no comportamento molecular *in vivo*, principalmente quanto a sua solubilidade, permeabilidade, metabolismo, estabilidade e transporte⁴².

Os resultados da predição de parâmetros físico-químicos obtidos demonstraram que moléculas R2 e R14 apresentaram valores de peso molecular, TPSA, quantidades de ligações rotacionáveis, de receptores e de doadores de hidrogênio dentro dos valores estabelecidos pela plataforma ADMETLab 2.0 como desejáveis para um fármaco em desenvolvimento. No entanto, de acordo com o *score* de *druglikeness* Lipinski³⁶, apesar de R2 apresentar parâmetros exigidos pela RO5 para predição de boa biodisponibilidade oral, a molécula R14 apresentou elevados valores de LogP, peso molecular e número de receptores de hidrogênio, e, portanto, seguindo estes parâmetros, não apresentaria uma biodisponibilidade oral perfeita, sendo necessário administrações intravenosas para serem mais eficientes⁴³.

Ainda assim, valores elevados do logaritmo do coeficiente de distribuição n-octanol/água (LogP), mesmo em pH fisiológico (logD7,4), e reduzido valor de solubilidade aquosa (LogS), demonstram uma elevada hidrofobicidade e baixa hidrossolubilidade dessas moléculas, o que possivelmente influenciariam na permeabilidade da membrana e na ligação hidrofóbica a algumas macromoléculas. Outro fator que mostrou valores preditivos inferiores aos limites desejáveis para ambas as moléculas estudadas, foi a fração de hibridização sp³ (Fsp³), que já foi estabelecido por estudos anteriores como um fator que contribui para o sucesso clínico de um

fármaco em desenvolvimento, e que um aumento desta saturação pode estar associado a maiores níveis de hidrossolubilidade das moléculas⁴⁴.

6.2.2 Absorção

Por análises de análises *in silico* foram obtidos os valores preditivos para os parâmetros de absorção dos compostos R2 e R14.

A linhagem celular Caco-2 é utilizada como um substituto para o epitélio intestinal humano para estimar a permeabilidade *in vivo* do fármaco, devido as suas características morfológicas e funcionais semelhantes às de enterócitos humanos. Assim, o coeficiente de permeabilidade da célula monocamada Caco-2 (Papp) é geralmente usado para avaliar a permeabilidade intestinal humana⁴⁵. Assim como a linhagem Caco-2, as células MDCK se diferenciam em epitélio colunar e formam junções quando cultivadas em membranas semipermeáveis e podem ser utilizadas como uma ferramenta de triagem da permeabilidade da membrana na fase inicial do desenvolvimento de novos fármacos⁴⁶. Apesar de algumas limitações quanto a suas propriedades físico-químicas e nível de hidrofobicidade, as moléculas R2 e R14 apresentaram valores preditivos desejáveis de absorção *in vitro* pelas linhagens Caco-2 e MDCK, o que possivelmente influenciou em valores preditivos desejáveis para HIA, e para a biodisponibilidade oral nas porcentagens de F20% e F30%.

Como já visto nos resultados de predição de alvos moleculares dos compostos em estudo, ambas as moléculas apresentaram como um de seus alvos mais prováveis a glicoproteína P-1, pertencente à classe das proteínas do transporte ativo primário. Assim, tanto a molécula R2 quanto a molécula R14 são possíveis inibidoras desta proteína, e a molécula R14 também apresentou elevada probabilidade de servir como seu substrato. A Pgp-1 é uma das proteínas responsáveis pelo transporte de uma grande variedade de xenobióticos (incluindo drogas), lipídios e produtos do metabolismo através da membrana plasmática de forma ATP-dependente, e está associada ao desenvolvimento de resistência aos tratamentos quimioterápicos convencionais, por meio deste mecanismo⁴⁷. No entanto, sua inibição pode levar a complicações, como níveis aumentados nos tecidos e intoxicação⁴⁷. Portanto, elevadas probabilidades de se inibir ou servir de substrato para estas moléculas são vistas como parâmetros não desejáveis no desenvolvimento de novos fármacos pela predição *in silico*.

6.2.3 Distribuição

Quanto aos parâmetros de distribuição fornecidos pela plataforma ADMETLab 2.0, ambas as moléculas apresentaram probabilidades elevadas de bom volume de distribuição e baixa probabilidade de ultrapassagem da barreira hematoencefálica, e consequentemente, baixa probabilidade de promover efeitos adversos no sistema nervoso central. No entanto, as moléculas R2 e R14 mostraram valores preditivos elevados de porcentagem de ligação a proteínas plasmáticas (PPB), e consequentemente, possíveis valores reduzidos de fração do fármaco não ligado a proteínas (F_u). Considerando que as propriedades farmacológicas dos medicamentos são frequentemente relacionadas com a concentração do fármaco livre no plasma, a probabilidade de elevada porcentagem de PPB pode reduzir a difusão das moléculas para o sítio e sua interação com o alvo⁴⁸.

6.2.4 Metabolismo

As principais enzimas capazes de catalisar a biotransformação de fármacos são as isoenzimas dos citocromos P450 (CYP450), representadas por CYP3A4, CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9 e CYP2C19⁴⁹. Ambas as moléculas mostraram elevada probabilidade de inibirem a maioria das isoenzimas analisadas. Tanto a molécula R2 quanto a molécula R14 também apresentam elevada probabilidade de servirem como substrato para as enzimas Cyp2CP e Cyp2D6, e o mesmo ocorreu para as isoenzimas Cyp1A2 e Cyp3A4 para a molécula R14. Considerando a importância dos Cyps na desintoxicação de xenobióticos potencialmente prejudiciais, a capacidade de inibição dessas enzimas é uma característica não desejável para novos fármacos em desenvolvimento. Ao mesmo tempo, considerando que essas enzimas são muitas vezes responsáveis pela bioativação de compostos não tóxicos em intermediários reativos tóxicos ou de procarcinógenos em carcinógenos finais, a interação enzima-substrato dessas enzimas com as moléculas estudadas, é também não recomendada⁵⁰.

6.2.5 Excreção

Quanto aos parâmetros de excreção, ambas as moléculas apresentaram valores preditivos de *Clearance* de creatinina reduzidos, o que influencia em dificuldades de excreção dessas moléculas, tanto por via renal, quanto por via hepática. Esta característica pode estar relacionada às elevadas porcentagens de ligação a proteínas

plasmáticas previstas para essas moléculas. Já quanto ao tempo de meia-vida, a molécula R2 mostrou baixa probabilidade de um tempo de meia-vida reduzido (≤ 3), enquanto a molécula R14 mostrou elevada probabilidade de um tempo de meia-vida reduzido. A compreensão destes parâmetros de excreção é de extrema importância no cálculo de dosagens de administração apropriadas de medicamentos⁵¹.

6.2.6 Toxicidade

Para predição de toxicidade cardíaca, foram analisados os riscos de bloqueio dos canais de hERG *in silico*. O gene hERG é responsável pela codificação do canal de potássio Kv11.1, cujo bloqueio pode levar à indução da Síndrome do QT longo (SQTL), e consequente morte súbita cardíaca⁵². Apesar de ambas as moléculas apresentarem riscos de bloqueio de hERG, a probabilidade que estas moléculas apresentem esta característica é moderada. Quanto aos parâmetros de hepatotoxicidade, tanto a molécula R2 como a molécula R14 apresentarem elevado risco de hepatotoxicidade ao levar em consideração o parâmetro DILI, enquanto as probabilidades de hepatotoxicidade pelo parâmetro HT foi de baixo, para a molécula 14, a moderado, para a molécula R2.

Por meio da plataforma de análises *in silico*, é possível ainda prever riscos de mutagenicidade por AMES (ensaio de mutagenicidade *Salmonella*/microsoma), ensaio de mutação reversa bacteriana de curto prazo projetado especificamente para detecção de substâncias químicas que podem produzir danos genéticos que levam a mutações genéticas⁵³. Além de ambas as moléculas mostrarem riscos elevados de mutagenicidade AMES, as mesmas também apresentaram elevados riscos de carcinogenicidade.

Quanto à toxicidade aos olhos, apesar das moléculas apresentarem probabilidades moderada (R14) e elevada (R2) de irritabilidade aos olhos, nenhuma mostrou risco de corrosão aos olhos. Foram encontrados, ainda, riscos moderado e elevado de toxicidade respiratória para as moléculas R2 e R14, respectivamente. No entanto, as moléculas apresentaram baixa probabilidade de apresentarem toxicidade oral, e riscos moderado (R2) ou baixo (R14) de sensibilidade da pele a essas moléculas.

6.3 Níveis de citotoxicidade e seletividade dos compostos R2 e R14

As linhagens celulares mais sensíveis aos compostos R2 e R14 (com valores de IC_{50} abaixo de 5 μM) foram as linhagens T-47D, MDA-MB-231 e SKBR3, enquanto as demais linhagens testadas apresentaram níveis de sensibilidade intermediários e baixos para os compostos testados. R2 e R14 também demonstraram os maiores índices de seletividade (SI) para T-47D, MDA-MB-231 e SKBR3 tanto em comparação com a linhagem HFF-1, quanto com a linhagem HaCat.

Estudos anteriores avaliaram a atividade antiproliferativa *in vitro* de híbridos de quinazolino-chalconas contra várias linhagens tumorais, incluindo linhagens tumorais de mama, cólon, pulmão, pâncreas, fígado, próstata, melanoma e leucemia^{40,54-61}. A maioria desses estudos utilizou a linhagem MCF-7 (Luminal A) como modelo representativo de câncer de mama, relatando valores médios de IC_{50} de 2,68 μM , variando de 0,09 μM a 10 μM , o que está em concordância com os valores de IC_{50} obtidos no presente estudo^{40,54-61}. Resultados semelhantes foram encontrados para linhas tumorais de câncer colorretal (2,08 μM) e câncer de pulmão de células não pequenas (2,21 μM)^{40,54-61}. Embora tenha demonstrado apenas citotoxicidade moderada contra células de leucemia ($IC_{50} = 9,09\mu M$), um estudo ainda relatou um alto índice de seletividade (IS = 7,19) para o híbrido de quinazolino-chalcona analisado em comparação à citotoxicidade do composto contra células sanguíneas saudáveis⁴¹. Esses achados reforçam o potencial dos híbridos de quinazolino-chalconas em exibir ampla e seletiva citotoxicidade contra células tumorais. Dados da literatura também mostram que a hibridização de chalcona e erlotinibe (um inibidor de EGFR derivado de quinazolina) resultou em maior citotoxicidade contra células de câncer de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC) em comparação com suas formas isoladas ou combinadas *in vitro*, destacando a importância do processo de hibridização na otimização da citotoxicidade de compostos⁶².

Por outro lado, a maioria das linhagens analisadas mostrou maior resistência ao antimetabólito 5-FU e ao agente alquilante Cisplatina, utilizados como controles positivos, enquanto o taxano Paclitaxel, demonstrou alta atividade citotóxica em comparação com R2, R14 e outros quimioterápicos, com valores médios de IC_{50} abaixo de 0,1 μM . Paclitaxel é um quimioterápico amplamente utilizado no tratamento de câncer de mama, cujo mecanismo de ação consiste na estabilização de microtúbulos e

indução de parada mitótica⁶³. Apesar de sua elevada citotoxicidade e índices de seletividade em algumas das linhagens celulares tumorais de mama testadas, incluindo MDA-MB-231 (SI = 5,95), mecanismos de resistência e altas taxas de recorrência são constantes desafios clínicos enfrentados por pacientes tratados com paclitaxel⁶³.

6.4 Análise de citotoxicidade de R2 e R14 em modelo 3D de esferoides

Estruturas celulares tridimensionais tornaram-se modelos válidos para análise do perfil de resposta a fármacos, uma vez que mimetizam o ambiente tumoral com maior fidelidade, quando comparadas a monocamadas celulares de culturas 2D⁶⁴. No entanto, fatores como menor penetração do fármaco devido à compactação dos esferoides, condições hipóxicas e diferenças no metabolismo e na expressão gênica geralmente levam a uma maior resistência aos medicamentos em modelos 3D, conforme já demonstrado em muitos estudos⁶⁵⁻⁶⁸

No entanto, nossos resultados mostram que tanto R2 quanto R14 foram capazes de reduzir a viabilidade celular e/ou aumentar a morte celular em esferoides de linhagens celulares de câncer de mama de três diferentes subtipos moleculares (Luminal A, Luminal B e Triplo-Negativo), conforme evidenciado pela quantificação das intensidades fluorescentes de Calceína e IP. Até onde sabemos, não existem estudos que explorem a atividade de híbridos de quinazolino-chalconas em modelos 3D de esferoides. Ainda assim, alguns estudos mostram que derivados de quinazolininas podem reduzir a viabilidade celular tanto em modelos de monocamada quanto de esferoides de linhagens tumorais de pâncreas, mama e Câncer de Pulmão Não Pequenas Células (NSCLC)⁶⁹⁻⁷¹. O Erlotinibe, um fármaco derivado de quinazolinina, também não mostrou diferença nos perfis de citotoxicidade em culturas 2D e 3D de células NSCLC, embora tenha exibido diferentes mecanismos de morte celular em cada modelo⁷². Outro estudo realizado com Erlotinibe demonstrou que, por meio de sua combinação com EGF, foi possível promover a degradação de EGFR em culturas 3D de linhagens celulares pancreáticas, mas o mesmo não ocorre em culturas 2D⁷³.

Curiosamente, apesar de apresentar quase nenhuma citotoxicidade em modelo de cultura 2D, o controle positivo 5-FU exibiu maior citotoxicidade em modelo 3D de esferoides para as linhagens MDA-MB-231, BT-474 e T-47D. Sabe-se que, além da alta compactação celular, o menor metabolismo das células em formato de esferoides em

comparação às células em monocamada geralmente leva a uma menor sensibilidade aos agentes quimioterápicos^{74,75}. No entanto, um estudo acerca de inibidores da quinase MEK já demonstrou uma sensibilidade elevada de esferoides da linhagem MDA-MB-231 a esses compostos em comparação a células em cultura 2D⁷⁶; outro estudo também demonstrou que, de 12 diferentes linhagens tumorais de mama Triplo-Negativo, a linhagem MDA-MB-231 foi a única que apresentou menor valor de IC₅₀ para o intercalante de DNA epirrubicina, em cultura 3D⁷⁷.

Embora a compactação dos esferoides não seja o único fator que contribui para a maior resistência a medicamentos em culturas 3D, alguns estudos indicam que as linhagens celulares de câncer de mama, particularmente células triplo-negativas, como as linhagens MDA-MB-231 e SUM1315, expressam baixos níveis da molécula de adesão celular E-caderina, o que poderia levar a uma menor solidez dos esferoides^{75,78}. Consequentemente, isso poderia explicar por que as células de câncer de mama permanecem suscetíveis à citotoxicidade de medicamentos em cultura 3D, quando expostas aos compostos R2 e R14 ou ao controle positivo 5-FU.

Considerando a elevada citotoxicidade e seletividade dos compostos R2 e R14 para a linhagem MDA-MB-231 em modelos de cultura 2D e 3D, e considerando que esta linhagem representa o subtipo molecular com menos opções terapêuticas disponíveis na prática clínica, a mesma foi escolhida para as próximas etapas deste estudo.

6.5 R2 e R14 induzem a parada do ciclo celular por meio do aumento da expressão de p27 e inibição de CDK2

Para início de compreensão dos mecanismos de ação antitumoral de R2 e R14, foi realizada uma análise por citometria de fluxo para investigação de possível interferência desses compostos no processo de ciclo celular de células tumorais de mama. A análise de citometria de fluxo revelou que o tratamento com R2 aumentou significativamente a retenção de células na fase G₀/G₁ e reduziu as células na fase S em comparação com o controle negativo DMSO. Em contraste, o controle positivo 5-FU aumentou a porcentagem de células na fase S, resultados esperados devido aos seus mecanismos de ação conhecidos, que envolvem a perturbação da síntese de DNA que ocorre durante essa fase do ciclo celular⁷⁹.

Embora a análise por citometria de fluxo mostre que R14 não interferiu significativamente na progressão do ciclo celular, a análise por *western blotting* demonstrou uma inibição quase completa dos marcadores de proliferação geminina e timidina quinase após tratamento com R2 e R14, por 24 e 48 horas. A Geminina é uma proteína reguladora de ciclo celular cuja função consiste em inibir o fator de licenciamento da cromatina e replicação de DNA (Cdt1), estrutura associada à formação de complexos de pré-replicação que ocorrem durante a fase de síntese do ciclo celular. Assim, a geminina tem sua expressão elevada no final da fase S e início da fase G2 do ciclo celular, após o pico de Cdt1, que ocorre no início da fase S⁴⁵. Por outro lado, a timidina quinase consiste em um marcador de ciclo celular que apresenta a função de regenerar timidina para síntese e reparo de DNA, e, portanto, tem sua expressão aumentada durante a fase S do ciclo^{80,81}. Considerando que, após o tratamento com R2 e R14, a expressão de geminina e timidina quinase foi significativamente reduzida, sugere-se que ambos os compostos estão impedindo as células de progredirem para as fases S e G2 do ciclo celular.

Consistentemente com nossos achados, muitos estudos também mostram quinazolininas e chalconas, tanto nas suas formas isoladas quanto em suas formas conjugadas, como indutores da parada do ciclo celular em G0/G1 em linhagens de vários tipos tumorais, incluindo células tumorais de mama^{54,82-87}. Já outros estudos mostram quinazolininas e chalconas como indutores da parada do ciclo celular em G2/M⁸⁸⁻⁹¹ ou até mesmo em ambas as fases G0/G1 e G2/M⁵⁹.

O progresso do ciclo celular depende principalmente da ativação dos complexos de ciclinas e CDKs. Os complexos ciclina D-CDK4/CDK6 e ciclina E-CDK2 desempenham um papel importante durante o ponto de checagem G1 do ciclo celular, ativando E2F e, subsequentemente, levando à expressão de genes relacionados à proliferação celular³⁹. Dado que os compostos R2 e R14 impedem a progressão do ciclo celular da fase G0/G1 para a fase S, foi investigado, por análises de *western blotting*, se algumas dessas proteínas poderiam servir como possíveis alvos para R2 e R14.

Apesar de não interferirem de forma significativa nos níveis de expressão de Ciclina D1 e CDK, o tratamento com os compostos R2 e R14 levou à redução significativa de CDK2. Curiosamente, 5-FU também reduziu a expressão de CDK2 após 48 horas de tratamento, algo já repostado em outros estudos^{92,93}. Uma triagem *in silico* também

identificou CDK2 como um possível alvo molecular para o 5-FU, o que corrobora com os achados do presente estudo⁹⁴.

Alguns estudos já desenvolveram e avaliaram derivados de chalconas e quinazolininas como inibidores de CDK2, mostrando resultados promissores, especialmente contra células de câncer de mama e melanoma⁹⁵⁻⁹⁸, e às vezes exibindo atividade multialvo, como por exemplo, contra CDK1, CDK4 e EGFR^{99,100}. A importância dos inibidores de CDK4/CDK6 para o tratamento de câncer de mama positivo para receptores hormonais (HR+) é bem estabelecida, com várias opções aprovadas FDA, como Palbociclib, Ribociclib e Abemaciclib¹⁰¹. Embora ainda não existam inibidores de CDK2 clinicamente aprovados, muitos ensaios clínicos em fases 1/2 estão ativamente explorando sua eficácia em câncer de mama HR+, após falha dos inibidores de CDK4/CDK6, e em pacientes com câncer de mama triplo-negativo prévio a tratamento¹⁰².

A redução na expressão de CDK2 pode ser possivelmente explicada pela significativa superexpressão de p27, também demonstrada nos resultados de *western blotting*. A proteína p27 é um inibidor de quinase dependente de Ciclina (CDKi) da família CIP/KIP, juntamente com p21 e p57. Como outros CDKIs, sua principal função é regular negativamente as CDKs, particularmente o complexo ciclina E-CDK2 durante a fase G0/G1 do ciclo celular^{39,103}. Considerando que os compostos R2 e R14 induzem a parada do ciclo celular na fase G0/G1, na qual p27 atinge seus níveis máximos de expressão e estabilidade, isso pode explicar o aumento de p27 observado e, conseqüentemente, a redução na expressão de CDK2, um de seus principais alvos. Outra hipótese para as alterações na expressão de p27 consiste na interrupção da ubiquitinação mediada por Skp2. Skp2 é um componente importante do complexo ligase E3 Skp2-SCF, cujo objetivo principal é a adesão de ubiquitina aos seus alvos, iniciando a regulação ou degradação proteica¹⁰⁴. Um de seus principais substratos proteolíticos é p27, e muitos estudos relataram novos compostos cuja atividade antitumoral está associada à supressão da expressão de Skp2, bem como à estabilização de p27, levando à parada do ciclo celular na fase G0/G1¹⁰⁵⁻¹⁰⁷.

Posteriormente, foi investigado se a parada do ciclo celular poderia ter sido induzida por alterações na via de sinalização p53-p21. Assim como p27, p21 é um CDKI pertencente à família CIP/KIP. Sua expressão é fortemente induzida pelo supressor

tumoral p53 e tem sido demonstrado que media a parada do ciclo celular na fase G1 induzida por p53¹⁰⁸. No entanto, neste estudo observamos que o tratamento com os compostos R2 e R14 não resultou na superexpressão de p53 ou p21. De fato, R2 até reduziu significativamente os níveis de p53 após 48 horas de tratamento e diminuiu ligeiramente os níveis de p21 tanto após 24 quanto 48 horas de tratamento, embora essas alterações não tenham sido estatisticamente significativas. No entanto, considerando que a linhagem MDA-MB-231 apresenta mutações em p53, é possível que as ações dos compostos R2 e R14 não foram suficientes para induzir o aumento da funcionalidade desta proteína, fazendo com que as células tumorais optem por utilizar outras vias que também levem à parada de ciclo celular, como o caso de p27.

Curiosamente, ambos os compostos aumentaram a expressão da maioria dos fatores proliferativos, que atuam como indutores da progressão do ciclo, como MAPKs JNK, p38, p70 S6 Kinase, RSK e TOR, além de RTKs EGFR, ErbB (2 e 3), PDGF R β , EphA7 e Ryk. A validação por *western blotting* mostrou que não houve diferenças significativas na expressão de ERK, JNK e AKT após tratamento com R2 e R14.

Em contraste com nossos resultados, quinazolininas e chalconas tipicamente exibem propriedades inibitórias contra RTKs e outras proteínas associadas à proliferação celular, tanto em suas formas isoladas quanto conjugadas, com ênfase na inibição de EGFR^{41,59-61,109-112}. Uma explicação para a superexpressão de proteínas associadas às vias de sinalização proliferativa após tratamento com R2 e R14 pode ser o desenvolvimento de mecanismos compensatórios e de resistência em resposta aos efeitos citotóxicos e citostáticos dos compostos. Como demonstrado em um estudo anterior, a resistência aos inibidores de CDK2 envolve a restauração do potencial proliferativo, com a seleção de fatores que promovem a sinalização da ciclina D, como é o caso dos RTKs¹¹³. Apesar disso, tanto R2 quanto R14 ainda conseguiram exercer seus efeitos citotóxicos e superar a sinalização aumentada dessas vias proliferativas. Também foi estabelecido que, além de serem essenciais para a proliferação celular, algumas MAPKs podem estar envolvidas com processos pró-apoptóticos¹¹⁴.

6.6 R2 e R14 induzem estresse oxidativo e morte celular, principalmente por via extrínseca

Os tratamentos com R2 e R14 também levam à morte celular, com aumento da proporção de células em processo de morte inicial e tardia após 48 e 72 horas de tratamento. Notavelmente, o controle positivo 5-FU manteve um padrão semelhante de morte celular precoce e tardia quando comparado ao controle negativo.

A apoptose depende principalmente da ativação de duas vias de sinalização distintas: a via extrínseca e a via intrínseca. A via extrínseca é iniciada pela interação entre receptores de morte, como Fas e Receptor do Fator de Necrose Tumoral (TNF-R), e seus ligantes específicos (proteína associada ao domínio de morte - FADD - e proteína associada ao domínio de morte do receptor do fator de necrose tumoral tipo 1 - TRADD, respectivamente), levando à ativação da caspase-8^{115,116}. Por outro lado, a via intrínseca/mitocondrial é geralmente ativada por estímulos internos, como danos ao DNA e estresse oxidativo, que podem causar perturbação mitocondrial e ativar proteínas Bcl pró-apoptóticas localizadas na membrana mitocondrial^{115,116}. Esta ativação eventualmente leva à liberação de citocromo c no citoplasma, que forma um apoptossomo, responsável por clivar a procaspase-9 em caspase-9. Ambas as caspases 8 e 9 induzem a clivagem e ativação das caspases efetoras 3/7, levando à apoptose^{115,116}. Embora resultados de *western blotting* mostrem que os tratamentos com os compostos R2 e R14 tenham levado ao aumento de clivagem de ambas as caspases 8 e 9, as diferenças foram estatisticamente significativas apenas para a caspase-8, indicando que a morte celular está sendo primariamente desencadeada por estímulos externos.

A quantificação da fluorescência obtida após o ensaio *Caspase-Glo*[®] 3/7 demonstrou que R2 e R14 aumentaram a ativação das caspases 3/7, mas com diferença estatisticamente significativa apenas para R2. No entanto, é possível inferir que ambos os compostos levam à ativação de caspase 8, uma caspase iniciadora extrínseca, e das caspases efetoras 3/7 após 12 horas de tratamento, achados que são corroborados pelos resultados do *Human Apoptosis Array*, que mostram um aumento nas expressões de FADD e caspase 3 clivada. Semelhante aos nossos achados, derivados de chalconas e quinazolininas são conhecidos por induzirem tanto as vias de morte intrínseca quanto extrínseca em muitos tipos tumorais, como câncer colorretal, de mama, hepatocelular e melanoma^{112,117-121}. Híbridos de quinazolino-chalconas foram também capazes de

e elevar os níveis das formas ativadas das caspases 8 e 9 em uma linhagem tumoral de pâncreas⁵⁹.

Curiosamente, o *Human Apoptosis Array* também revelou níveis elevados de clusterina, catalase e subunidade alfa do Fator Induzível por Hipóxia-1 (HIF-1 α), proteínas que são geralmente expressas em resposta ao estresse oxidativo¹²²⁻¹²⁴. O estresse oxidativo envolve a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS), perturbando o equilíbrio entre ROS e antioxidantes. Embora a produção de ROS frequentemente acompanhe a hiperproliferação das células tumorais e seja geralmente considerada pró-tumorigênica, níveis excessivos podem eventualmente se tornar citotóxicos, exigindo que as células tumorais aumentem suas defesas antioxidantes para evitar senescência ou apoptose desencadeada por ROS¹²⁵.

Considerando que os níveis de vários fatores de resposta ao estresse oxidativo foram elevados após o tratamento com R2 e R14 em comparação ao controle negativo, nós posteriormente investigamos se esses compostos contribuem para o estresse oxidativo através da produção de ROS que indicaram que o composto R2 levou a um aumento significativo na produção de H₂O₂. Embora R14 não tenha afetado os níveis de H₂O₂, investigações futuras são necessárias para determinar se o estresse oxidativo induzido por R14 pode estar relacionado à produção de outros tipos de ROS, como superóxido (O₂⁻) e radicais livres hidroxila (OH \cdot). De fato, alguns derivados de quinazolina já foram relatados como indutores de apoptose de maneira dependente de ROS em células de câncer de mama e carcinoma hepatocelular^{126,127}.

A morte celular induzida por altos níveis de ROS pode ser iniciada tanto pela via intrínseca quanto pela extrínseca de apoptose¹²⁸⁻¹³⁰. Níveis elevados de ROS levam a dano mitocondrial e à liberação de citocromo c no citoplasma, o que eventualmente desencadeia a ativação da caspase 9. Por outro lado, altos níveis de ROS também podem iniciar a via extrínseca de apoptose através da ligação de determinados ligantes aos seus respectivos receptores de morte, levando à ativação da caspase 8. A caspase 8, por sua vez, cliva a caspase e a proteína Bcl Bid, que pode translocar para a mitocôndria e também levar à translocação do citocromo c e à ativação da sinalização da via intrínseca¹³¹.

6.7 R2 e R14 causam danos ao DNA e inibem a via ATR/CHK1

Além de desencadear a morte celular, a produção de ROS pode também levar a danos oxidativos ao DNA ou estresse de replicação, que podem ser classificados como quebras de fita simples (SSBs) e quebras de fita dupla (DSBs)¹³². Em resposta ao dano oxidativo ao DNA, são recrutadas vias de resposta ao dano de DNA (DDR) para ativação dos pontos de checagem do ciclo celular e dos mecanismos de reparo de DNA apropriados, ou para dar início ao processo apoptótico quando o dano não pode ser reparado^{133,134}

Considerando que R2 e R14 possivelmente induzem bloqueio do ciclo celular e estresse oxidativo, foi investigado se esses compostos poderiam estar envolvidos em danos ao DNA ou interferir nas vias de DDR, através da análise de proteínas sinalizadoras de dano ao DNA, H2AX ativada, ATM, ATR e CHK1.

Duas das principais vias de DDR responsáveis por coordenar o reparo do DNA e o progresso do ciclo celular são os pontos de checagem ATM-Quinase do ponto de checagem 2 (CHK2) e ATR-CHK1¹³³. ATM é recrutado para a cromatina em resposta a DSBs, e se liga ao complexo MRE11-RAD50-NBS1 (MRN), que estimula a atividade de ATM. Subsequentemente, ATM fosforila CHK2, que, uma vez ativada, se dissocia dos locais de dano e se dispersa pelo núcleo para atuar em múltiplos substratos envolvidos na progressão do ciclo celular, apoptose e transcrição gênica, incluindo p53, Cdc25, BRCA1 e E2F^{135,136}. Em resposta aos DSBs, ATM também fosforila a H2AX no resíduo de serina 139, levando à formação de γ H2AX. A ativação de H2AX permite que o sinal de dano ao DNA se espalhe ao longo da cromatina, cobrindo grandes regiões do cromossomo ao redor de cada lesão de DSB, e fornecendo o recrutamento de outras proteínas de DDR^{137,138}. No presente estudo, os compostos R2 e R14 foram capazes de aumentar significativamente os níveis de γ H2AX após 48 horas de tratamento mesmo sem interferência nos níveis de ATM. No entanto, embora a ativação de H2AX seja principalmente promovida por ATM, as proteínas DDR ATR e DNA-PK também podem contribuir para a fosforilação de H2AX em certos contextos.

A via ATR-CHK1 é primariamente ativada quando a replicação do DNA é prejudicada devido à depleção de nucleotídeos ou lesões de DNA que bloqueiam a replicação, levando ao estancamento da forquilha de replicação e à geração de quebras de fita simples (SSBs). O DNA de cadeia simples (ssDNA) então se reveste com a Proteína

de Replicação A (RPA), que serve como um local de ligação para a proteína de interação com ATR (ATRIP). ATRIP recruta ATR, que é subsequentemente ativada por proteínas de resposta ao estresse de replicação. Durante as fases S e G2 do ciclo celular, ATR e seu alvo CHK1 ativam os pontos de controle via inativação de CDC25, impedindo que ele remova a fosforilação inibitória de CDK1 e CDK2, que é necessária para a progressão do ciclo celular^{136,139}. Considerando os níveis elevados de H2AX após tratamento com R2 e R14 sem alterações nos níveis de ATM, foi posteriormente investigado se a ativação de H2AX poderia estar associada a níveis elevados de ATR. Curiosamente, os resultados de *western blotting* mostraram que ambos os compostos diminuiriam significativamente os níveis de ATR após 24 e 48 horas de tratamento, também impactando os níveis de CHK1, mas somente após 48 horas de tratamento.

As principais estratégias em terapia contra o câncer, como a quimioterapia e radioterapia, geralmente induzem danos ao DNA, inibem a proliferação das células cancerosas e levam à morte celular. Embora os danos de DNA possam ser induzidos tanto em células saudáveis quanto em células cancerosas, as células cancerosas são um alvo preferencial, especialmente devido às alterações em suas vias de resposta ao dano do DNA (DDR) que levam à instabilidade genômica¹⁴⁰. Defeitos na DDR e nos pontos de checagem do ciclo celular são frequentes em cânceres de mama, resultando na não reparação de DNA danificado. Um exemplo de defeito na DDR comumente encontrado em células de câncer de mama é o comprometimento da recombinação homóloga (HR) devido à deficiência nos genes BRCA 1/2, o que eventualmente desestabiliza a capacidade de reparo de DSBs^{140,141}. A depleção de BRCA1 geralmente torna as células mais suscetíveis a inibidores de Poli (ADP-Ribose) Polimerase (PARP). O PARP desempenha um papel crucial no reparo de SSBs. Quando o PARP é inibido, SSBs se acumulam e são convertidas em DSBs quando encontram as forquilhas de replicação. Normalmente, as DSBs de uma única extremidade geradas, são reparadas pela HR. No entanto, em células deficientes em BRCA1/2, o mecanismo HR está comprometido, levando ao acúmulo de dano de DNA não reparado^{139,142}.

Curiosamente, os inibidores de ATR podem atuar sinergicamente ou superar a resistência aos inibidores de PARP na indução da morte celular em vários tipos tumorais¹⁴³. Evidências recentes também revelaram que a combinação de inibição de PARP e ATR pode ainda potencializar a instabilidade genômica e a morte celular em

células deficientes em ATM¹⁴⁴. De fato, um estudo mostrou que a perda de ATM conferiu uma maior sensibilidade à inibição de ATR em linhagens tumorais de próstata, enquanto não impactou significativamente a sensibilidade à inibição de PARP¹⁴⁵. Além de agir sinergicamente com inibidores de PARP, os inibidores de ATR também são conhecidos por complementar a atividade de agentes metilantes/alquilantes que normalmente induzem estresse de replicação e ativação de ATR^{146,147}. As proteínas pertencentes aos mecanismos de DDR também podem servir como alvos importantes na tentativa de aumentar a sensibilização à radioterapia em muitos vários tipos tumorais, como pulmão, pâncreas, mama e carcinoma hepatocelular^{106,148-151}. De fato, a inibição de ATR mostrou ser uma estratégia interessante para aumentar a sensibilidade à radioterapia em células de câncer de mama triplo-negativo com alta especificidade^{151,152}. A especificidade para células triplo-negativas pode ser atribuída a certas características moleculares, exemplificadas por mutações em TP53, o gene mais frequentemente mutado no câncer triplo-negativo (também encontrado nas células MDA-MB-231), que leva à perda do controle do ponto de checagem G1 do ciclo celular e grande dependência pelos pontos de checagem das fases S e G2/M mediados por ATR após dano ao DNA¹⁵¹.

Nossos resultados mostram a diminuição das expressões de ATR/CHK1 em células MDA-MB-231 tratadas com R2 e R14, o que pode ser induzido tanto como consequência da ligação direta e inibição de ATR ou como resultado da regulação negativa de CDK2. Já foi estabelecido que o CDK2 é capaz de fosforilar ATRIP e regular a atividade de ATR, assim como fosforilar Chk1 e mediar sua ativação¹⁵³. Considerando que os resultados de *western blotting* também mostraram redução na expressão de CDK2, possivelmente devido a uma regulação positiva de p27, pode-se inferir que as diminuições nas expressões de ATR e CHK1 induzidas por R2 e R14 poderiam ser resultado da regulação negativa de CDK2. Alternativamente, R2 e R14 poderiam estar inibindo CDK2 e ATR individualmente. Como discutido anteriormente, a ativação da via ATR/CHK1 resulta na inativação de CDC25, o que, por sua vez, impede a ativação de CDK1 e CDK2. Portanto, a inibição de ATR pode levar a elevações na expressão de CDK2, potencialmente permitindo a progressão do ciclo celular. Com a inibição simultânea de ATR e CDK2 sob a influência de danos de DNA, o ciclo celular pode ser comprometido devido a distúrbios na resposta ao dano do DNA mediada por ATR ou devido à função comprometida do ponto de checagem G0/G1 dependente de CDK2.

7 CONCLUSÃO

No presente estudo, duas moléculas inéditas de 2-arylquinazolinochalconas (R2 e R14) demonstraram atividade citotóxica significativa contra linhagens de três diferentes subtipos moleculares de câncer de mama (luminal A, luminal B e triplo-negativo), tanto em modelo 2D quanto em modelo 3D de esferoides, com elevada seletividade para a linhagem-triplo negativa, subtipo molecular que atualmente possui opções terapêuticas limitadas. R2 e R14 atuam por meio de diversos mecanismos, induzindo morte celular principalmente por via extrínseca, e parada de ciclo celular em fase G0/G1, possivelmente através do aumento da expressão de p27 e subsequente redução dos níveis de CDK2. Além disso, podem desencadear estresse oxidativo e danos no DNA, como evidenciado por elevados níveis de ativação de H2AX, e comprometer as vias de reparo de DNA mediadas por ATR e CHK1. Considerando as limitações e falhas frequentes dos tratamentos oncológicos existentes, e a necessidade contínua do desenvolvimento de novos agentes antitumorais, R2 e R14 surgem como candidatos promissores, uma vez que seus mecanismos de ação diversificados podem ajudar a superar os mecanismos de resistência desenvolvidos pelas células tumorais.

As principais limitações deste estudo estão relacionadas à ausência de modelos mais avançados que possam replicar com maior precisão o microambiente tumoral e oferecer uma investigação mais detalhada da atividade antitumoral dos compostos analisados. Para superar essas limitações, os próximos passos da pesquisa incluirão a utilização de modelos tridimensionais *in vitro* mais complexos, bem como a validação dos resultados em modelos *in vivo*, permitindo a avaliação dos níveis de toxicidade desses compostos. Além disso, serão necessários ensaios moleculares adicionais para esclarecer com mais precisão os mecanismos de ação dos compostos.

REFERÊNCIAS

1. Toniatti, C., Jones, P., Graham, H., Pagliara, B. & Draetta, G. Oncology drug discovery: Planning a turnaround. *Cancer Discov* **4**, 397–404 (2014).
2. Mendelsohn, J. Personalizing Oncology: Perspectives and Prospects. *Journal of Clinical Oncology* **31**, 1904–1911 (2013).
3. Gediya, L. K. & Njar, V. C. Promise and challenges in drug discovery and development of hybrid anticancer drugs. *Expert Opin Drug Discov* **4**, 1099–1111 (2009).
4. Schirmacher, V. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *Int J Oncol* **54**, 407–419 (2018).
5. Kwiatkowski, S. *et al.* Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **106**, 1098–1107 (2018).
6. Nikolaou, M., Pavlopoulou, A., Georgakilas, A. G. & Kyrodimos, E. The challenge of drug resistance in cancer treatment: a current overview. *Clin Exp Metastasis* **35**, 309–318 (2018).
7. Ileana Dumbrava, E., Meric-Bernstam, F. & Yap, T. A. Challenges with biomarkers in cancer drug discovery and development. *Expert Opin Drug Discov* **13**, 685–690 (2018).
8. Nixon, N. A. *et al.* Drug development for breast, colorectal, and non–small cell lung cancers from 1979 to 2014. *Cancer* **123**, 4672–4679 (2017).
9. Opletalová, V. & Sedivý, D. [Chalcones and their heterocyclic analogs as potential antifungal chemotherapeutic agents]. *Ceska Slov Farm* **48**, 252–5 (1999).
10. Cai, C.-Y. *et al.* Analogues of xanthones—Chalcones and bis-chalcones as α -glucosidase inhibitors and anti-diabetes candidates. *Eur J Med Chem* **130**, 51–59 (2017).
11. Damazio, R. G. *et al.* Antihyperglycemic activity of naphthylchalcones. *Eur J Med Chem* **45**, 1332–1337 (2010).
12. Özdemir, A. *et al.* Synthesis and evaluation of new indole-based chalcones as potential antiinflammatory agents. *Eur J Med Chem* **89**, 304–309 (2015).
13. Koudokpon, H. *et al.* Antibacterial Activity of Chalcone and Dihydrochalcone Compounds from *Uvaria chamae* Roots against Multidrug-Resistant Bacteria. *Biomed Res Int* **2018**, 1–10 (2018).
14. Mellado, M. *et al.* Design, synthesis, antifungal activity, and structure–activity relationship studies of chalcones and hybrid dihydrochromane–chalcones. *Mol Divers* **24**, 603–615 (2020).
15. Sousa-Batista, A. de J. *et al.* New chalcone compound as a promising antileishmanial drug for an old neglected disease: Biological evaluation using radiolabelled biodistribution. *J Glob Antimicrob Resist* **13**, 139–142 (2018).
16. Oh, Y. J. & Seo, Y. H. A novel chalcone-based molecule, BDP inhibits MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cell growth by suppressing Hsp90 function. *Oncol Rep* **38**, 2343–2350 (2017).
17. Elkhalfa, D. *et al.* Design, synthesis, and validation of novel nitrogen-based chalcone analogs against triple negative breast cancer. *Eur J Med Chem* **187**, 111954 (2020).

18. Mohamed, M. F. A. *et al.* Design, synthesis, docking studies and biological evaluation of novel chalcone derivatives as potential histone deacetylase inhibitors. *Bioorg Chem* **72**, 32–41 (2017).
19. Chen, J., Kang, C.-Y., Niu, Z.-X., Zhou, H.-C. & Yang, H.-M. A chalcone inhibits the growth and metastasis of KYSE-4 esophageal cancer cells. *Journal of International Medical Research* **48**, 030006052092883 (2020).
20. Asif, M. Chemical Characteristics, Synthetic Methods, and Biological Potential of Quinazoline and Quinazolinone Derivatives. *Int J Med Chem* **2014**, 1–27 (2014).
21. Rakesh, K. P., Manukumar, H. M. & Gowda, D. C. Schiff's bases of quinazolinone derivatives: Synthesis and SAR studies of a novel series of potential anti-inflammatory and antioxidants. *Bioorg Med Chem Lett* **25**, 1072–1077 (2015).
22. Ugale, V. G. & Bari, S. B. Quinazolines: New horizons in anticonvulsant therapy. *Eur J Med Chem* **80**, 447–501 (2014).
23. Selvam, T., Sivakumar, A. & Prabhu, P. Design and synthesis of quinazoline carboxylates against Gram-positive, Gram-negative, fungal pathogenic strains, and Mycobacterium tuberculosis. *J Pharm Bioallied Sci* **6**, 278 (2014).
24. Mehndiratta, S., Sapra, S., Singh, G., Singh, M. & Nepali, K. Quinazolines as Apoptosis Inducers and Inhibitors: A Review of Patent Literature. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* **11**, 2–66 (2016).
25. Solyanik, G. I. Quinazoline compounds for antitumor treatment. *Exp Oncol* **41**, 3–6 (2023).
26. Cohen, M. H., Williams, G. A., Sridhara, R., Chen, G. & Pazdur, R. FDA Drug Approval Summary: Gefitinib (ZD1839) (Iressa®) Tablets. *Oncologist* **8**, 303–306 (2003).
27. Strebhardt, K. & Ullrich, A. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nat Rev Cancer* **8**, 473–480 (2008).
28. Singh, A. K. *et al.* Concept of Hybrid Drugs and Recent Advancements in Anticancer Hybrids. *Pharmaceuticals* vol. 15 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ph15091071> (2022).
29. Morphy, R. & Rankovic, Z. Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm. *Journal of Medicinal Chemistry* vol. 48 6523–6543 Preprint at <https://doi.org/10.1021/jm058225d> (2005).
30. Loch-Neckel, G. *et al.* In vitro and in vivo anti-glioma activity of a chalcone-quinoxaline hybrid. *Eur J Med Chem* **90**, 93–100 (2015).
31. Gao, F., Huang, G. & Xiao, J. Chalcone hybrids as potential anticancer agents: Current development, mechanism of action, and structure-activity relationship. *Med Res Rev* **40**, 2049–2084 (2020).
32. You, X. *et al.* Inhomogeneity of fluorescence lifetime and intensity in a plasmonic nanocavity. *Nano Today* **45**, 101548 (2022).
33. Wani, Z. A. *et al.* A novel quinazolinone chalcone derivative induces mitochondrial dependent apoptosis and inhibits PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in human colon cancer HCT-116 cells. *Food and Chemical Toxicology* **87**, 1–11 (2016).
34. Silva-Oliveira, R. J. *et al.* Cytotoxicity of allitinib, an irreversible anti-EGFR agent, in a large panel of human cancer-derived cell lines: KRAS mutation status as a predictive biomarker. *Cellular oncology (Dordrecht, Netherlands)* **39**, 253–63 (2016).

35. National Cancer Institute (NCI). NCI-60 Human Cancer Cell Line Screen. *NCI-60 Screening Methodology - DTP Developmental Therapeutics Program* (2021).
36. Lipinski, C. A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov Today Technol* **1**, 337–341 (2004).
37. Suffness, M. & Pezzuto, J. M. Assays related to cancer drug discovery. in *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity* (ed. Hostettmann, K.) vol. 6 71–133 (Academic Press, 1991).
38. Varma, M. V. S. *et al.* Physicochemical space for optimum oral bioavailability: contribution of human intestinal absorption and first-pass elimination. *J Med Chem* **53**, 1098–108 (2010).
39. Amani, J. *et al.* Cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKIs) and the DNA damage response: The link between signaling pathways and cancer. *DNA Repair (Amst)* **102**, (2021).
40. Thiriveedhi, A., Nadh, R. V., Srinivasu, N. & Kaushal, K. Novel Hybrid Molecules of Quinazoline Chalcone Derivatives: Synthesis and Study of in vitro Cytotoxic Activities. *Lett Drug Des Discov* **15**, 757–765 (2017).
41. Mansour, M. A., AboulMagd, A. M., Abbas, S. H., Abdel-Aziz, M. & Abdel-Rahman, H. M. Quinazoline-chalcone hybrids as HDAC/EGFR dual inhibitors: Design, synthesis, mechanistic, and in-silico studies of potential anticancer activity against multiple myeloma. *Arch Pharm (Weinheim)* **357**, (2024).
42. Bickerton, G. R., Paolini, G. V., Besnard, J., Muresan, S. & Hopkins, A. L. Quantifying the chemical beauty of drugs. *Nat Chem* **4**, 90–8 (2012).
43. Varma, M. V. S. *et al.* Physicochemical space for optimum oral bioavailability: contribution of human intestinal absorption and first-pass elimination. *J Med Chem* **53**, 1098–108 (2010).
44. Lovering, F., Bikker, J. & Humblet, C. Escape from flatland: increasing saturation as an approach to improving clinical success. *J Med Chem* **52**, 6752–6 (2009).
45. Wang, N.-N. *et al.* ADME Properties Evaluation in Drug Discovery: Prediction of Caco-2 Cell Permeability Using a Combination of NSGA-II and Boosting. *J Chem Inf Model* **56**, 763–73 (2016).
46. Irvine, J. D. *et al.* MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: A tool for membrane permeability screening. *J Pharm Sci* **88**, 28–33 (1999).
47. Fletcher, J. I., Haber, M., Henderson, M. J. & Norris, M. D. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nat Rev Cancer* **10**, 147–56 (2010).
48. Howard, M. L., Hill, J. J., Galluppi, G. R. & McLean, M. A. Plasma protein binding in drug discovery and development. *Comb Chem High Throughput Screen* **13**, 170–87 (2010).
49. van den Anker, J., Reed, M. D., Allegaert, K. & Kearns, G. L. Developmental Changes in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *J Clin Pharmacol* **58 Suppl 10**, S10–S25 (2018).
50. de Graaf, C., Vermeulen, N. P. E. & Feenstra, K. A. Cytochrome p450 in silico: an integrative modeling approach. *J Med Chem* **48**, 2725–55 (2005).
51. Grogan, S. & Preuss, C. V. *Pharmacokinetics*. (2024).
52. Wang, S., Li, Y., Xu, L., Li, D. & Hou, T. Recent developments in computational prediction of HERG blockage. *Curr Top Med Chem* **13**, 1317–26 (2013).
53. Mortelmans, K. & Zeiger, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res* **455**, 29–60 (2000).

54. Han, W. *et al.* Design, synthesis and anticancer activity evaluation of 4-(3-1H-indazolyl)amino quinazoline derivatives as PAK4 inhibitors. *Bioorg Med Chem* **95**, (2023).
55. Wani, Z. A. *et al.* Anticancer activity of a novel quinazolinone-chalcone derivative through cell cycle arrest in pancreatic cancer cell line. *J Solid Tumors* **5**, (2015).
56. Madhavi, S., Sreenivasulu, R., Yazala, J. P. & Raju, R. R. Synthesis of chalcone incorporated quinazoline derivatives as anticancer agents. *Saudi Pharmaceutical Journal* **25**, 275–279 (2017).
57. Oggu, S., Mallavarapu, B. D., Natarajan, P., Malempati, S. & Gundla, R. Synthesis, Cytotoxicity and Molecular Docking Studies of Chalcone Incorporated 1,2,3-Triazol-1,3,5-Triazin-Quinazoline as Anti-Cancer Agents. *J Mol Struct* **1266**, (2022).
58. Niu, Z., Ma, S., Zhang, L., Liu, Q. & Zhang, S. Discovery of Novel Quinazoline Derivatives as Potent Antitumor Agents. *Molecules* **27**, (2022).
59. Hisham, M. *et al.* Structure-based design, synthesis and antiproliferative action of new quiazoline-4-one/chalcone hybrids as EGFR inhibitors. *J Mol Struct* **1254**, (2022).
60. Hisham, M. *et al.* Design, Synthesis, and Antiproliferative Activity of Quinazolin-4-One/Chalcone Hybrids via the EGFR Inhibition Pathway. *Anticancer Agents Med Chem* **23**, 1932–1943 (2023).
61. Abdelkhalek, A. S., Kothayer, H., Soltan, M. K., Ibrahim, S. M. & Elbaramawi, S. S. Novel 2-[thio]acetamide linked quinazoline/1,2,4-triazole/chalcone hybrids: Design, synthesis, and anticancer activity as EGFR inhibitors and apoptotic inducers. *Arch Pharm (Weinheim)* **357**, (2024).
62. Murányi, J. *et al.* Novel Erlotinib–Chalcone Hybrids Diminish Resistance in Head and Neck Cancer by Inducing Multiple Cell Death Mechanisms. *Int J Mol Sci* **24**, (2023).
63. Dan, V. M., Raveendran, R. S. & Baby, S. Resistance to Intervention: Paclitaxel in Breast Cancer. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **21**, 1237–1268 (2020).
64. Sirenko, O. *et al.* High-Content Assays for Characterizing the Viability and Morphology of 3D Cancer Spheroid Cultures. *Assay Drug Dev Technol* **13**, 402–414 (2015).
65. Zhao, Y. *et al.* Three-dimensional printing of Hela cells for cervical tumor model in vitro. *Biofabrication* **6**, (2014).
66. Amaral, R. L. F., Miranda, M., Marcato, P. D. & Swiech, K. Comparative analysis of 3D bladder tumor spheroids obtained by forced floating and hanging drop methods for drug screening. *Front Physiol* **8**, (2017).
67. Liu, Q. *et al.* Cancer cells growing on perfused 3D collagen model produced higher reactive oxygen species level and were more resistant to cisplatin compared to the 2D model. *J Appl Biomater Funct Mater* **16**, 144–150 (2018).
68. Filipiak-Duliban, A., Brodaczewska, K., Kajdasz, A. & Kieda, C. Spheroid Culture Differentially Affects Cancer Cell Sensitivity to Drugs in Melanoma and RCC Models. *Int J Mol Sci* **23**, (2022).
69. Eugin Simon, S. *et al.* New synthetic phenylquinazoline derivatives induce apoptosis by targeting the pro-survival members of the BCL-2 family. *Bioorg Med Chem Lett* **67**, (2022).
70. Mortazavi, M. *et al.* Novel quinazoline-1,2,3-triazole hybrids with anticancer and MET kinase targeting properties. *Sci Rep* **13**, (2023).

71. Li, M. *et al.* Design, Synthesis and Biological Evaluation of 6-(Imidazo[1,2-a]pyridin-6-yl)quinazoline Derivatives as Anticancer Agents via PI3K α Inhibition. *Int J Mol Sci* **24**, (2023).
72. Lee, H. K. *et al.* Erlotinib activates different cell death pathways in EGFR-mutant lung cancer cells grown in 3D Versus 2D culture systems. *Anticancer Res* **41**, 1261–1269 (2021).
73. Betriu, N., Andreeva, A. & Semino, C. E. Erlotinib promotes ligand-induced EGFR degradation in 3D but not 2D cultures of pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Cancers (Basel)* **13**, (2021).
74. Russell, S., Wojtkowiak, J., Neilson, A. & Gillies, R. J. Metabolic Profiling of healthy and cancerous tissues in 2D and 3D. *Sci Rep* **7**, (2017).
75. Clémence, D. *et al.* Development and Cytotoxic Response of Two Proliferative MDA-MB-231 and Non-Proliferative SUM1315 Three-Dimensional Cell Culture Models of Triple-Negative Basal-like Breast Cancer Cell Lines. vol. 8 www.impactjournals.com/oncotarget (2017).
76. Li, Q., Chow, A. B. & Mattingly, R. R. Three-dimensional overlay culture models of human breast cancer reveal a critical sensitivity to mitogen-activated protein kinase kinase inhibitors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **332**, 821–828 (2010).
77. Muguruma, M. *et al.* Differences in drug sensitivity between two-dimensional and three-dimensional culture systems in triple-negative breast cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* **533**, 268–274 (2020).
78. Malhão, F., Macedo, A. C., Ramos, A. A. & Rocha, E. Morphometrical, Morphological, and Immunocytochemical Characterization of a Tool for Cytotoxicity Research: 3D Cultures of Breast Cell Lines Grown in Ultra-Low Attachment Plates. *Toxics* **10**, (2022).
79. Sethy, C. & Kundu, C. N. 5-Fluorouracil (5-FU) resistance and the new strategy to enhance the sensitivity against cancer: Implication of DNA repair inhibition. *Biomedicine and Pharmacotherapy* vol. 137 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111285> (2021).
80. Bitter, E. E., Townsend, M. H., Erickson, R., Allen, C. & O'Neill, K. L. Thymidine kinase 1 through the ages: a comprehensive review. *Cell and Bioscience* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00493-1> (2020).
81. Topolcan, O. & Holubec, L. The role of thymidine kinase in cancer diseases. *Expert Opin Med Diagn* **2**, 129–41 (2008).
82. Kamal, A. *et al.* Synthesis and anti-cancer activity of chalcone linked imidazolones. *Bioorg Med Chem Lett* **20**, 4865–4869 (2010).
83. Mohamed, M., Mohamed, M., Fathi, M., Shouman, S. & Abdelhamid, I. Chalcones Incorporated Pyrazole Ring Inhibit Proliferation, Cell Cycle Progression, Angiogenesis and Induce Apoptosis of MCF7 Cell Line. *Anticancer Agents Med Chem* **14**, 1282–1292 (2014).
84. Zhang, Y. *et al.* Enrichment of novel quinazoline derivatives with high antitumor activity in mitochondria tracked by its self-fluorescence. *Eur J Med Chem* **178**, 417–432 (2019).
85. Nunes, P. S. G. *et al.* Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of novel 1,2,3-triazole-quinazolines as antiproliferative agents displaying ERK inhibitory activity. *Bioorg Chem* **113**, (2021).

86. Zheng, H. *et al.* Quinazoline-based hydroxamic acid derivatives as dual histone methylation and deacetylation inhibitors for potential anticancer agents. *Bioorg Med Chem* **53**, (2022).
87. He, P. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of structurally new 4-indolyl quinazoline derivatives as highly potent, selective and orally bioavailable EGFR inhibitors. *Bioorg Chem* **142**, (2024).
88. Kello, M. *et al.* Chalcone derivatives cause accumulation of colon cancer cells in the G2/M phase and induce apoptosis. *Life Sci* **150**, 32–38 (2016).
89. Takac, P. *et al.* New chalcone derivative exhibits antiproliferative potential by inducing G2/M cell cycle arrest, mitochondrial-mediated apoptosis and modulation of MAPK signalling pathway. *Chem Biol Interact* **292**, 37–49 (2018).
90. Shi, H. *et al.* A novel quinazoline-based analog induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human A549 lung cancer cells via a ROS-dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* **486**, 314–320 (2017).
91. Abuelizz, H. A. *et al.* Antiproliferative and antiangiogenic properties of new VEGFR-2-targeting 2-thioxobenzo[g]quinazoline derivatives (In Vitro). *Molecules* **25**, (2021).
92. Chen, X. Z. *et al.* Water extract of *Hedyotis Diffusa* Willd suppresses proliferation of human HepG2 cells and potentiates the anticancer efficacy of low-dose 5-fluorouracil by inhibiting the CDK2-E2F1 pathway. *Oncol Rep* **28**, 742–748 (2012).
93. Chong, D. *et al.* Synergistic antitumor effect of 3-bromopyruvate and 5-fluorouracil against human colorectal cancer through cell cycle arrest and induction of apoptosis. *Anticancer Drugs* **28**, 831–840 (2017).
94. Kumar Yata, V. *et al.* *In Silico* Methods Reconfirm CDK2 as a Potential Molecular Target of 5-Fluorouracil. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* vol. 53.
95. Mohammed, E. R. & Elmasry, G. F. Development of newly synthesised quinazolinone-based CDK2 inhibitors with potent efficacy against melanoma. *J Enzyme Inhib Med Chem* **37**, 686–700 (2022).
96. Ibrahim, B. T., Allam, H. A., El-Dydamony, N. M., Fouad, M. A. & Mohammed, E. R. Exploring new quinazolin-4(3H)-one derivatives as CDK2 inhibitors: Design, synthesis, and anticancer evaluation. *Drug Dev Res* **85**, (2024).
97. Hu, X. *et al.* Synthesis and biological evaluation of novel 5,6-dihydropyrimido[4,5-f]quinazoline derivatives as potent CDK2 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **28**, 3385–3390 (2018).
98. Joshi, A. J. *et al.* Cinnamamide-chalcone derivatives as CDK2 inhibitors: synthesis, pharmacological evaluation, and molecular modelling study. *Journal of the Iranian Chemical Society* **19**, 4445–4455 (2022).
99. Joshi, A. *et al.* Evaluation of Benzamide-Chalcone Derivatives as EGFR/CDK2 Inhibitor: Synthesis, In-Vitro Inhibition, and Molecular Modeling Studies. *Anticancer Agents Med Chem* **22**, 328–343 (2021).
100. Farghaly, T. A., Masaret, G. S., Muhammad, Z. A. & Harras, M. F. Discovery of thiazole-based-chalcones and 4-hetarylthiazoles as potent anticancer agents: Synthesis, docking study and anticancer activity. *Bioorg Chem* **98**, (2020).
101. Murphy, C. G. & Dickler, M. N. The Role of CDK4/6 Inhibition in Breast Cancer. *Oncologist* **20**, 483–490 (2015).
102. Gerosa, R. *et al.* Cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) inhibitors and others novel CDK inhibitors (CDKi) in breast cancer: clinical trials, current impact, and future

- directions. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* vol. 196 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2024.104324> (2024).
103. Razavipour, S. F., Harikumar, K. B. & Slingerland, J. M. P27 as a transcriptional regulator: New roles in development and cancer. *Cancer Research* vol. 80 3451–3458 Preprint at <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-3663> (2020).
 104. Cai, Z. *et al.* The Skp2 Pathway: A Critical Target for Cancer Therapy. *Seminars in Cancer Biology* vol. 67 16–33 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.01.013> (2020).
 105. Byun, W. S. *et al.* Antitumor Activity of Ohmyungsamycin A through the Regulation of the Skp2-p27 Axis and MCM4 in Human Colorectal Cancer Cells. *J Nat Prod* **83**, 118–126 (2020).
 106. Huang, R. X. & Zhou, P. K. DNA damage response signaling pathways and targets for radiotherapy sensitization in cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy* vol. 5 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0150-x> (2020).
 107. Jung, C. *et al.* Antitumor Activity of Americanin A Isolated from the Seeds of *Phytolacca americana* by Regulating the ATM/ATR Signaling Pathway and the Skp2-p27 Axis in Human Colon Cancer Cells. *J Nat Prod* **78**, 2983–2993 (2015).
 108. Engeland, K. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death and Differentiation* vol. 29 946–960 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41418-022-00988-z> (2022).
 109. Şandor, A. *et al.* Structure–Activity Relationship Studies Based on Quinazoline Derivatives as EGFR Kinase Inhibitors (2017–Present). *Pharmaceuticals* vol. 16 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ph16040534> (2023).
 110. Musa, A. *et al.* EGFR and COX-2 Dual Inhibitor: The Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Chalcones. *Molecules* **27**, (2022).
 111. Li, E. dong *et al.* 2,4-Disubstituted quinazolines targeting breast cancer cells via EGFR-PI3K. *Eur J Med Chem* **172**, 36–47 (2019).
 112. Al-Obeed, O. *et al.* Novel quinazoline-based sulfonamide derivative (3D) induces apoptosis in colorectal cancer by inhibiting JAK2-STAT3 pathway. *Onco Targets Ther* **11**, 3313–3322 (2018).
 113. Taylor-Harding, B. *et al.* *Cyclin E1 and RTK/RAS Signaling Drive CDK Inhibitor Resistance via Activation of E2F and ETS.* vol. 6 www.impactjournals.com/oncotarget.
 114. Yue, J. & López, J. M. Understanding MAPK signaling pathways in apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 21 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms21072346> (2020).
 115. Kist, M. & Vucic, D. Cell death pathways: intricate connections and disease implications. *EMBO J* **40**, (2021).
 116. Kashyap, D., Garg, V. K. & Goel, N. Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. in *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* vol. 125 73–120 (Academic Press Inc., 2021).
 117. Zahedifard, M. *et al.* Synthesis, characterization and apoptotic activity of quinazolinone Schiff base derivatives toward MCF-7 cells via intrinsic and extrinsic apoptosis pathways. *Sci Rep* **5**, (2015).
 118. Nowar, R. M., Osman, E. E. A., Abou-Seri, S. M., El Moghazy, S. M. & Abou El Ella, D. A. Design, synthesis and biological evaluation of some novel quinazolinone

- derivatives as potent apoptotic inducers. *Future Med Chem* **10**, 1191–1205 (2018).
119. Alioglu, I., Cinar-Asa, S., Coskun, D. & Ari, F. Benzofuran Substituted Chalcone Derivatives Trigger Apoptotic Cell Death Through Extrinsic Pathway in Human Lung and Breast Cancer Cells. *Iranian Journal of Science* **47**, 1057–1069 (2023).
 120. Rodríguez, I. *et al.* Apoptosis pathways triggered by a potent antiproliferative hybrid chalcone on human melanoma cells. *Int J Mol Sci* **22**, (2021).
 121. Ismail, N. Z., Khairuddean, M., Al-Anazi, M. & Arsad, H. Tri-chalcone suppressed breast cancer cell proliferation and induced apoptosis through intrinsic and extrinsic pathways. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* (2024) doi:10.1007/s00210-024-03220-6.
 122. Nandi, A., Yan, L. J., Jana, C. K. & Das, N. Role of Catalase in Oxidative Stress- And Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev* **2019**, (2019).
 123. Trougakos, I. P. & Gonos, E. S. Oxidative stress in malignant progression: The role of clusterin, a sensitive cellular biosensor of free radicals. *Advances in Cancer Research* vol. 104 171–210 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(09\)04009-3](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(09)04009-3) (2009).
 124. Priya Dharshini, L. C., Vishnupriya, S., Sakthivel, K. M. & Rasmi, R. R. Oxidative stress responsive transcription factors in cellular signalling transduction mechanisms. *Cell Signal* **72**, (2020).
 125. Hayes, J. D., Dinkova-Kostova, A. T. & Tew, K. D. Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell* vol. 38 167–197 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.06.001> (2020).
 126. De, A. K. *et al.* A natural quinazoline derivative from marine sponge *hyrtios erectus* induces apoptosis of breast cancer cells via ROS production and intrinsic or extrinsic apoptosis pathways. *Mar Drugs* **17**, (2019).
 127. Wang, R. *et al.* The quinazoline derivative, 04NB-03, induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocellular carcinoma cells in a reactive oxygen species-dependent manner. *Chem Biol Interact* **338**, (2021).
 128. Kang, N. *et al.* Inhibition of EGFR signaling augments oridonin-induced apoptosis in human laryngeal cancer cells via enhancing oxidative stress coincident with activation of both the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. *Cancer Lett* **294**, 147–158 (2010).
 129. Banerjee, K. *et al.* Induction of intrinsic and extrinsic apoptosis through oxidative stress in drug-resistant cancer by a newly synthesized Schiff base copper chelate. *Free Radic Res* **50**, 426–446 (2016).
 130. Bo, W. & Zhao, X. H. Apigenin induces both intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis in human colon carcinoma HCT-116 cells. *Oncol Rep* **37**, 1132–1140 (2017).
 131. Arfin, S. *et al.* Oxidative stress in cancer cell metabolism. *Antioxidants* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.3390/antiox10050642> (2021).
 132. Kryston, T. B., Georgiev, A. B., Pissis, P. & Georgakilas, A. G. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* vol. 711 193–201 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2010.12.016> (2011).
 133. Yan, S., Sorrell, M. & Berman, Z. Functional interplay between ATM/ATR-mediated DNA damage response and DNA repair pathways in oxidative stress.

- Cellular and molecular life sciences: CMLS* vol. 71 3951–3967 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1666-4> (2014).
134. Barzilai, A. & Yamamoto, K. I. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair* vol. 3 1109–1115 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.03.002> (2004).
 135. Blackford, A. N. & Jackson, S. P. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Molecular Cell* vol. 66 801–817 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.015> (2017).
 136. Smith, J., Tho, L. M., Xu, N. & Gillespie, D. A. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 Pathways in DNA Damage Signaling and Cancer. (2010) doi:10.1016/S0065-230X(10)08002-4.
 137. Prabhu, K. S. *et al.* H2AX: A key player in DNA damage response and a promising target for cancer therapy. *Biomedicine and Pharmacotherapy* vol. 175 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.116663> (2024).
 138. Sharma, A., Singh, K. & Almasan, A. Histone H2AX phosphorylation: A marker for DNA damage. *Methods in Molecular Biology* **920**, 613–626 (2012).
 139. Groelly, F. J., Fawkes, M., Dagg, R. A., Blackford, A. N. & Tarsounas, M. Targeting DNA damage response pathways in cancer. *Nature Reviews Cancer* vol. 23 78–94 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41568-022-00535-5> (2023).
 140. Reuvers, T. G. A., Kanaar, R. & Nonnekens, J. DNA damage-inducing anticancer therapies: From global to precision damage. *Cancers* vol. 12 1–21 Preprint at <https://doi.org/10.3390/cancers12082098> (2020).
 141. Davis, J. D. DNA damage and breast cancer. *World J Clin Oncol* **2**, 329 (2011).
 142. Mirza-Aghazadeh-Attari, M. *et al.* DNA damage response and breast cancer development: Possible therapeutic applications of ATR, ATM, PARP, BRCA1 inhibition. *DNA Repair (Amst)* **98**, (2021).
 143. Lecona, E. & Fernandez-Capetillo, O. Targeting ATR in cancer. *Nat Rev Cancer* **18**, 586–595 (2018).
 144. Lloyd, R. L. *et al.* Combined PARP and ATR inhibition potentiates genome instability and cell death in ATM-deficient cancer cells. *Oncogene* **39**, 4869–4883 (2020).
 145. Rafiei, S. *et al.* ATM Loss Confers Greater Sensitivity to ATR Inhibition Than PARP Inhibition in Prostate Cancer. *Cancer Res* **80**, 2094–2100 (2020).
 146. Nishida, H. *et al.* Inhibition of ATR protein kinase activity by schisandrin B in DNA damage response. *Nucleic Acids Res* **37**, 5678–5689 (2009).
 147. Yano, K. & Shiotani, B. Emerging strategies for cancer therapy by ATR inhibitors. *Cancer Science* vol. 114 2709–2721 Preprint at <https://doi.org/10.1111/cas.15845> (2023).
 148. Wu, Q. *et al.* Oleandrin enhances radiotherapy sensitivity in lung cancer by inhibiting the <scp>ATM</scp> / <scp>ATR</scp> -mediated <scp>DNA</scp> damage response. *Phytotherapy Research* **38**, 4151–4167 (2024).
 149. Sheng, H. *et al.* ATR inhibitor AZD6738 enhances the antitumor activity of radiotherapy and immune checkpoint inhibitors by potentiating the tumor immune microenvironment in hepatocellular carcinoma. *J Immunother Cancer* **8**, (2020).
 150. Yang, S. H. *et al.* Perspectives on the combination of radiotherapy and targeted therapy with DNA repair inhibitors in the treatment of pancreatic cancer. *World*

- Journal of Gastroenterology* vol. 22 7275–7288 Preprint at <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i32.7275> (2016).
151. Tu, X. *et al.* ATR inhibition is a promising radiosensitizing strategy for triple-negative breast cancer. *Mol Cancer Ther* **17**, 2462–2472 (2018).
 152. Guney Eskiler, G. *et al.* The ATR inhibition by Elimusertib enhances the radiosensitivity of MDA-MB-231 triple negative breast cancer in vitro. *Int J Radiat Biol* **100**, 715–723 (2024).
 153. Kciuk, M., Gielecińska, A., Mujwar, S., Mojzych, M. & Kontek, R. Cyclin-dependent kinases in DNA damage response. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* vol. 1877 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2022.188716> (2022).