

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
CAMPUS GOVERNADOR VALADARES
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR

Larissa Moura de Matos Franco

Estudos *in silico* e *in vitro* de novos candidatos a fármaco anticâncer

Governador Valadares

2025

Larissa Moura de Matos Franco

Estudos *in silico* e *in vitro* de novos candidatos a fármaco anticâncer

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal de Juiz de Fora – *Campus* Governador Valadares, para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular. Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. João Eustáquio Antunes

Governador Valadares

2025

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Franco, Larissa Moura de Matos.

Estudos in silico e in vitro de novos candidatos a fármaco anticâncer / Larissa Moura de Matos Franco. -- 2025.
75 p.

Orientador: João Eustáquio Antunes

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Avançado de Governador Valadares, Instituto de Ciências da Vida - ICV. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, 2025.

1. glioblastoma multiforme. 2. câncer de mama. 3. quinazolininas. 4. fármaco anticâncer. I. Antunes, João Eustáquio, orient. II. Título.

Larissa Moura de Matos Franco

Estudos in silico e in vitro de novos candidatos a fármaco anticâncer

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular, Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

Aprovada em 10 de fevereiro de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr. João Eustáquio Antunes - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof.Dr. Matheus Puggina de Freitas

Universidade Federal de Lavras

Profa.Dra. Gabriella Freitas Ferreira

Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora, 07/01/2025.



Documento assinado eletronicamente por **Joao Eustaquio Antunes, Professor(a)**, em 10/02/2025, às 18:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gabriella Freitas Ferreira, Professor(a)**, em 10/02/2025, às 19:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Matheus Puggina de Freitas, Usuário Externo**, em 11/02/2025, às 07:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **2180005** e o código CRC **D109A060**.

AGRADECIMENTOS

Á Deus pela oportunidade de realizar o mestrado que sempre foi um sonho para mim, a Ele toda honra por essa conquista. Ele sempre esteve comigo e me sustentou em todos os momentos.

Ao meu marido Matheus por todo companheirismo, apoio, incentivo e compreensão durante esse período, obrigada por sempre me ouvir, me aconselhar, por ter me dado força em tantos momentos e ter tornado tudo mais leve.

Aos meus pais Juscelino e Etiane por acreditarem tanto em mim, por serem um lugar de abrigo e aconchego. Obrigada por todas as orações, todas as palavras de sabedoria e todo amor que sempre me dão.

Aos meus irmãos Victor e Larah pela cumplicidade, por sempre estarem dispostos a me ajudar, me ouvir e me apoiar. Vocês me dão força quando mais preciso.

Ao meu orientador João Antunes pela oportunidade de participar desse projeto, pela orientação, disponibilidade e dedicação. Foi uma experiência muito enriquecedora, e grande parte disso se deve ao ambiente de respeito e leveza que você sempre proporcionou.

Á Michelle Antunes, por todos os ensinamentos no laboratório, pela sua paciência em ensinar cada passo a passo, e por tanta dedicação. Obrigada por ter proporcionado uma experiência tão boa durante todo esse período, você é uma inspiração para mim.

Ao professor Jeferson Gomes pela colaboração no trabalho, e por todo o tempo dedicado para tirar minhas dúvidas e me direcionar em vários momentos durante esse tempo. Á professora Sandra Bertelli pela colaboração nos experimentos e contribuição para este trabalho.

Á UFJF e aos professores do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular pelos ensinamentos transmitidos.

Á FAPEMIG pela bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro (APQ 01789-21 e APQ 02506-22) a este projeto de pesquisa.

RESUMO

Câncer é um termo utilizado para um grupo de doenças malignas com elevada complexidade e que representam um importante problema de saúde pública. O Glioblastoma Multiforme (GBM) é um tumor do sistema nervoso central, com características biológicas agressivas e de alto poder de invasividade. Sabe-se que GBM possui resistência biológica a várias classes de agentes quimioterápicos, sendo o fármaco temozolomida (TMZ) o mais utilizado para o tratamento. Outro tipo de câncer que representa um desafio significativo para a saúde global é o câncer de mama por ser o câncer mais frequentemente diagnosticado no mundo e a principal causa de mortalidade por essa doença entre as mulheres. A busca por fármacos eficazes para o tratamento de câncer que seja seletivo para células cancerosas é um desafio para a comunidade científica. Nesse cenário, a pesquisa por novos fármacos anticâncer se faz necessária, a fim de se obter terapias mais eficazes e que apresentem menos reações adversas. O objetivo geral deste estudo foi selecionar, sintetizar e testar novas quinazolininas candidatas a fármacos anticâncer e avaliar a atividade antitumoral nas linhagens tumorais de GBM (U87-MG e T98G) e de câncer de mama (MCF-7). Para isso, foram realizados estudos computacionais que corroboraram para seleção de moléculas promissoras com bons parâmetros farmacocinéticos para serem sintetizadas. Um teste *in vitro* inicial foi realizado para uma triagem das moléculas sintetizadas para avaliar a capacidade de inibição da viabilidade celular em linhagens tumorais de glioblastoma. Duas moléculas denominadas KDY3 e KDY23 foram as mais promissoras e a quinazolinina KDY3 foi explorada neste estudo. A inibição da viabilidade celular promovida por KDY3 em linhagens de GBM e câncer de mama foi significativamente maior do que a promovida pela temozolomida (TMZ) e doxorrubicina (DOXO) que são fármacos de referência para tratamento de GBM e câncer de mama. A análise de expressão diferencial de genes envolvidos em vias de sobrevivência celular demonstrou que KDY3 age por mecanismos diferentes do fármaco TMZ. Portanto, KDY3 pode ser considerado um promissor candidato a fármaco para tratamento de GBM e câncer de mama.

Palavras-chave: glioblastoma multiforme, câncer de mama, quinazolininas, fármaco anticâncer

ABSTRACT

Cancer is a term used for a group of highly complex malignant diseases that represent an important public health problem. Glioblastoma Multiforme (GBM) is a tumor of the central nervous system, with aggressive biological characteristics and high invasiveness. It is known that GBM has biological resistance to several classes of chemotherapy agents, with the drug temozolomide (TMZ) being the most used for treatment. Another type of cancer that represents a significant challenge to global health is breast cancer as it is the most frequently diagnosed cancer in the world and the leading cause of mortality from this disease among women. The search for effective drugs for the treatment of cancer that are selective for cancer cells is a challenge for the scientific community. In this scenario, research for new anticancer drugs is necessary in order to obtain more effective therapies that present fewer adverse reactions. The general objective of this study was to select, synthesize and test new quinazoline candidates for anticancer drugs and evaluate antitumor activity in GBM (U87-MG and T98G) and breast cancer (MCF-7) tumor lines. For this, computational studies were carried out that corroborated the selection of promising molecules with good pharmacokinetic parameters to be synthesized. An initial *in vitro* test was carried out to screen the synthesized molecules to evaluate their ability to inhibit cell viability in glioblastoma tumor lines. Two molecules called KDY3 and KDY23 were the most promising and quinazoline KDY3 was explored in this study. The inhibition of cell viability promoted by KDY3 in GBM and breast cancer lines was significantly greater than that promoted by temozolomide (TMZ) and doxorubicin (DOXO), which are reference drugs for treatment of GBM and breast cancer. Differential expression analysis of genes involved in cell survival pathways demonstrated that KDY3 acts through different mechanisms than the drug TMZ. Therefore, KDY3 can be considered a promising drug candidate for the treatment of GBM and breast cancer.

Keywords: glioblastoma multiforme, breast cancer, quinazolines, anticancer drug

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura química da temozolomida.....	19
Figura 2	Estrutura química das quinazolinas.....	24
Figura 3	Procedimento de ciclização para derivados de 4-(3H)-quinazolinonas.....	28
Figura 4	Esquema da formação dos derivados quinazolin-4-onas.....	30
Figura 5	Esquema das etapas para formação de derivados de cloroquinazolinas e aminoquinazolinas.....	30
Figura 6	Esquema das estruturas químicas dos derivados quinazolínicos propostas para a síntese.....	39
Figura 7	Espectros de infravermelho da molécula KDY3 sintetizada.....	41
Figura 8	Espectro de RMN ¹ H de KDY3 em DMSO d ₆ com suas atribuições.....	43
Figura 9	Viabilidade celular das células de GBM (U87-MG) após tratamento com KDYS.....	44
Figura 10	Viabilidade celular das células de GBM (T98G) após tratamento com precursores de KDY3.....	46
Figura 11	Dose resposta de KDY3 em linhagem de glioblastoma (U87-MG).....	47
Figura 12	Imagens das células de glioblastoma (U87-MG) após tratamento por 24 horas com (A) DMSO, (B) KDY3 na concentração de 50 µM e (C) TMZ em 400 µM.....	48
Figura 13	IC ₅₀ de KDY3 em linhagem tumoral de glioblastoma (U87-MG).....	49
Figura 14	Dose resposta de KDY3 em linhagem de glioblastoma (T98G).....	50
Figura 15	Imagens das células de glioblastoma (T98G) após tratamento por 24 horas com (A) DMSO, (B) KDY3 na concentração de 50 µM e (C) TMZ em 400 µM.....	51

Figura 16	IC ₅₀ de KDY3 em linhagem tumoral de glioblastoma (T98G).52
Figura 17	Dose resposta de KDY3 em linhagem tumoral de câncer de mama (MCF-7).....53
Figura 18	Dose resposta de KDY3 em linhagem não tumoral de macrófagos (<i>JTT4.A1</i>).....55
Figura 19	Avaliação da expressão gênica dos genes <i>EGFR</i> , <i>PI3K</i> , <i>AKT-1</i> , <i>mTOR</i> e <i>Src</i> após tratamento das células T98G com KDY3....58
Figura 20	Esquema ilustrativo da via EGFR.....20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sequência de nucleotídeos utilizados na reação de qRT-PCR.....	36
Tabela 2	Características químicas dos precursores e dos produtos obtidos na síntese.....	40
Tabela 3	Quantificação de RNA total e razão da absorbância A260nm/A280nm.....	56

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AKT	AKT serina/treonina quinase 1
ATP	Adenosina trifosfato
BHE	Barreira hematoencefálica
cDNA	DNA complementar
EMA	European Medicines Agency
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOXO	Doxorrubicina
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
FAK	Quinase de Adesão Focal
FDA	Food and Drug Administration
GBM	Glioblastoma multiforme
GTP	Trifosfato de guanosina
IC ₅₀ I	Concentração inibitória
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MCF-7	Linhagem celular de câncer de mama
MGMT	Metilguanina-metil transferase
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	Alvo mamífero da rapamicina
MTT	Brometo de dimetiltiazol difeniltetrazólio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação polimerase em cadeia
PDB	Banco de dados de proteína
PI3K	Fosfoinosítídeo 3 quinase
QSAR	relações quantitativas de estrutura-atividade
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucléico
RTG	Ressecção total bruta
RTQ	Receptores de tirosina quinase
Src	Tirosina quinase
SNC	Sistema nervoso central

TMZ	Temozolomida
T98G	Linhagem celular de glioblastoma
U87-MG	Linhagem celular de glioblastoma
3D	Estrutura tridimensional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS.....	14
1.2 CÂNCER	16
1.3 GLIOBLASTOMA.....	17
1.4 CÂNCER DE MAMA.....	21
1.5 QUINAZOLINAS	23
2 JUSTIFICATIVA.....	26
3 OBJETIVO GERAL	27
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 ESTUDOS <i>IN SILICO</i>	28
4.2 SÍNTESE DE MOLÉCULAS MAIS PROMISSORAS	29
4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	31
4.3.1 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FTIR)	31
4.3.2 Análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	31
4.4 CULTURA CELULAR	31
4.5 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	33
4.5.1 Avaliação da atividade antitumoral em linhagens de glioblastoma, câncer de mama e linhagem não tumoral	33
4.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	34
4.6.1 Extração de RNA total	34
4.6.2 Quantificação das amostras de RNA total	35
4.6.3 Análise da expressão de transcritos por PCR em Tempo Real	35
4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 ESTUDOS <i>IN SILICO</i>	38
5.2 SÍNTESE DE MOLÉCULAS MAIS PROMISSORAS	39
5.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	40
5.3.1 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	40
5.3.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H e Ponto de fusão ..	42
5.4 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	43

5.4.1 Ensaio de viabilidade celular com linhagem de glioblastoma após tratamento com os compostos KDYs sintetizados	43
5.4.2 Ensaio de viabilidade celular com linhagem de glioblastoma após tratamento com os precursores de KDY3.....	46
5.4.3 Avaliação do efeito dose-resposta de KDY3 na viabilidade celular em linhagens de glioblastoma	47
5.4.4 Avaliação do efeito dose-resposta de KDY3 na viabilidade celular em linhagem de câncer de mama.....	52
5.4.5 Avaliação do efeito dose-resposta de KDY3 na viabilidade celular em linhagem não tumoral (J774.A1)	54
5.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	56
5.5.1 Avaliação de expressão gênica das células T98G após tratamento com KDY3.....	56
6 CONCLUSÃO	62
7 REFERÊNCIAS	63
APÊNDICE A – KDY3 e testes <i>in silico</i>	71
APÊNDICE B – Patente das moléculas KDY3 e KDY23.....	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS

O processo de descoberta e aprovação de novos fármacos pode ser dividido em quatro etapas que são conhecidas como: descoberta, realização dos testes pré-clínicos, ensaios clínicos e a aprovação pela agência reguladora. Nos Estados Unidos, a Food and Drug Administration (FDA) é responsável pela fase de registro de medicamentos para uso no país; na Europa esse cargo é da European Medicines Agency (EMA), e, no Brasil cabe à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (FERREIRA et al., 2022).

A primeira etapa baseada na busca de novas moléculas bioativas é realizada através de triagens reais ou virtuais de produtos naturais, compostos sintéticos ou coleções combinatórias. O objetivo é a descoberta de *hits* (moléculas mais promissoras), ligantes e alvos moleculares de interesse. Em seguida, as moléculas candidatas são testadas com o objetivo de analisar se apresentam atividade no alvo biológico. Após moléculas promissoras serem identificadas e otimizadas, iniciam-se os testes pré-clínicos com o objetivo de avaliar parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos, assim como a eficácia e a segurança através de testes de toxicidade. Para a realização das análises são utilizados ensaios *in vitro* para inspecionar os efeitos diretos na proliferação celular e também ensaios *in vivo* em modelos animais (FERREIRA, 2022; DEORE, 2019).

Para incluir um fármaco no mercado, em média, são necessários de 10 a 15 anos e de 500 a 800 milhões de dólares (CUI et al., 2020). Por essa razão, nas últimas décadas, os métodos computacionais tornaram-se uma ferramenta essencial no processo de descoberta de novos fármacos, uma vez que podem reduzir os custos de pesquisa e acelerar o processo de desenvolvimento de fármacos (FANTACUZZI; AGAMENNONE, 2024).

A abordagem de descoberta de moléculas promissoras à fármacos auxiliados por computador (*in silico*) é uma técnica de desenvolvimento de medicamentos que tem eficácia comprovada e podem reduzir os custos de produção de fármacos em até 50%. Isso é possível pois existem modelos computacionais que podem rastrear milhares de compostos antes que seja realizado o processo de síntese e dos testes *in vitro* das moléculas analisadas (JOHNSON, 2023; EJALONIBU, 2021).

Uma molécula candidata a fármaco preferencialmente deve ter uma boa absorção, uma distribuição extensa, deve ser capaz de atingir o alvo desejado e não ser tóxica. Além disso, essas moléculas devem ter a síntese possivelmente executada. Um dos maiores desafios no desenvolvimento de fármacos tem sido a síntese das moléculas mais promissoras, e os estudos computacionais podem auxiliar para selecionar previamente moléculas com bons parâmetros farmacocinéticos, alta atividade biológica e também com simplicidade de síntese (SA, 2022). Plataformas computacionais, tais como Molinspiration (molinspiration.com) permitem que moléculas sejam avaliadas quanto a capacidade de inibir quinases, que são proteínas geralmente envolvidas com o câncer. Além disso, essa plataforma pode auxiliar na seleção de moléculas promissoras que permitem avaliar se uma molécula candidata a fármaco está dentro da regra de cinco de Lipinski (KARAMI et al., 2022) Esta regra auxilia na seleção de moléculas promissoras quanto ao parâmetro farmacocinético de biodisponibilidade oral. Esta metodologia baseia-se em dados que demonstram que a maioria dos fármacos administrados oralmente e que são eficazes sejam moléculas relativamente pequenas e moderadamente lipofílicas (ROSKOSKI et al., 2023).

Segundo a regra de cinco de Lipinski, a permeação ou absorção ruim de um fármaco é mais provável se a molécula tiver mais de 5 doadores de ligação de hidrogênio, mais que 10 receptores de ligação hidrogênio, uma massa molecular maior que 500 Da ou um valor de $\log P$ calculado maior que 5. No entanto, nas duas últimas décadas, os parâmetros anteriormente empregados se tornaram mais flexíveis e houve aumentos estatisticamente significativos para massa molecular e receptores de ligação de hidrogênio, enquanto o número para doadores de ligação de hidrogênio e $\log P$ permaneceram razoavelmente constantes (CARMICHAEL; DAY, 2022).

O desenvolvimento de fármacos inibidores de quinases com atividade antitumoral vem crescendo nos últimos anos, visto que estas proteínas desenvolvem um papel chave no desenvolvimento do câncer. As proteínas quinases representam uma família grande e diversificada de enzimas componentes-chave de vias de sinalização celular que através de uma rede de sinalização em cascata, fosforilam receptores de superfície e enzimas citoplasmáticas ligando grupos fosfato (de ATP ou GTP) principalmente a resíduos de serina, treonina e/ou tirosina. A fosforilação tem muitos efeitos nas proteínas e pode ativar diferentes mecanismos envolvidos na proliferação, diferenciação e angiogênese, promovendo o desenvolvimento tumoral (BAIER; SZYSZKA, 2020).

Alterações genéticas que causam superexpressão ou desregulação da proteína quinase estão envolvidas na oncogênese de vários tipos de câncer, tornando-se alvos farmacêuticos altamente atraentes, levando ao desenvolvimento de numerosos inibidores de quinase úteis para o tratamento de uma ampla gama de tumores cerebrais. Estes inibidores são pequenas moléculas que podem atravessar as membranas celulares e interagir com diferentes locais de ligação de proteínas quinases. A prevenção da fosforilação da proteína quinase leva ao bloqueio de várias cascatas de sinalização envolvidas na proliferação, diferenciação e angiogênese celular, importantes para o desenvolvimento tumoral (ARTER, 2022; FILIPPONE, 2022).

1.2 CÂNCER

O câncer representa um conjunto de mais de 277 doenças caracterizadas pela perda de capacidade de auto-regulação das células, que passam a se proliferar sem controle. Essas células podem invadir tecidos adjacentes e órgãos à distância por meio da corrente sanguínea e sistema linfático, originando tumores em outros locais, processo denominado metástase. Esse grupo de doenças apresenta elevada complexidade e representa um importante problema de saúde pública. O câncer é a segunda maior causa de mortes no mundo, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares, e é responsável, anualmente, pela morte de dez milhões de pessoas, o que representa uma em cada seis mortes (SOUSA et al., 2021).

O desenvolvimento do câncer é um processo de múltiplas etapas, durante o qual as alterações genéticas conferem tipos específicos de vantagens de crescimento impulsionando a transformação progressiva de células normais em células cancerígenas malignas. O crescimento maligno é caracterizado por várias alterações importantes, como: autossuficiência de sinais de crescimento, insensibilidade a sinais anticrescimento, fuga do apoptose, potencial de proliferação desregulado, aumento da angiogênese e metástase. Cada uma dessas mudanças é complicada e realizada por esforços combinados de vários processos de sinalização (SINGH et al., 2019).

O rápido crescimento da incidência e da mortalidade por câncer se tornou um desafio global para a saúde. A forma de reduzir a taxa de mortalidade relacionada com o câncer tem atraído atenção significativa do governo, da indústria farmacêutica

e comunidades científicas, esperando o rápido desenvolvimento de fármacos eficazes e seguros para o tratamento do câncer (CUI et al., 2020).

A busca por uma forma de tratamento eficaz contra o câncer é um dos grandes desafios da pesquisa, pois a eficácia dos tratamentos está relacionada a eliminação seletiva das células cancerosas, afetando o menor número possível de células saudáveis. O grau de alteração na qualidade de vida do paciente e eventual expectativa de vida está diretamente relacionado a essa capacidade de direcionamento do tratamento (BRANNON-PEPPAS, BLANCHETTE, 2004).

1.3 GLIOBLASTOMA

Gliomas referem-se a tumores originados de células gliais, são o tipo mais comum de tumores do sistema nervoso central (SNC) e representam cerca de 80% de todos os tumores cerebrais malignos (RAJARATNAM, 2020; BOCCELLATO; REHM, 2022). O sistema de classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) para gliomas baseia-se em atipia, mitose, proliferação endotelial e necrose. Tumores sem nenhuma dessas características são de grau I e com qualquer uma dessas características são de grau II. Os tumores de grau I e II são considerados benignos e possuem crescimento mais lento; tumores de grau III são malignos e grau IV além de malignos são os mais agressivos e de crescimento mais rápido (RAJESH et al., 2017).

O glioblastoma multiforme (GBM) é um glioma que possui grau de malignidade IV e uma média de sobrevida mundial de 10 a 20 meses após o diagnóstico (TOUAT et al., 2017). É um dos cânceres malignos mais agressivos e também o tumor primário maligno mais comum do SNC, sendo responsável por cerca de metade dos tumores malignos do SNC (CZARNYWOJTEK et al., 2023).

A incidência do GBM é relativamente baixa em comparação com outros tipos de câncer, com aproximadamente 3,23 novos casos por 100.000 pessoas anualmente nos Estados Unidos. A idade média do diagnóstico é de 64 anos, com taxas mais elevadas no grupo de 75 a 84 anos. O glioblastoma é 1,6 vezes mais comum em homens em comparação com mulheres (SMOLARSKA et al., 2023).

A ressonância magnética é a modalidade diagnóstica padrão-ouro para pacientes com suspeita de GBM podendo determinar o tamanho, forma e localização do tumor. O GBM tem predileção por envolver os hemisférios cerebrais, sendo os lobos frontal e temporal os mais envolvidos (MELHEM et al., 2022).

Dependendo do papel funcional da área do cérebro afetada, as apresentações clínicas incluem fraqueza persistente, dormência, perda de visão ou alteração da linguagem. A dor de cabeça é um sintoma inicial muito comum, enquanto a convulsão ocorre apenas em aproximadamente 25% dos pacientes (BOCCELLATO; REHM, 2022).

Apesar dos avanços no estudo da patogênese do GBM, a etiologia deste tipo de tumor ainda permanece incerta. Apenas 20% dos pacientes com glioblastoma têm histórico familiar de câncer e a definição de genes de suscetibilidade ou predisposição permanece um desafio. No entanto, descobriu-se que alguns casos familiares estão associados a síndromes genéticas raras, como a síndrome de Li-Fraumeni e neurofibromatose dos tipos 1 e 2 (BOCCELLATO; REHM, 2022). Existem poucos fatores de risco validados para glioblastoma. A exposição à radiação ionizante é o fator de risco mais forte associado e é o único fator de risco potencialmente modificável conhecido (TAN et al., 2020).

O tratamento do glioblastoma é extremamente desafiador. As dificuldades em encontrar uma terapia eficaz devem-se principalmente a quatro razões: as suas propriedades invasivas, a sua heterogeneidade, o seu rápido desenvolvimento de resistência à radioquimioterapia e a presença da barreira hematoencefálica (BHE), que a maioria dos fármacos não consegue atravessar (BOCCELLATO; REHM, 2022).

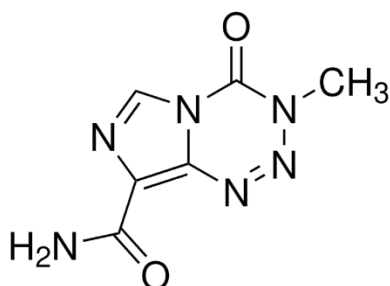
As estratégias atuais de tratamento para GBM concentram-se principalmente na remoção cirúrgica da massa tumoral localizada. Como o GBM é caracterizado pela sua natureza infiltrativa, com 80-90% dos tumores crescendo em proximidade do local primário do câncer, a ressecção cirúrgica deve ser acompanhada de quimioterapia e radioterapia (SMOLARSKA et al., 2023). A ressecção total bruta (RTG), se viável, é geralmente recomendada, porém, a sobrevivência também pode ser melhorada com a ressecção máxima de forma que a função neurológica não seja comprometida. A ressecção máxima viável com segurança é o princípio orientador da cirurgia de glioblastoma (BRASIL, 2020; TAN, 2020). Devido ao seu comportamento migratório agressivo, as células do glioblastoma escapam à ressecção cirúrgica completa e, portanto, o tumor geralmente reaparece alguns centímetros de sua localização original (BOCCELLATO; REHM, 2022).

Entre as principais condutas adjuvantes à cirurgia em pacientes com gliomas de alto grau, a radioterapia é comprovadamente a mais eficaz (BRASIL, 2020). Apesar da sua efetividade, a radioterapia é limitada, uma vez que o centro do tumor está

hipóxico e a presença de oxigênio é essencial para uma radioterapia eficaz. Além disso, a radioterapia também representa um risco significativo de danificar o tecido cerebral saudável. A recorrência tumoral e a radiorresistência limitam a eficácia das abordagens radioterapêuticas (RAJESH, 2017; SMOLARSKA, 2023).

A quimioterapia concomitante e adjuvante à radioterapia é superior em termos de eficácia quando comparada à radioterapia isolada (BRASIL, 2020). A temozolomida (TMZ) é o fármaco mais utilizado na quimioterapia padrão para GBM recém-diagnosticado (Figura 1). A TMZ é um agente alquilante oral que exerce sua citotoxicidade transportando um grupo metil que se liga às guaninas em sua posição O⁶ durante o processo de replicação do DNA. Com isso, forma-se uma O⁶-metilguanina que então emparelha com um nucleotídeo base de timina em vez de uma citosina. Tal emparelhamento de bases incompatível provoca quebras de DNA, com a consequente parada do ciclo celular, seguida de morte celular por apoptose. MGMT (metilguanina-metil transferase) é uma enzima de reparo de DNA que remove adutos de alquila e metila formados na posição O⁶ das guaninas, antagonizando assim os efeitos letais de agentes alquilantes como a TMZ. As células tumorais com gene MGMT metilado são mais suscetíveis aos efeitos citotóxicos da TMZ do que as células com MGMT funcional. Embora melhore a sobrevida dos pacientes, o benefício de sobrevida permanece insatisfatório e a resistência à temozolomida é comum na clínica (BOCCELLATO; REHM, 2022; KHABIBOV, 2022; LUN, 2016).

Figura 1 – Estrutura química da temozolomida



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Embora a TMZ apresente potencial terapêutico significativo contra o GBM durante a fase inicial do tratamento, mais de 40% dos pacientes com GBM desenvolvem gradualmente resistência à TMZ, dificultando o sucesso do tratamento e consequentemente levando ao agravamento do quadro da doença e à morte.

Atualmente, superar a resistência à TMZ continua sendo um grande desafio para o tratamento do GBM (YANG et al., 2022).

GBM é uma doença complexa e outra característica que dificulta o tratamento é a presença da barreira hematoencefálica (BHE) que impede a passagem de várias células imunes e quimioterápicos. A BHE é responsável pela integridade do sistema nervoso central controlando o transporte de diferentes moléculas através de uma complexa barreira física manifestada por junções estreitas e vias enzimático-metabólicas. A BHE dificulta a entrega de fármacos no compartimento cerebral, restringindo a penetração de 98% de moléculas pequenas e aproximadamente 100% de moléculas grandes. Este cenário constitui um obstáculo para o desenvolvimento de terapias eficazes, o que é refletido na falta de aprovação de fármacos na última década (KHADDOUR; JOHANNIS; ANSTAS, 2020).

Todos os processos do GBM de instabilidade genética, perda de controle do ciclo celular, superexpressão de fatores de crescimento e seus receptores, angiogênese, migração, invasão e apoptose aberrante são regulados por várias vias de sinalização. A tentativa de direcionar moléculas que interfiram nas vias de sinalização que são alteradas em GBM é uma promessa para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (NAKADA et al., 2011; TANG et al., 2021).

Estudos moleculares mostraram que a maioria dos tumores apresenta alterações recorrentes que interrompem as principais vias envolvidas na regulação do crescimento, receptores de tirosina quinase (RTK), proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), vias de sinalização de fosfoinosítido 3 quinase (PI3K), ciclo celular, reparo do ácido desoxirribonucleico (DNA) e apoptose (TOUAT et al., 2017). Esses eventos de sinalização regulam a sobrevivência, a proliferação e a angiogênese das células (BEHL et al., 2021).

O receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) desencadeia uma variedade de cascatas de sinalização envolvidas na proliferação de células tumorais, angiogênese, motilidade, diferenciação e sobrevivência (JORISSEN et al., 2003; XU et al., 2017). A estrutura de EGFR consiste em domínio extracelular, domínio transmembrana e domínio intracelular da tirosina quinase. A ativação do EGFR leva à ativação de numerosas vias de sinalização a jusante, como PI3K-AKT-mTOR (KHABIBOV et al., 2022; SIGISMUND et al., 2017).

1.4 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama descreve uma série de malignidades que ocorrem nas glândulas mamárias, que coletivamente representa um desafio significativo para a saúde global: é o câncer mais frequentemente diagnosticado no mundo, e a principal causa de mortalidade por câncer entre as mulheres (WILKINSON; GATHANI, 2022). Mundialmente, foram estimados 2,3 milhões de novos casos de câncer de mama em 2020 e cerca de 645 mil óbitos decorrentes da doença. No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), as estimativas de incidência de câncer de mama para 2020 foram de 66.280 casos, o que representa 29,7% dos cânceres em mulheres. Em 2019, ocorreram 18.068 mortes de mulheres por câncer de mama no país (BRASIL, 2024).

A idade avançada é considerada o principal fator de risco para o câncer de mama feminino, uma vez que as taxas de incidência aumentam a partir de 40 anos. Outros fatores de risco associados incluem sexo feminino, menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade, falta de amamentação, história familiar positiva, tecido mamário denso, terapia hormonal e histórico de radioterapia no tórax (TRAYES; COKENAKES, 2021). Considera-se que o prognóstico é mais favorável quando o câncer de mama é diagnosticado e tratado precocemente comparado ao diagnóstico em estádios avançados ou com metástases sistêmicas (BRASIL, 2024).

Segundo a Diretriz para a detecção precoce do câncer de mama no Brasil (rastreamento e diagnóstico precoce), as estratégias adotadas foram o rastreamento mamográfico em mulheres de 50 a 69 anos a cada dois anos e a conscientização sobre os sinais e sintomas suspeitos para encaminhamento ao serviço de diagnóstico de câncer mamário (BRASIL, 2015). A identificação de fatores de risco da doença em seu estágio inicial e o encaminhamento ágil e adequado para o atendimento especializado dão à Atenção Primária um caráter essencial para um melhor resultado terapêutico e prognóstico dos casos. Atualmente, a mamografia é o método mais utilizado para detectar o câncer de mama. No entanto, devido à enorme quantidade de dados e às fracas características de imagem do câncer de mama em fase inicial, o diagnóstico precoce é muito difícil (ZHANG et al., 2021).

O manejo com intenção curativa para o câncer de mama invasivo refere-se ao tratamento multimodal prescrito para a doença em estágio I a III, incluindo cirurgia de mama, radioterapia e tratamento sistêmico adjuvante/neoadjuvante, juntamente com

cuidados de suporte apropriados para gerenciar a dor relacionada ao câncer, toxicidades e efeitos colaterais da terapia (MUTEBI, M et al., 2020).

O tratamento não medicamentoso do câncer de mama inclui as seguintes abordagens: cirurgia do tumor e reconstrução da mama, avaliação e esvaziamento axilar e radioterapia. A cirurgia, associada ou não à radioterapia, continua a ser a base do tratamento precoce do câncer da mama, o que inclui a intervenção na mama (exérese do tumor e reconstrução) e na axila (avaliação e retirada de linfonodos). As abordagens cirúrgicas podem ser parciais ou totais, dependendo das características clínicas do tumor e do prognóstico de cada paciente. Ao longo do tempo, os procedimentos cirúrgicos evoluíram de tratamentos mais agressivos para menos invasivos, apresentando maior ganho estético, sem afetar os desfechos de cura (BRASIL, 2024).

Como tratamento medicamentoso, a quimioterapia pré-operatória é usada para pacientes com grandes tumores primários em relação ao tamanho da mama em pacientes que desejam cirurgia conservadora da mama. Também é usada para pacientes com doença inoperável. O propósito da terapia sistêmica pré-operatória é diminuir o tamanho de tumores de mama (permitindo melhores resultados estéticos e de tratamento) e tornar os tumores operáveis. A radioterapia é usada após a excisão cirúrgica do câncer de mama para eliminar qualquer doença subclínica restante. O tratamento sistêmico adjuvante é responsável por grande parte da redução da mortalidade por câncer de mama (TRAYES; COKENAKES, 2021). Os fármacos associados à maior efetividade para pacientes de estágio mais avançado são os antracíclicos (doxorrubicina ou epirrubicina) e taxanos (paclitaxel, docetaxel) (BRASIL, 2024).

Nos últimos anos, a tendência se dá em direção a terapias específicas para câncer de mama que apresentem menos efeitos sistêmicos nas células saudáveis. Estes novos tratamentos devem demonstrar uma compreensão mais ampla das características moleculares e biológicas dos tumores e das formas cientificamente inteligentes de os utilizar em nosso benefício no tratamento. É essencial uma liderança forte por parte dos criadores de ensaios clínicos, dos cientistas translacionais do câncer e dos médicos oncologistas que tratam pacientes com câncer de mama para encontrar formas mais eficientes de adaptar os regimes adjuvantes às necessidades de cada paciente (BEN-DROR; SHALAMOV; SONNENBLICK, 2022).

Devido à grande variedade de subtipos de câncer de mama e suas características clínicas, o prognóstico e a resposta ao tratamento de pacientes com câncer de mama variam. Portanto, é crucial desenvolver um tratamento mais eficaz, geral e inovador para o câncer de mama. Apesar dos tratamentos aprimorados para diferentes subtipos de câncer de mama, ainda há respostas terapêuticas e prognósticos ruins (RAMAZI et al., 2023).

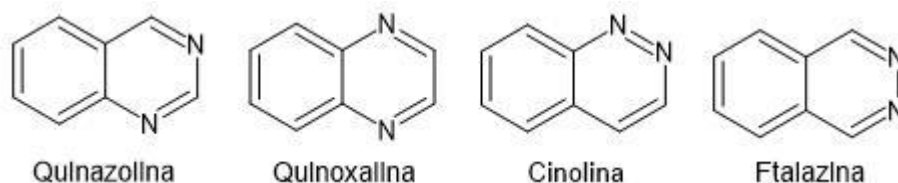
1.5 QUINAZOLINAS

Os compostos heterocíclicos e, em particular, os compostos contendo nitrogênio têm um enorme valor na área da química medicinal. Com uma infinidade de atividades farmacológicas potenciais, os derivados contendo nitrogênio continuam a despertar interesse de pesquisadores em todo o mundo com suas propriedades terapêuticas, e esta é a razão pela qual os compostos heterocíclicos são utilizados para o desenvolvimento de muitos fármacos e produtos farmacêuticos (DHUGURU; GHONEIM, 2022).

Embora as quinazolininas tenham sido inicialmente reconhecidas pela sua atividade antimalárica, hoje seus derivados encontram diversas aplicações, tais como antimicrobiana, antifúngica, anticonvulsivante, antitumoral, anti-hipertensiva, antidiabética, anti-inflamatória, anti-HIV, e inibição de quinases (DHUGURU; GHONEIM, 2022). Devido a isso, a comunidade científica tem grande interesse em buscar novos derivados de quinazolininas e descobrir suas propriedades no combate a doenças (WDOWIAK et al., 2021).

A estrutura do membro principal deste grupo – quinazolina – contém dois anéis fundidos de seis membros: um anel de benzeno combinado com um anel de pirimidina (Figura 2) (WDOWIAK et al., 2021). Apresenta-se de forma cristalina, se dissolve em água, com leve tonalidade amarela, massa molar de 130,15 g.mol⁻¹ e fórmula molecular C₈H₆N₂ (FAISAL; SAEED, 2021; INDUMATHY, 2023).

Figura 2 - Estrutura química das quinazolininas



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

A FDA autorizou muitos fármacos de derivados de quinazolina como medicamentos anticâncer, incluindo Erlotinibe e Gefitinibe para câncer de pulmão e Lapatinibe e Caneratinibe para câncer de mama (AHMED; KHALIFA; EED, 2022).

Os efeitos antitumorais das quinazolininas podem manifestar-se através de inúmeras vias. Um mecanismo anticancerígeno eficaz é a inibição da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K). Esta via PI3K/AKT/mTOR é crucial nas funções regulatórias em muitas atividades celulares, como crescimento, proliferação, diferenciação e sobrevivência celular. Muitas doenças cancerígenas se desenvolvem através da ativação dessa rede de sinalização. A inibição dos componentes desta rede pode, portanto, ter utilidade no tratamento do câncer (WDOWIAK et al., 2021).

Outras propriedades anticancerígenas dos derivados de quinazolina podem ser devidas à inibição dos receptores de tirosina quinases (RTQ), como por exemplo o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR). Os RTQs, que estão envolvidos na sinalização transmembrana, estão associados aos receptores de vários fatores de crescimento, como o fator de crescimento epidérmico e fator de crescimento vascular. As quinazolininas também podem exibir propriedades apoptóticas em linhas celulares cancerígenas por atuarem como inibidores da tubulina. A tubulina é a proteína estrutural dos microtúbulos e desempenha um papel crucial na divisão celular. Se a droga se ligar à tubulina, evita a formação dos microtúbulos necessários para a formação do fuso mitótico. Esta propriedade pode levar a uma ação antimetastática devido à inibição da migração celular e invasividade (WDOWIAK et al., 2021).

Em estudos com derivados de quinazolininas, algumas moléculas foram sintetizadas e testadas quanto ao potencial citotóxico contra linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7), câncer de pulmão (A549) e glioblastoma (SHSY-5Y), e a maioria dos compostos foram considerados mais potentes contra a linhagem celular de glioblastoma em comparação com as outras linhagens celulares. Assim, os

derivados de quinazolina têm potencial para serem desenvolvidos como potentes moléculas anticancerígenas para glioblastoma (DWIVEDI et al., 2022).

2 JUSTIFICATIVA

A terapia padrão para glioblastoma inclui ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia. Porém, este tipo de terapia permanece ineficaz devido ao risco significativo de dano do tecido cerebral saudável, metástase, recorrência tumoral e resistência a quimioterápicos, especialmente com a ingestão crônica de temozolomida (CZARNYWOJTEK et al., 2023). A resistência adquirida aos fármacos na terapia adjuvante após a ressecção cirúrgica é um dos principais desafios para o tratamento do câncer. Esse desafio juntamente com a inviabilidade prática de remover cirurgicamente toda a massa tumoral, leva a grande possibilidade de recidiva tumoral (BOCCELLATO; REHM, 2022).

A TMZ, um agente alquilante oral de segunda geração, é o agente quimioterápico de primeira linha para pacientes com GBM. No entanto, as melhorias no prognóstico para os tumores cerebrais demoram a ser concretizadas, pois muitos pacientes desenvolvem resistência e recidivas após um período de sobrevida livre de progressão de 7 a 10 meses (LU, 2020; GAO, 2022).

A incidência cada vez maior de câncer de mama é uma grande preocupação de saúde pública. Além disso, a resistência à quimioterapia, especialmente em alguns subtipos de câncer de mama, representa um grande obstáculo para a melhora da sobrevida de pacientes. A progressão do câncer na última fase do desenvolvimento do tumor pode ocorrer em casos de resistência aos fármacos e é definida por uma velocidade aumentada no crescimento e na invasividade das células tumorais, levando à aquisição de potencial metastático (KOUAL et al., 2020).

Nesse contexto, a busca por novos fármacos eficazes para GBM e câncer de mama é desafiadora a toda comunidade científica e indústria farmacêutica. No entanto, tais buscas tornam-se cada vez mais necessárias, uma vez que novos medicamentos acarretam em novas possibilidades terapêuticas e, portanto, menor resistência aos tratamentos. Uma vez que as quinazolininas possuem efeitos antitumorais e apresentam potencial citotóxico contra linhagens celulares de glioblastoma e câncer de mama, os derivados de quinazolininas foram selecionados e estudados quanto a atividade antitumoral para o desenvolvimento de novos fármacos.

3 OBJETIVO GERAL

Selecionar, sintetizar e testar novos derivados quinazolínicos candidatas a fármacos antineoplásicos e avaliar a atividade antitumoral das moléculas mais promissoras nas linhagens tumorais de glioblastoma (U87-MG e T98G) e em linhagem tumoral câncer de mama (MCF-7).

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

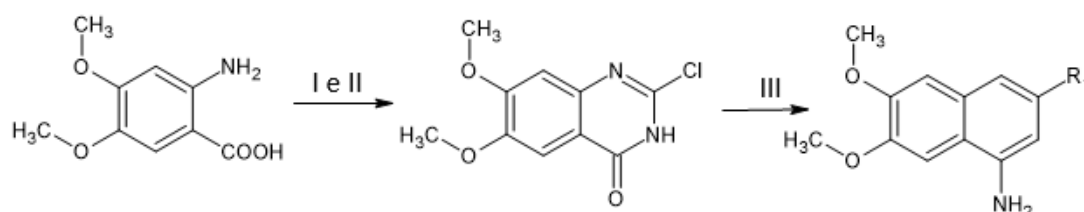
- Realizar estudos *in silico* para selecionar moléculas promissoras como candidatas a fármacos anticâncer;
- Sintetizar as moléculas mais promissoras;
- Realizar as caracterizações físico-químicas das moléculas sintetizadas, i.e., adquirir e analisar os espectros no infravermelho e RMN;
- Realizar triagem das moléculas sintetizadas em cultura de glioblastoma para selecionar as moléculas mais promissoras;
- Avaliar a capacidade de inibir a viabilidade celular em linhagens tumorais e não tumorais;
- Avaliar a expressão gênica em uma via de sobrevivência celular nas linhagens tratadas com as moléculas mais promissoras.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ESTUDOS *IN SILICO*

Um esquema de rotas sintéticas conhecidas foi utilizado para selecionar possíveis moléculas com potencial para serem sintetizadas (Figura 3).

Figura 3 - Procedimento de ciclização para derivados de 4-(3H)-quinazolinonas



Reagentes e condições: I) Ciclização: (a) acetato de formamidina, 140°C, 8 horas (Tobe, M. et al., 2003); (b) dicloridrato de guanidina; NaOEt, EtOH, 130°C, 5 horas. (c) dibromidrato de 2 aminoacetamidina, MeOH, 80°C, 6 horas; (Connolly, T.J.; et al., 2005) (d-e) anidridos acético e benzóico, refluxo, 2 horas e NH₃; (f-h) (i) Cloreto de o, m, p-anisóila, Et₃N, THF, TA, 3 horas; (ii) NH₃; (iii) 5% KOH aq, EtOH, refluxo, 1 hora.

II) Formação do Cloroquinazolinico: 1) SOCl₂ ou POCl₃, DMF catalítico, refluxo, 3 horas; 2) CH₂Cl₂, H₂O, NaHCO₃. (ii) 1) NH₃, isopropanol, refluxo, 2 horas.

III) Formação de aminoquinazolinonas: R₁, isopropanol, refluxo, 12 horas.

(R₁ = anilinas aromáticas substituídas)

Fonte: ANTUNES, J. E., 2013

Os substituintes R₁ foi racionalmente testados para analisar a possibilidade de execução da síntese e as outras etapas de estudos *in silico*. A partir da rota sintética escolhida foram testadas 98 moléculas e para todas foi mantido o mesmo grupo farmacofórico quinazolinico variando apenas o substituinte R₁.

Todas as moléculas propostas foram desenhadas em programas computacionais tais como *ChemSketch* e *MarvinSketch*. Em seguida, todas as moléculas foram submetidas em plataformas computacionais para avaliar parâmetros farmacocinéticos.

A plataforma computacional *Molinspiration* (<https://www.molinspiration.com/>) permitiu selecionar moléculas com probabilidade para ter boa biodisponibilidade oral de acordo com a “Regra dos cinco de Lipinsk”. Essa plataforma também permitiu que as moléculas testadas pudessem ser avaliadas quanto a capacidade de inibição de

quinases. Tal ferramenta também pode representar a capacidade de uma molécula apresentar-se bioativa.

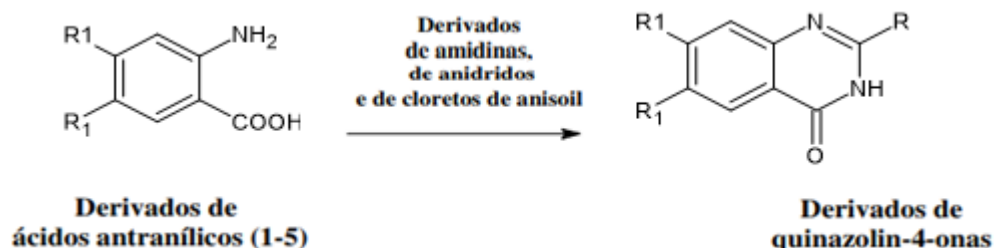
A plataforma *ADMETlab* (<https://admet.scbdd.com/>) permitiu calcular a probabilidade das moléculas testadas terem capacidade de atravessar a Barreira Hematoencefálica (BHE). As moléculas propostas foram introduzidas nesta plataforma e foi calculada a probabilidade de atravessarem a BHE.

Os cálculos para todas as moléculas propostas foram realizados. As plataformas computacionais utilizadas apresentam resultados para os cálculos como sendo uma probabilidade do resultado para cada parâmetro analisado. Assim, os resultados normalmente são expressos em números de probabilidade variando de 0,00 a 99,99. Quanto maior número, maior a probabilidade de o resultado reproduzir um teste experimental de uma fração de cada molécula que já foi realizado tal teste *in vitro*. Portanto, foram realizados os cálculos para todas as moléculas criando um score (moléculas mais promissoras > moléculas menos promissoras). Para isso, foi adotado pesos para os principais critérios deste estudo: capacidade de atravessar a BHE – peso 3, capacidade de ser inibidor de quinase - peso 2 e inibidor de enzima - peso 1 (SA; ANTUNES, 2022).

4.2 SÍNTESE DE MOLÉCULAS MAIS PROMISSORAS

Após os estudos computacionais prévios onde foram avaliados boa biodisponibilidade por via oral, afinidade com proteínas quinases, probabilidade de atravessar a barreira hematoencefálica e estudos de *molecular docking*, foram selecionadas as moléculas mais promissoras para a síntese, levando em consideração os recursos financeiros para a aquisição de reagentes.

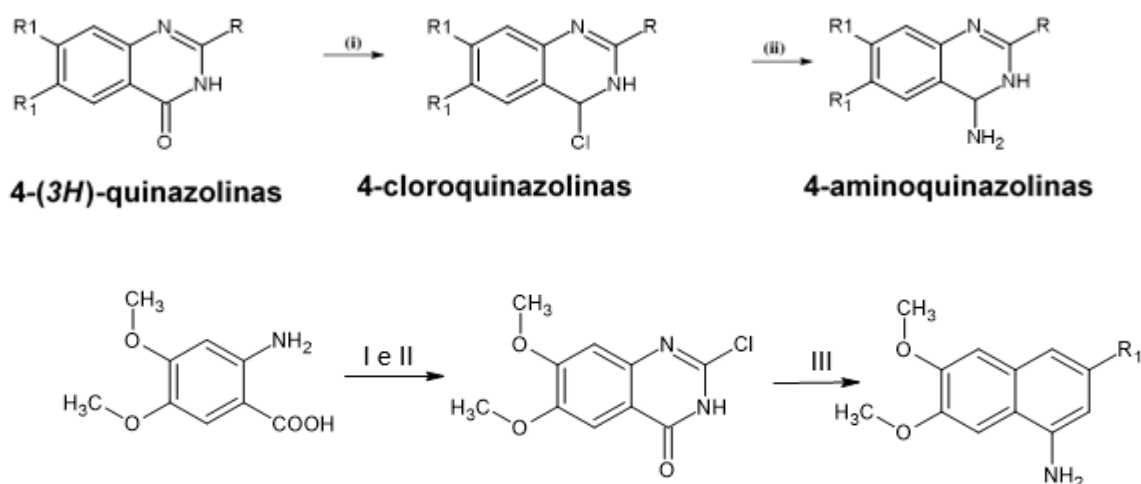
As sínteses das quinazolininas seguiram metodologias já padronizadas na literatura científica (TOBE et al., 2003) e (CONNOLLY, et al., 2005) conforme estão descritas nos esquemas de síntese das Figuras 4 e 5.

Figura 4 - Esquema da formação dos derivados quinazolin-4-onas1) R1 = OCH₃

2) R = Cl

Legenda: Procedimento de ciclização para derivados de 4-(3H)-quinazolinonas. Reagentes e condições: (a) acetato de formamidina, 140 °C, 8 horas (TOBE *et al.*, 2003); (b) dicloridrato de guanidina; NaOEt, EtOH, 130°C, 5 horas. (c) dibromidrato de 2- aminoacetamidina, MeOH, 80 °C, 6 horas; (CONNOLLY, *et al.*, 2005) anidrido acético e benzóico, refluxo, 12 horas e NH₃; (i) Cloreto de o, m, p-anisolla, Et₃N, THF, TA, 3 horas; (ii) NH₃; (iii) 5% KOH aq, EtOH, refluxo, 1hora (Rendimento ~76%).

Fonte: ANTUNES, J. E., 2013

Figura 5 - Esquema das etapas para formação de derivados de cloroquinazolinas e aminoquinazolinas

1) R1=Benzilóxianilina; 1H-imidazol-1-il) anilina; 4-(1H-pirazol-1-yl) anilina; 4-(4-Fluorophenoxy)anilina

Legenda: Reagentes e condições: Derivado clorado: 1) SOCl₂ ou POCl₃, DMF catalítico, refluxo, 3 horas (i); 2) CH₂Cl₂, H₂O, NaHCO₃. (ii) e 3) NH₃, ou anilinas aromáticas, isopropanol, refluxo, 12 horas (iii). (TOBE *et al.*, 2003) (Rendimento ~67%).

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

4.3.1 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FTIR)

Os espectros na região do infravermelho médio (4000 a 400 cm^{-1}) das moléculas puras foram obtidos utilizando um espectrofotômetro da Perkin Elmer (série Spectrum Two™) com transformada de Fourier, a partir de pastilhas das amostras prensadas com KBr. Elas foram preparadas macerando a molécula desejada juntamente com o KBr na proporção de 1:100, em um gral de ágata. Esse material foi transferido para o pastilhador e prensado utilizando uma prensa manual. Os espectros foram obtidos como a média de 8 varreduras consecutivas e resolução de 2 cm^{-1} . O programa Perkin Elmer Spectrum ES (versão: 10.03.08.0133) foi utilizado para a aquisição dos espectros. Os dados foram exportados para edição no programa Microcal Origin 9.0.

4.3.2 Análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ^1H RMN foram registrados em um espectrômetro Oxford Instruments Pulsar (60 MHz), usando-se $\text{DMSO-}d_6$ como solvente. Todos os experimentos foram realizados à 37 °C. Os dados foram tratados usando o programa MESTRENOVA 12.0.

4.4 CULTURA CELULAR

U87-MG, T98G e MCF-7

Neste estudo foram utilizadas as linhagens celulares U87-MG e T98G como modelo para glioblastoma multiforme. U87-MG é uma linhagem humana de células epiteliais originalmente obtida do cérebro de um paciente homem de idade desconhecida (U-87 ATCC® HTB-14). As amostras foram gentilmente cedidas pelo CIPOI (Centro Integrado de Pesquisas Oncohematológicas na Infância) localizado na Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. A linhagem celular humana T98G de células semelhantes a fibroblasto foi originalmente obtida do cérebro de um paciente branco, homem, de 61 anos, com

glioblastoma multiforme (T98G ATCC® CRL-1690) e foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) código 0406. Também foi utilizada a linhagem celular MCF-7, uma linhagem humana de células epiteliais originalmente obtidas de glândula mamária (MCF7 ATCC® HTB-22) como modelos para câncer de mama doadas pela professora Sandra Bertelli da Faculdade de Medicina do Mucuri da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

As linhagens celulares foram cultivadas em meio de cultura Roswell Park Memorial Institute - RPMI 1640 (LONZA, 12-702F) acrescido de 1% de Penicilina/Estreptomicina (LONZA, 21F095302) e 20% de soro fetal bovino (LGC Biotecnologia, 10-BIO500), previamente inativado por tratamento em banho maria a 56 °C por 30 minutos. As células foram acondicionadas em garrafas de cultura e mantidas em estufa (atmosfera de 95% de O₂ suplementado com 5% CO₂ a 37 °C). Ao atingirem 90% de confluência, as células foram removidas da garrafa utilizando uma solução de tripsina 0,25% (Sigma Aldrich T4049) e centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm, 4 °C. O precipitado foi homogeneizado em meio de cultura, as células foram contadas com o corante azul de tripan (Sigma Aldrich, 15250-061) em câmara de Neubauer (Hausser Scientific 3100) e plaqueadas em diferentes densidades de acordo com o ensaio experimental.

J774A.1

Para avaliar a capacidade da quinazolina denominada KDY3 para inibir a viabilidade celular de linhagens não tumorais, foi utilizada a linhagem celular animal J774.A1 de macrófagos originalmente obtidos de camundongos fêmeas (J774A.1 ATCC® TIB-67) doadas pela colaboradora neste estudo, a professora Sandra Bertelli.

Os macrófagos murinos foram cultivados em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1% de aminoácidos essenciais e 0,5% de solução penicilina/estreptomicina (10.000 UI/mL, 10 mg/mL, respectivamente). Após atingirem confluência, as garrafas foram raspadas e as células colocadas em placas de 96 poços na concentração de 2×10^5 células/mL para o ensaio de viabilidade por MTT. As células foram então incubadas em atmosfera úmida de 5% de CO₂ a 37 °C.

4.5 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

4.5.1 Avaliação da atividade antitumoral em linhagens de glioblastoma, câncer de mama e linhagem não tumoral

A viabilidade celular foi determinada utilizando a técnica de MTT (MOSMANN, 1983) que tem como princípio a redução do sal solúvel tetrazolium, [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide] de coloração amarela, pela desidrogenase mitocondrial presente nas células viáveis, resultando em um produto chamado de formazam, um precipitado insolúvel púrpura liberado no meio de cultura. A concentração de cristais formados e detectados colorimetricamente é diretamente proporcional ao número de células viáveis em cultura (STOCKERT et al., 2018).

As células foram plaqueadas em placa de 96 poços, na quantidade de 2×10^4 células em cada poço e foram incubadas durante 24 horas em estufa (atmosfera de 95% de O₂ suplementado com 5% CO₂) para permitir a adesão das células nas placas. Após esse tempo, iniciou-se os tratamentos durante 24 horas. Em seguida foram adicionados 20 µL de uma solução de MTT a 5 mg/mL (Sigma Aldrich, M5655), com posterior incubação à 37 °C em estufa de CO₂, durante quatro horas. Posteriormente, as células foram centrifugadas à 2000 rpm durante três minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 200 µL de DMSO (Sigma Aldrich, D8418). As placas foram incubadas novamente à 37 °C em estufa durante 30 minutos. Terminado o período de incubação, foi realizada a leitura em leitor de microplaca (ThermoFisher Multiskan FC 51119000) a 570nm. Através dessa leitura foi possível calcular a média da absorbância das triplicatas, subtraída da média da absorbância dos testes do branco utilizando como controle o DMSO que foi considerado como 100% de viabilidade para a confecção dos gráficos de viabilidade celular em porcentagem.

Nos primeiros ensaios de viabilidade celular, foram testadas 4 moléculas sintetizadas. Por estarem em processo de pedido de patente, as moléculas foram denominadas KDY3, KDY5, KDY6, e KDY23, e todos os tratamentos foram testados na mesma concentração de 50 µM na linhagem de glioblastoma T98G. As células também foram tratadas com a temozolomida (TMZ), fármaco referência no tratamento de GBM, com o quimioterápico doxorubicina (DOXO), ambos na concentração de

50 μM e com dimetilsulfóxido (DMSO) utilizado como solvente. A concentração de DMSO por poço de tratamento foi em torno de 1%.

No estudo da triagem das moléculas sintetizadas foi possível identificar as moléculas que obtiveram melhor atividade antitumoral: KDY3 e KDY23. Nesse estudo, analisamos principalmente a atividade de KDY3. Para avaliar a relação dose/resposta do tratamento de glioblastoma com KDY3 e determinar o IC_{50} , 2×10^4 células das linhagens U87-MG e T98G foram tratadas com KDY3 nas concentrações de 1 μM , 5 μM , 7,5 μM , 10 μM , 25 μM e 50 μM (U87MG) e 5 μM , 7,5 μM , 10 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM e 200 μM (T98G). As células também foram tratadas com TMZ na concentração de 400 μM , além de DOXO em 10 μM e DMSO.

Para avaliar a viabilidade celular das células de câncer de mama MCF-7 tratadas com KDY3, também foi utilizada a técnica de MTT. As células MCF-7 foram tratadas com KDY3 nas concentrações de 1 μM , 5 μM , 7,5 μM , 10 μM , 25 μM e 50 μM e também com TMZ e DOXO nas concentrações de 50 μM .

Para avaliar a viabilidade celular das células de macrófago J774.A1 tratadas com KDY3, também foi utilizada a técnica de MTT. As células foram tratadas com KDY3 nas concentrações de 1 μM , 5 μM , 7,5 μM , 10 μM , 25 μM e 50 μM e também com TMZ e DOXO nas concentrações de 50 μM .

4.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

4.6.1 Extração de RNA total

Para extração do ácido ribonucléico (RNA) total, as células T98G foram cultivadas como descrito anteriormente e plaqueadas na densidade de $1,68 \times 10^6$ células por placa de petri de 6 mm^3 . Os tratamentos foram realizados com KDY3 na concentração de 50 μM , com TMZ em 400 μM e PBS como controle. Foi adicionado 1 mL de Trizol® em cada placa para obtenção de RNA total. As células foram removidas das placas com ajuda de um espalhador de células tipo *scraper*, transferidas para microtubos e centrifugadas a 12000g, 4 °C durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para outros microtubos, foi adicionado 200 μL de clorofórmio em cada, foram homogeneizados e levados ao vórtex durante 15 segundos. Em seguida os microtubos foram incubados durante 5 minutos em temperatura ambiente e logo após, foram centrifugados novamente (12.000g, 4 °C,

por 10 minutos). Foi observada a separação da fase aquosa (superior) contendo o RNA total, a qual foi transferida para um novo microtubo. Para precipitar o RNA total foram adicionados 500 µL de álcool isopropílico. As amostras foram incubadas novamente em temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C. O RNA formou um precipitado em forma de gel no fundo e nas paredes do microtubo. Para lavagem do RNA, o sobrenadante foi removido e o precipitado foi lavado uma vez utilizando 1 mL de etanol 75% (mínimo de 1mL por mL de Trizol utilizado). A amostra foi misturada em vórtex durante 15 segundos e centrifugada a 7500g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi retirado e o pellet foi seco durante 30 minutos em temperatura ambiente. O RNA foi dissolvido em 20 µL água livre de RNase, incubado durante 10 minutos à 55 °C e estocado a -80 °C.

4.6.2 Quantificação das amostras de RNA total

A quantificação das amostras de RNA foi realizada no equipamento espectrofotômetro Nano Vue plus (GE®) sendo a concentração calculada em µg.mL⁻¹. A qualidade do RNA foi analisada com base na razão da absorbância A260nm/A280nm, que representa a concentração de RNA em relação à concentração de proteína.

4.6.3 Análise da expressão de transcritos por PCR em Tempo Real

O PCR em tempo real (qRT-PCR) foi utilizado para verificar a expressão de genes importantes nos processos de sobrevivência e proliferação celular. A síntese de cDNA foi realizada incubando-se 2 µg de RNA total extraído a partir da cultura de células de GBM (T98G) com iniciadores randômicos (Random Primer 250 ng - Invitrogen), 50U da enzima Super Script III™ Reverse Transcriptase (Invitrogen) e os seguintes ciclos: 37 °C por 60 minutos; 95 °C por 5 minutos.

A qRT-PCR foi realizada em um sistema 7500 *Fast Real-Time* (Applied Biosystems®), utilizando sistema *SYBR green*. O fluoróforo *SYBR green* é um corante que se liga na alça menor da dupla fita de DNA emitindo luz fluorescente. A fluorescência é mensurada à medida que os produtos de amplificação são gerados. Quanto maior o número de duplas fitas de DNA formadas durante a reação de PCR, maior a emissão de fluorescência. A presença de DNA dupla fita na solução é capaz

de aumentar essa emissão em até 10 vezes para uma mesma concentração de *SYBR green*. Os primers foram desenhados utilizando *Primer Express Software* (*PerkinElmer Life Sciences*) e validados através da análise das curvas de dissociação e modelo de titulação. Cada qRT-PCR (volume final de 20 μ L) contém 30 ng de RNA transcrito (cDNA), 400 nM de cada primer e 10 μ L de qPCRBio *SYBR Green Mix 2X* (*PCR Biosystems*). Cada amostra foi analisada em triplicata. As condições da PCR foram: 95 °C por 2 minutos (1 ciclo), 95 °C durante 5 segundos, 60 °C por 30 segundos (40 ciclos). Os resultados foram avaliados pelo método do CT comparativo (User Boletim nº 2, *PerkinElmer Life Sciences*) sendo os valores comparados pelas eficiências de cada par de oligonucleotídeos previamente padronizados no laboratório. Os produtos (*amplicons*) obtidos durante a qRT-PCR foram detectados através da curva de amplificação gerada ao longo da reação denominada de ciclo limiar da fase logarítmica da amplificação ou CT (*Cycle threshold*). O CT reflete o número do ciclo no qual a fluorescência gerada na reação atravessa o limiar ou linha de base e é inversamente proporcional à concentração de DNA ou RNA da amostra analisada. Assim, uma unidade de CT equivale ao dobro do produto amplificado de cópias iniciais de *amplicons*.

O gene GAPDH foi usado como controle. A Tabela 1 mostra a sequência de nucleotídeos utilizados na reação de qRT-PCR.

Tabela 1 - Sequência de nucleotídeos utilizados na reação de qRT-PCR

GENES	SEQUÊNCIA (5' - 3')
GAPDH senso	GTTTCGTCATGGGTGTGAACC
GAPDH anti-senso	CCAGGGGTGCTAAGCAGTTG
EGFR senso	CTACAACCCACACGTACC
EGFR anti-senso	GAGCCGTGATCTGTCACCAC
PI3K senso	TGGACGGCGAAGTAAAGCATT
PI3K anti-senso	AGTGTGACATTGAGGGAGTCG
AKT-1 senso	TTGTGAAGGAGGGTTGGCTG
AKT-1 anti-senso	TCACGTTGGTCCACATCCTG
m-TOR senso	GACGAGAGATCATCCGCCAG
m-TOR anti-senso	ACAAGGGACCGCACCATAAG
Src senso	AAGCTGAGGCATGAGAAG

Src anti-senso

GTACTCCGTGACGATGTAA

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para realização da análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Para análise do IC₅₀ foram utilizados os testes de regressão não linear e a curva de dose resposta foi obtida utilizando o software GraphPad Prism (log [KDY3] vs. resposta – slope variável). Para análise dos dados de viabilidade e expressão gênica, foi empregado o teste de ANOVA seguido de post-test de Tukey. Os resultados apresentados são representativos de pelo menos 3 experimentos independentes, em triplicada e foram mostrados como média $\pm$ desvio padrão. Os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTUDOS IN SILICO

Em um estudo prévio foi utilizada a plataforma computacional *Molinspiration* (<https://www.molinspiration.com/>) para selecionar as moléculas que não violaram a regra dos cinco de Lipinski. Foram estudadas 98 moléculas para avaliar os perfis farmacocinéticos *in silico*, levando em consideração a possibilidade de síntese das moléculas propostas. Foram excluídas 24 moléculas por violarem a regra dos cinco de Lipinski, sendo consideradas pobres em biodisponibilidade oral, ou seja, que provavelmente possuem má absorção (SA; ANTUNES, 2022). O uso dessa plataforma permite selecionar moléculas com maior probabilidade para apresentarem boa biodisponibilidade oral, que provavelmente podem apresentar boa absorção e distribuição (KARAMI, 2022; ROSKOSKI, 2023).

O derivado de quinazolina denominada KDY3 foi uma das moléculas selecionadas neste estudo que apresentou um score de 2,85 considerado acima do score mínimo estipulado em outro estudo para obter moléculas promissoras candidatas à fármaco anticâncer. A molécula KDY3 apresentou bons resultados para a regra dos cinco de Lipinski ($\log P = 2,8$; $MM = 362,39$; Doadores de ligação de hidrogênio = 3; Receptores de ligação de hidrogênio = 8) e alta bioatividade, isto é, elevada capacidade de inibir quinases/enzimas (SA; ANTUNES, 2022). Neste mesmo estudo KDY3 apresentou também um bom resultado para um importante parâmetro farmacocinéticos que foi a probabilidade de 51% de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) (Apêndice A). De acordo com Khaddour (2020), a presença da BHE é um grande obstáculo que dificulta o tratamento do glioblastoma impedindo a passagem de diversos quimioterápicos. Assim, a possibilidade da molécula KDY3 atravessar a BHE pode ser considerada um resultado promissor. Mesmo com resultado *in silico* promissor para atravessar a BHE, ainda assim, nosso grupo de pesquisa pretende realizar uma nanoestruturação desta molécula com intuito de melhorar o transporte de KDY3 pela BHE. A nanoestruturação de KDY3 será realizado em estudos futuros.

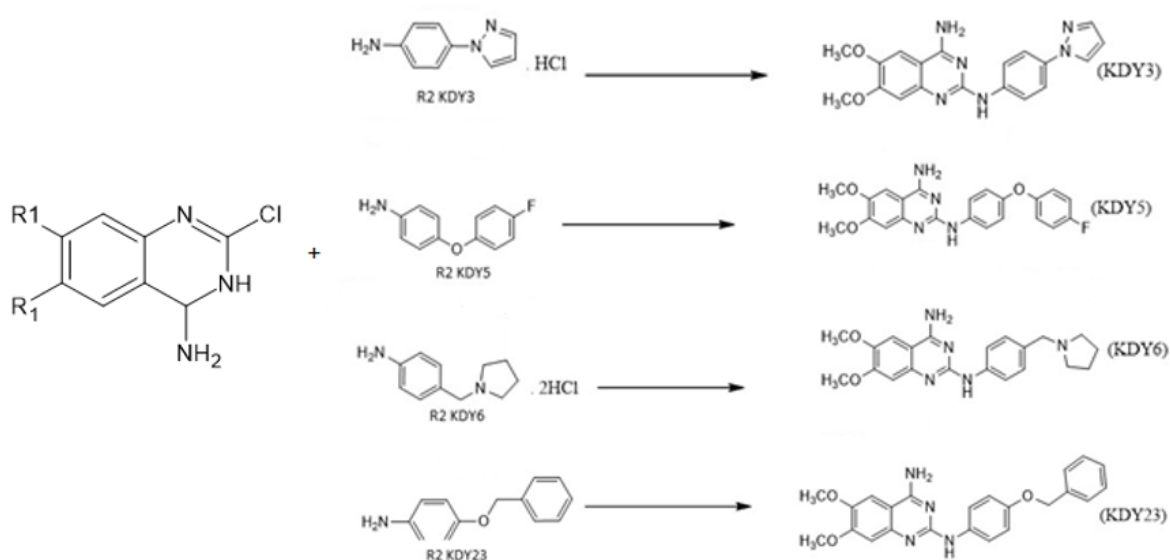
Estudos computacionais prévios para o desenvolvimento de novos fármacos podem ser executados para selecionar moléculas com bons parâmetros farmacocinéticos, alta atividade biológica de forma que exclua moléculas que não

possam, por exemplo, ter boa absorção, distribuição, metabolismo, excreção e ser tóxica, ou seja, utilizando metodologia como um filtro para selecionar moléculas mais promissoras com bons parâmetros farmacocinéticos (FERNANDES et al., 2015).

5.2 SÍNTESE DE MOLÉCULAS MAIS PROMISSORAS

As análises dos resultados dos estudos computacionais e a disponibilidade de recursos financeiros permitiram selecionar alguns reagentes para síntese. Assim, foram selecionadas algumas moléculas mais promissoras no estudo *in silico* para síntese e posterior testes *in vitro*, que são considerados etapas iniciais do desenvolvimento de novos fármacos. Inicialmente foram sintetizadas quatro derivados de quinazolininas que foram denominadas KDY3, KDY5, KDY6 e KDY23. Tal denominação foi necessária para proteção das moléculas que estavam em pedido de patente. As estruturas químicas dos derivados quinazolinínicos, seus precursores e os respectivos produtos estão representados na Figura 6.

Figura 6 - Esquema das estruturas químicas dos derivados quinazolinínicos propostas para a síntese. Patente BR 10 2024 019192 7.



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

As características químicas dos produtos das sínteses, levando em consideração o aspecto, cor e massa de produto são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Características químicas dos precursores e dos produtos obtidos na síntese.

Molécula	Aspecto (estado de agregação/ cor)	Formação de produto
R1	Pó branco	-
R2KDY3	Pó branco	-
KDY3	Pó branco	356mg
R2KDY5	Cristais brancos a bege escuro	-
KDY5	Pó cinza	280 mg
R2KDY6	Pó branco	-
KDY6	Pó branco	149,7mg
R2KDY23	Pó bege	-
KDY23	Pó marrom claro	256mg

Legenda: R1: precursor 1 (comum a todos as moléculas); R2KDY3 precursor 2 KDY3; R2KDY5 precursor 2 KDY5; R2KDY6 precursor 2 KDY6; R2KDY23 precursor 2 KDY23.
 Fonte: Elaborado pela autora (2024).

5.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

5.3.1 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica analítica sensível e não invasiva da interação da luz na região do infravermelho com uma molécula e, portanto, fornece os grupos funcionais de compostos orgânicos e inorgânicos, determinados por perfis de absorção e emissão. Quando a amostra é irradiada com uma fonte de luz na região do infravermelho, as ligações químicas que mantêm os átomos juntos absorvem essa radiação em frequências que correspondem aos seus modos de vibração (HORNEMANN, 2017; RAMOHLOLA, 2020).

A técnica de FTIR foi utilizada para avaliar se houve diferença nos espectros da amostra sintetizada comparada com seus precursores. Essa diferença de padrões de bandas indica que a molécula sintetizada é um produto diferente de seus precursores. Durante a formação de uma nova molécula, diversas ligações químicas acontecem provocando mudanças nos átomos que compõem as moléculas envolvidas, e a mudança nos modos vibracionais dará origem a um deslocamento de

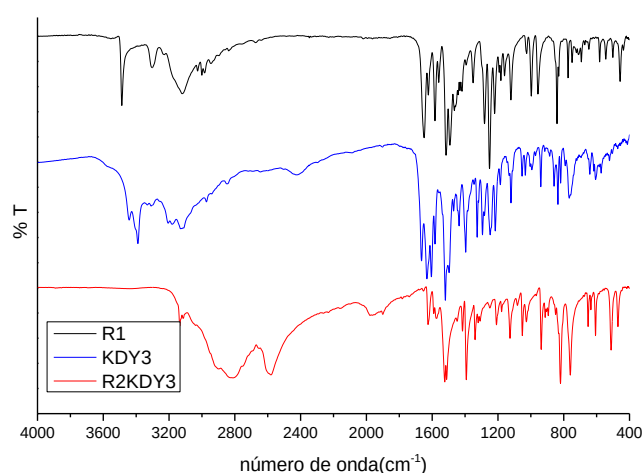
banda no espectro, no qual cada banda espectral representa um grupo funcional diferente (RAMOHLOLA et al., 2020).

Na Figura 7 estão apresentados os espectros de infravermelho da molécula KDY3. Tal molécula é uma das mais promissoras em relação aos resultados dos estudos *in vitro*, que serão mostrados a diante. Os espectros foram obtidos na região do infravermelho médio ($400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$) por possibilitar a observação dos principais modos vibracionais de moléculas orgânicas, tais como estiramento de ligações simples (O-H, C-H e N-H) (MOHAMED et al., 2017).

Ao comparar os espectros obtidos (Figura 7), é possível observar que ocorreram mudanças significativas do produto KDY3 em relação ao precursor 2, sendo observado o desaparecimento de bandas relacionadas ao grupo amina. Isso ocorre principalmente em relação a R2KDY3, com o desaparecimento das bandas na região $3000\text{ a }2200\text{ cm}^{-1}$ atribuídas ao sal de amônio quaternário (NH_4^+).

É possível observar a mudança nos espectros vibracionais da molécula em comparação com seus respectivos precursores, sugerindo a formação de novos grupos funcionais e formação de novo produto da reação.

Figura 7 - Espectros de infravermelho da molécula KDY3 sintetizada



Legenda: R1: precursor 1 (comum a todos as moléculas); KDY3: produto formado; R2KDY3: precursor 2.

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Os derivados de quinazolina apresentam principalmente três regiões de bandas de absorção em espectros de infravermelho: $1478\text{--}1517$, $1566\text{--}1581$ e $1612\text{--}1628\text{ cm}^{-1}$

-1; essas bandas estão correlacionadas aos grupos C-N, C=C e C=N, todas originadas de vibrações dos anéis aromáticos (HASHEM, 2019; UDREA, 2021).

5.3.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e Ponto de fusão

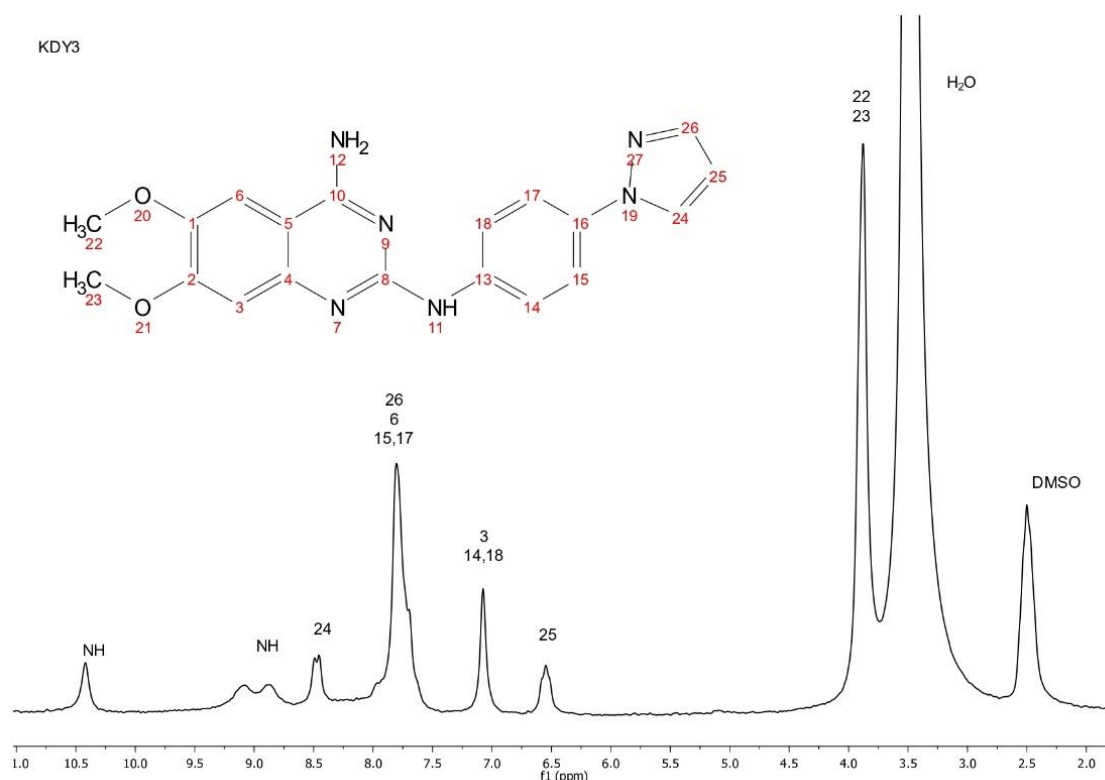
A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) permite a determinação de informações de nível atômico sobre interações intermoleculares, estrutura molecular e dinâmica molecular no ambiente celular. É um dos métodos amplamente utilizados para identificação e caracterização de espécies moleculares (PHAM; RAINEY, 2021).

O princípio da técnica é a absorção da radiação eletromagnética na região das radiofrequências, sendo o fenômeno observado em núcleos que possuem um momento magnético. Quando colocados em um campo magnético, os momentos nucleares se alinham em uma orientação determinada pelo spin nuclear, que é uma propriedade fundamental de certos núcleos. Os sinais de RMN refletem as mudanças detectadas pela radiação emitida quando os núcleos excitados retornam ao seu estado fundamental. O espectro obtido na RMN permite confirmar as interações intermoleculares e/ou formação de novas ligações evidenciando as variações no deslocamento químico, alterações no perfil do sinal ou nas suas intensidades (SWARBRICK, 2007; JANSOOK; OGAWA; LOFTSSON, 2018).

Após as análises do FTIR, realizaram-se as análises de RMN de ^1H na molécula KDY3. A Figura 8 apresenta os espectros de RMN de ^1H obtidos.

Os dados de ^1H RMN corroboram com os obtidos pelos espectros vibracionais de infravermelho demonstrando através dos espectros de deslocamento de hidrogênio que houve a formação de uma nova molécula. O pico apresentado na região 4 do espectro de KDY3 pode ser atribuído aos grupos metoxila do seu precursor 1 (4-amino-2-cloro-6,7-dimetoxiquinazolina). É possível observar também nesse espectro, o aparecimento de novos sinais de hidrogênio na região de 8,75 a 10,5 atribuídos a novos grupos NH formados na molécula. Já os múltiplos sinais presentes em KDY3 na região entre 7 e 8 podem ser atribuídos aos anéis aromáticos provenientes de seus precursores que se encontram sobrepostos.

Figura 8 - Espectro de RMN ^1H de KDY3 em DMSO d_6 com suas atribuições



Legenda: RMN de ^1H : ressonância magnética nuclear de hidrogênio

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

5.4 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

5.4.1 Ensaio de viabilidade celular com linhagem de glioblastoma após tratamento com os compostos KDYs sintetizados

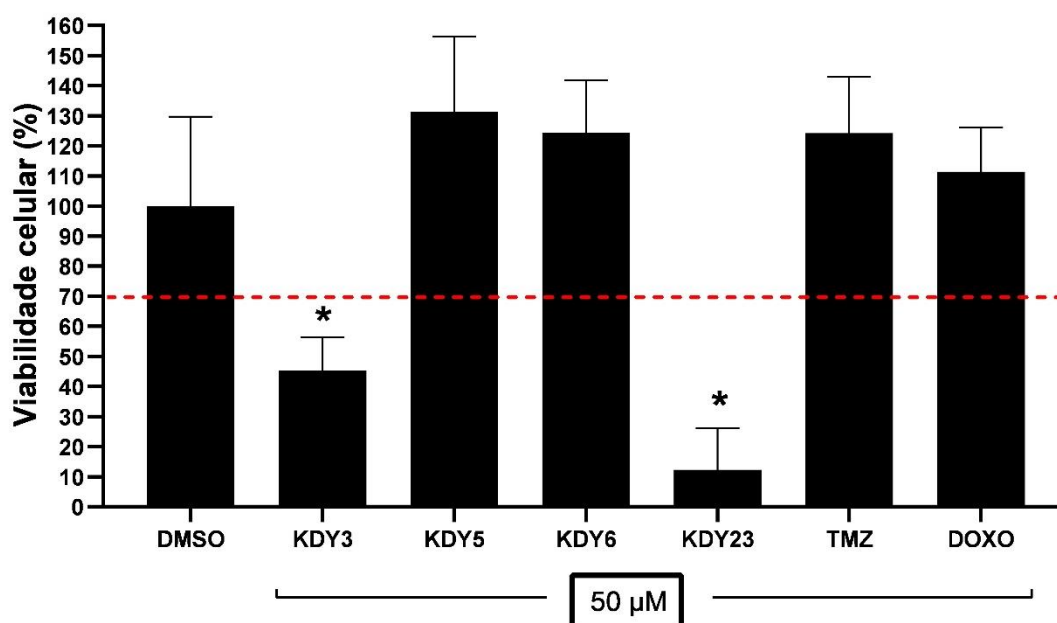
A análise da viabilidade celular é essencial para grande parte dos ensaios *in vitro*. O ensaio colorimétrico de MTT é uma das ferramentas mais amplamente utilizadas para estudos de viabilidade celular, proliferação e citotoxicidade *in vitro* como meio de encontrar novos candidatos a fármacos para inibição de células cancerígenas. Comparado com métodos alternativos, o MTT é mais simples e menos demorado, e também permite avaliação semiautomática usando placas multipoços e leitores de placas fotométricos (GASPARINI, 2017; STOCKERT, 2018).

O mecanismo bioquímico do teste envolve enzimas oxidoredutases celulares que convertem o corante de MTT amarelo insolúvel, por meio da redução do seu anel tetrazólico, em cristais solúveis de formazan de coloração azul-violeta. Após a redução

do MTT, o meio de cultura é removido e os depósitos de formazan são avaliados colorimetricamente. A intensidade da cor do formazan é proporcional ao número de células viáveis e metabolicamente ativas (STOCKERT, 2018; BURANAAMNUAY, 2021).

Primeiramente realizamos uma triagem inicial com as moléculas já sintetizadas denominadas KDY3, KDY5, KDY6, KDY23. Os resultados dos ensaios de viabilidade celular após tratamento com tais moléculas, e com os controles positivos TMZ, e DOXO (todos na concentração de 50 μ M), pelo período de 24 horas, estão representados nas Figura 9.

Figura 9 – Viabilidade celular das células de GBM (U87-MG) após tratamento com KDYs



* $p < 0,05$ células tratadas a uma concentração de 50 μ M por 24 horas vs DMSO. Os resultados são representativos de um experimento apenas.

DMSO: dimetilsulfóxido; TMZ: temozolomida; DOXO: doxorrubimicina

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

O teste com a linhagem tumoral de glioblastoma (GBM) foi escolhido porque, em outro estudo realizado por Antunes (2013), moléculas análogas já haviam demonstrado reduzir mais a viabilidade celular em linhagens de glioblastoma do que em outras linhagens.

A ISO:100993-5 define que um material será considerado citotóxico se, no ensaio de viabilidade celular, a porcentagem de absorbância celular estiver abaixo de 70% (ISO:10993-5, 2009).

Nessa triagem inicial, pode ser observado um resultado bastante promissor para duas moléculas denominadas KDY3 e KDY23. Assim, KDY3 reduziu significativamente em aproximadamente 55% da viabilidade celular e KDY23 reduziu aproximadamente 87%. Os tratamentos com KDY5 e KDY6 não reduziram significativamente a viabilidade celular, assim como os controles TMZ e DOXO também não reduziram.

As moléculas KDY3 e KDY23 na concentração de 50 μ M mostraram-se mais promissoras para inibir a viabilidade celular na linhagem tumoral de GBM do que o fármaco de referência para glioblastoma – temozolomida (TMZ). Nessa mesma concentração a temozolomida não foi capaz de reduzir a viabilidade celular. As moléculas KDY3 e KDY23 também apresentaram maior efeito em reduzir a viabilidade celular em GBM comparada com DOXO, um importante quimioterápico utilizado em terapias de diferentes tipos de câncer.

No trabalho desenvolvido por Tresch et al. (2021) onde avaliava dentre outros a viabilidade celular *in vitro* de células gliais humanas e caninas utilizando diferentes dosagens de TMZ, foi demonstrado que para a linhagem U87-MG a dosagem de TMZ utilizada para diminuir a viabilidade celular em 91% foi de 400 μ M, concentração muito superior à que foi utilizada nesse trabalho para KDY3 e KDY23.

Em estudo realizado por Atif et al. (2015) foi realizada uma exposição repetida a diferentes concentrações de TMZ por 3 dias e não houve redução da viabilidade das células U87-MG, mesmo na concentração mais alta de 200 μ M. Após 6 dias de exposição repetida, a viabilidade celular apresentou uma diminuição nessa mesma concentração, mas de apenas 20%.

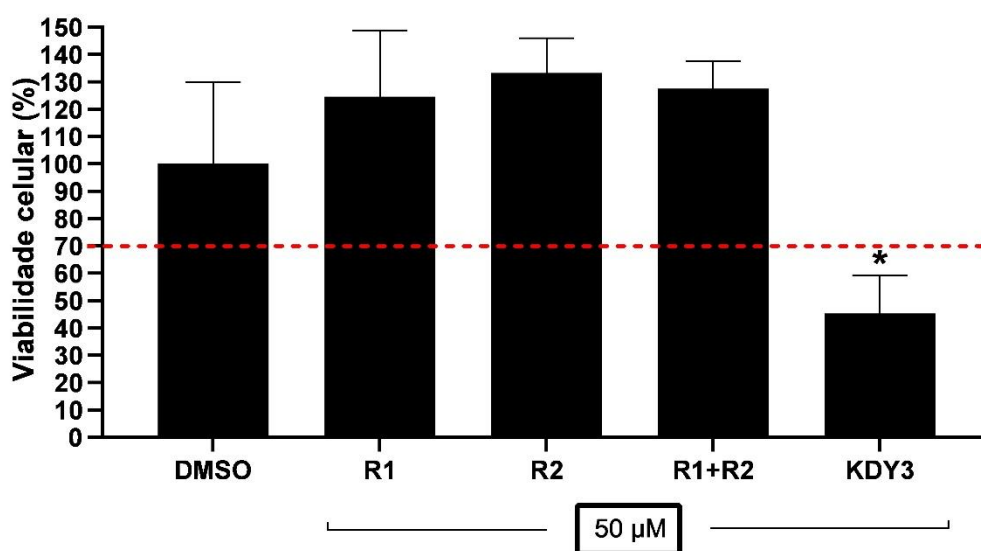
Outro trabalho que apresentou alguns dados da viabilidade celular de TMZ utilizando o mesmo método e a mesma linhagem celular de GBM utilizada no presente estudo foi o realizado por Pazhouhi e colaboradores (2016). Foi testada a associação do fármaco à timoquinona a fim de avaliar um efeito sinérgico da TMZ. Os resultados apresentados demonstraram que a viabilidade celular após 24 horas de tratamento com TMZ associada a timoquinona numa concentração de 200 μ M reduziu a um pouco mais de 20% a quantidade de células viáveis.

As moléculas KDY3 e KDY23 apresentaram maior efeito de citotoxicidade nas células de glioblastoma de acordo com a triagem inicial. Assim, neste presente estudo, os demais ensaios foram direcionados principalmente para KDY3, de forma que KDY23 foi analisada com mais ênfase em outro estudo por integrante do mesmo grupo de pesquisa.

5.4.2 Ensaio de viabilidade celular com linhagem de glioblastoma após tratamento com os precursores de KDY3

Um ensaio de viabilidade celular foi realizado com os precursores utilizados na síntese de KDY3. Tal experimento visa assegurar que a inibição da viabilidade celular mediada por KDY3 em células de glioblastoma está ocorrendo devido ao produto da reação de formação de KDY3 e não de seus precursores. Então, foi utilizado ensaio de MTT, para viabilidade das células de glioblastoma (T98G) após tratamento com os precursores de KDY3 (Figura 10).

Figura 10 – Percentagem de viabilidade celular das células de GBM (T98G) após tratamento com precursores de KDY3



FONTE: Elaborada pela autora (2025)

* $p < 0,05$ vs DMSO. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes.

R1: 4-amino-2-cloro-6,7-dimethoxiquinazolina

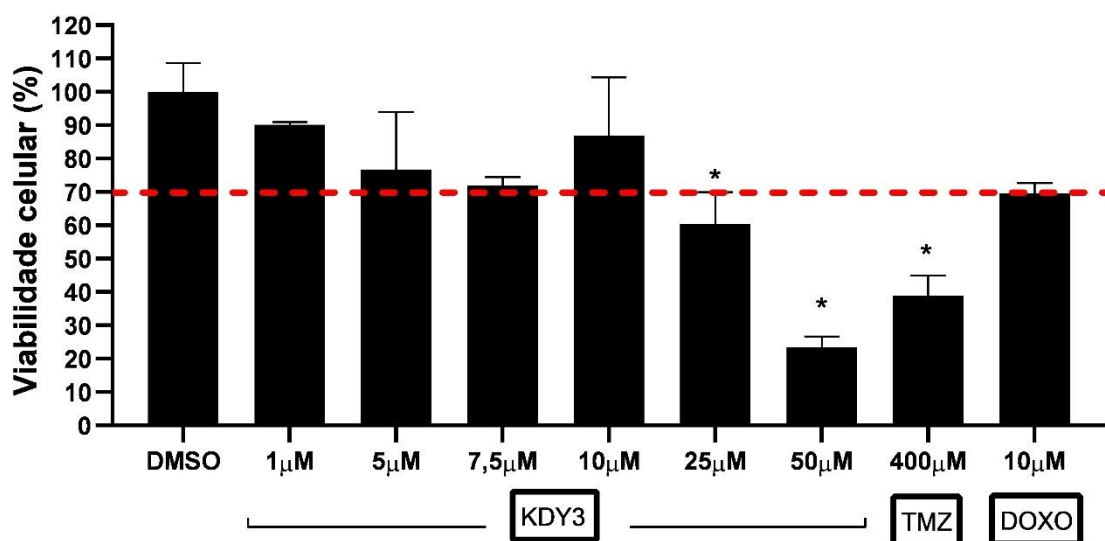
R2: 4-(1H-Pyrazol-1-yl)aniline

A Figura 10 mostra que os precursores da síntese de KDY3 isolados (R1 e R2) ou misturados (R1+R2) na concentração de 50 μ M não diminuíram a viabilidade das células de GBM. O resultado obtido sugere que o efeito citotóxico apresentado nas células de glioblastoma foi devido a presença do produto da síntese de KDY3.

5.4.3 Avaliação do efeito dose-resposta de KDY3 na viabilidade celular em linhagens de glioblastoma

Para avaliar o efeito dose-resposta de KDY3 na viabilidade celular da linhagem de glioblastoma (U87-MG) foram realizados novos ensaios de MTT com diferentes concentrações de KDY3 (1 μ M, 5 μ M, 7,5 μ M, 10 μ M, 25 μ M e 50 μ M), representado na Figura 11.

Figura 11 - Dose resposta de KDY3 em linhagem de glioblastoma (U87-MG)



*p<0,05 tratamento realizado por 24 horas vs PBS. Os resultados são representativos de um experimento apenas.

DMSO: dimetilsulfóxido; TMZ: temozolomida; DOXO: doxorubicina

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

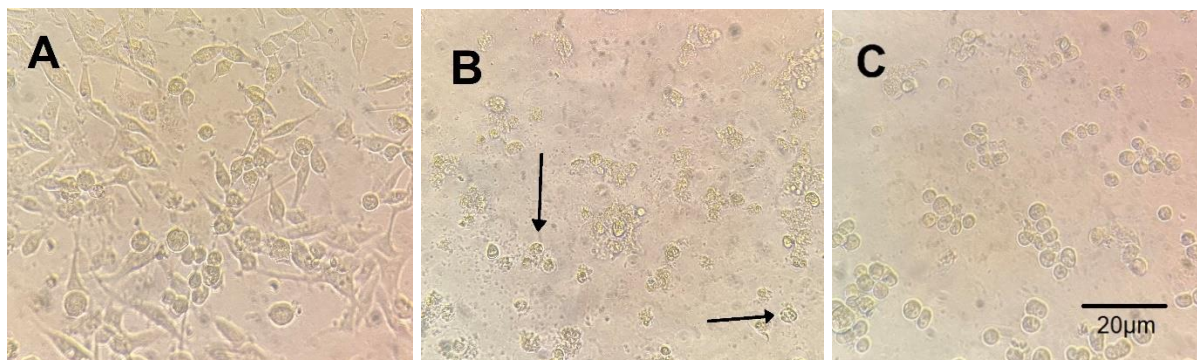
No gráfico de dose-resposta foi observado que à medida que a concentração de KDY3 aumenta, seu potencial citotóxico na linhagem de glioblastoma também aumenta, isso ocorre através da redução da viabilidade celular. O tratamento com KDY3 nas concentrações 1 μ M, 5 μ M, 7,5 μ M e 10 μ M não induziu alteração significativa da viabilidade. O tratamento com DOXO na concentração de 10 μ M

também não reduziu significativamente a viabilidade. Os tratamentos com 25 μM e 50 μM de KDY3 reduziram significativamente a viabilidade celular, sendo observada a redução de aproximadamente 76% na concentração de 50 μM de KDY3. Como foi visto em estudos de Tresch et al. (2021) que a dosagem de TMZ utilizada para diminuir a viabilidade celular havia sido de 400 μM , testamos a TMZ nessa concentração também, e a redução da viabilidade foi de aproximadamente 61%. Este resultado demonstra que KDY3 na concentração de 50 μM apresenta maior redução da viabilidade celular quando comparado com a redução promovida pela TMZ em concentração mais alta, que é de 400 μM .

O câncer do tipo glioblastoma possui uma maior incidência em idosos, e devido à degeneração da função imunológica nesses pacientes, a tolerância e sensibilidade ao tratamento com TMZ são enfraquecidas. Portanto, o tratamento de longo prazo com dose convencional de TMZ pode aumentar o risco de reações adversas e complicações em pacientes idosos (TAO et al., 2022). De acordo com Beth-Tasdogan (2022), um fator de risco para reações adversas a medicamentos são doses mais elevadas do fármaco, assim, KDY3 pode apresentar vantagens em relação à TMZ porque conseguiu inibir a viabilidade celular em glioblastoma em uma concentração oito vezes menor, o que sugere uma possível redução de efeitos adversos em relação à TMZ.

A morfologia das células de glioblastoma U87-MG pode ser avaliada em experimentos. Assim, a Figura 12 ilustra a morfologia das células U87-MG em DMSO, após o tratamento com KDY3 na concentração de 50 μM e após o tratamento com TMZ em 400 μM .

Figura 12 – Imagens das células de glioblastoma (U87-MG) após tratamento por 24 horas com **(A)** DMSO, **(B)** KDY3 na concentração de 50 μM e **(C)** TMZ em 400 μM



Aumento de 20x

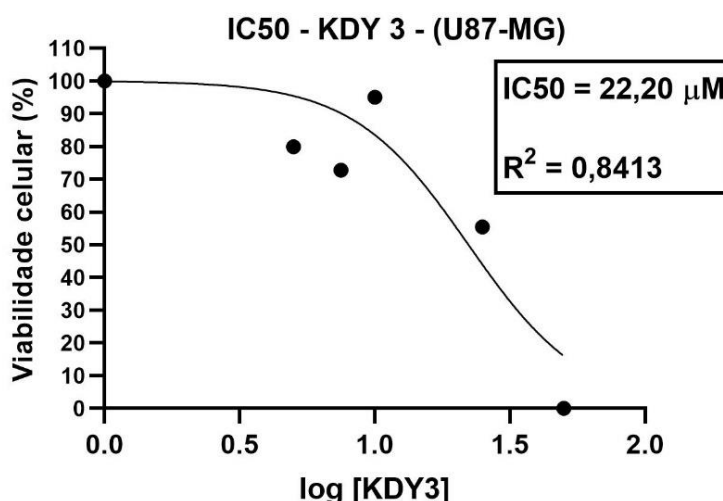
Legenda: **(A)** DMSO, **(B)** KDY3 e **(C)** TMZ

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Nas imagens é possível observar que as células tratadas com KDY3 perderam sua forma de lança cônica característica dessa célula e adquiriram uma morfologia arredondada. É nítido também a diminuição expressiva do número de células comparadas ao controle DMSO. Além disso, nota-se que as células apresentam morfologia parecida quando tratadas com KDY3 na concentração de 50 μM e TMZ em 400 μM , o que significa que o KDY3 traz resultados semelhante à TMZ, porém em concentrações reduzidas.

A partir dos resultados de citotoxicidade obtidos na análise de dose-resposta, foi calculado o valor da concentração inibitória responsável por diminuir 50% da viabilidade celular (IC_{50}) de KDY3 na linhagem U87-MG. Posteriormente, foi feita análise de regressão não linear e plotado um gráfico com a viabilidade em porcentagem *versus* log da concentração de KDY3. Conforme indicado na Figura 13, a concentração que reduziu em 50% a viabilidade das células U87-MG foi de 22,2 μM .

Figura 13 - IC_{50} de KDY3 em linhagem tumoral de glioblastoma (U87-MG)



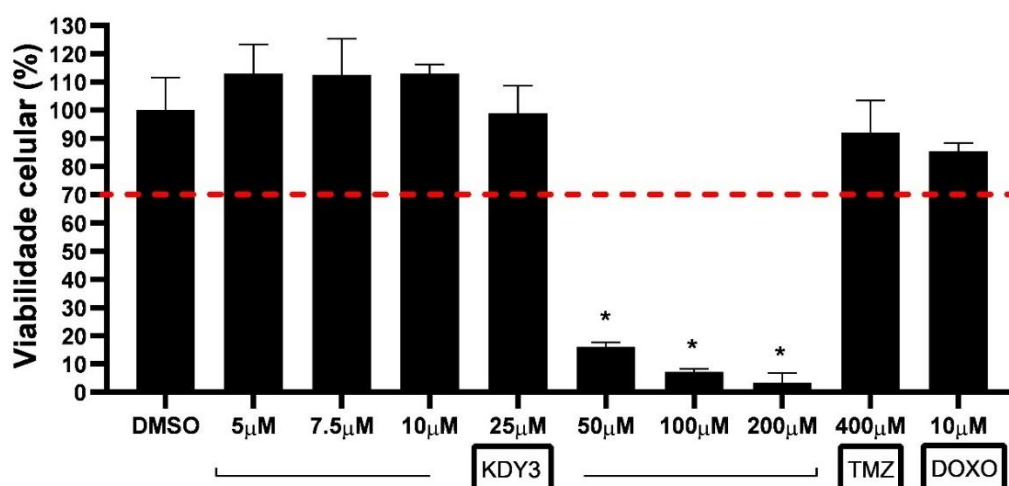
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Em estudos realizados por Poon et al. (2021) foi avaliada a sensibilidade à TMZ medida pela metade da concentração inibitória máxima (IC_{50}) em diferentes linhagens celulares. A dose obtida para linhagem U87-MG para TMZ foi de 123,9 μM . Este resultado demonstra que KDY3 utiliza de doses muito baixas para a diminuição da

viabilidade celular de GBM, sugerindo maior eficácia *in vitro* comparada ao fármaco de primeira escolha para o tratamento da doença.

Uma outra linhagem tumoral de glioblastoma (T98G) foi utilizada para confirmação da capacidade em reduzir a viabilidade celular de KDY3 em glioblastoma. Assim, foi avaliado a redução da viabilidade celular na linhagem T98G por diferentes concentrações de KDY3 (5 μ M, 7,5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M e 200 μ M), representado na Figura 14.

Figura 14 - Dose resposta de KDY3 em linhagem de glioblastoma (T98G)



* $p < 0,05$ tratamento realizado por 24 horas vs PBS. Os resultados são representativos de três experimento independentes.

DMSO: dimetilsulfóxido; TMZ: temozolomida; DOXO: doxorrubimicina

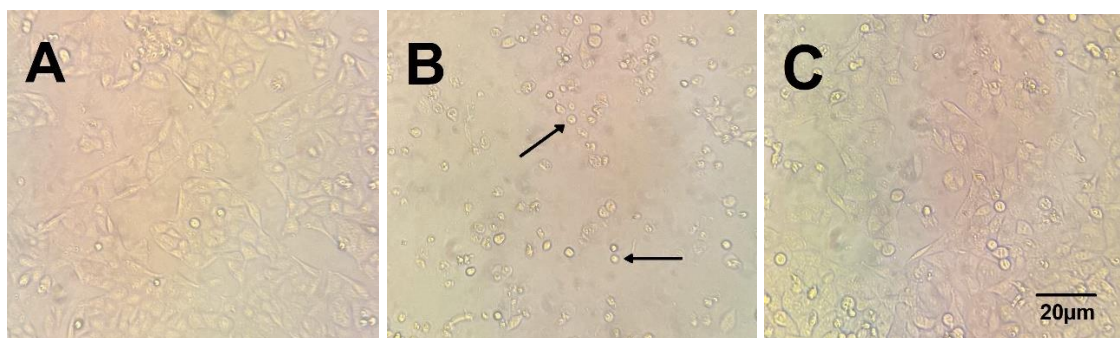
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

O resultado obtido com a linhagem T98G visto na Figura 14 mostra que da mesma forma que na linhagem U87-MG, à medida que a concentração de KDY3 aumenta, seu potencial citotóxico também aumenta. O tratamento nas concentrações 5 μ M, 7,5 μ M, 10 μ M e 25 μ M não induziu alteração significativa da viabilidade celular. TMZ e DOXO também não reduziram significativamente a viabilidade. Os tratamentos com 50 μ M, 100 μ M e 200 μ M de KDY3 apresentaram redução significativa, de aproximadamente 84%, 93% e 97% respectivamente. Estes resultados demonstram que KDY3 nestas três concentrações mais baixas que a de TMZ (400 μ M), ainda apresenta melhor resultado de citotoxicidade para a linhagem T98G.

Em outros estudos com a linhagem celular T98G, foi observado que essas células são mais resistentes ao tratamento com TMZ em comparação a outras linhagens de glioblastoma. Em ensaios de viabilidade celular realizados com algumas linhagens celulares, a T98G apresentou maior resistência ao medicamento quimioterápico TMZ com redução de apenas 20% da viabilidade celular. Foi observado que, diferente das outras linhagens, na T98G, o tratamento com TMZ não resultou na parada do ciclo celular e causou menor quantidade de danos ao DNA. Esses dados confirmaram a resistência acentuada ao tratamento com TMZ das células T98G, e a importância de novas alternativas de tratamento para glioblastoma (SOUZA et al., 2022).

A Figura 15 mostra a morfologia das células T98G em DMSO, após o tratamento com KDY3 e após o tratamento com TMZ.

Figura 15 - Imagens das células de glioblastoma (T98G) após tratamento por 24 horas com **(A)** DMSO, **(B)** KDY3 na concentração de 50 μ M e **(C)** TMZ em 400 μ M



Aumento de 20x

Legenda: **(A)** DMSO, **(B)** KDY3 e **(C)** TMZ

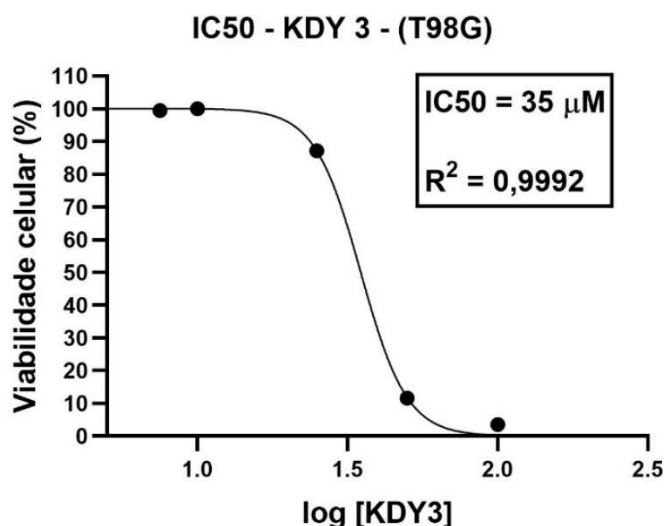
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Nas imagens é possível observar que as células T98G tratadas com KDY3 também perderam sua morfologia de lança cônica característica para adquirir uma morfologia arredondada, além de terem reduzido expressivamente o número de células comparadas ao controle DMSO. A proporção de células que perderam sua morfologia foi menor no tratamento com TMZ, assim como a redução do número de células, o que indica a resistência das células T98G frente a temozolomida.

Os dados obtidos na análise de dose-resposta foram utilizados para calcular o valor de IC₅₀ de KDY3 na linhagem T98G. Assim, foi feita análise de regressão não

linear e plotado um gráfico com a viabilidade em porcentagem *versus* log da concentração de KDY3. Conforme indicado na Figura 16, a concentração que reduziu em 50% a viabilidade das células T98G foi de 35 μM .

Figura 16 - IC₅₀ de KDY3 em linhagem tumoral de glioblastoma (T98G)



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

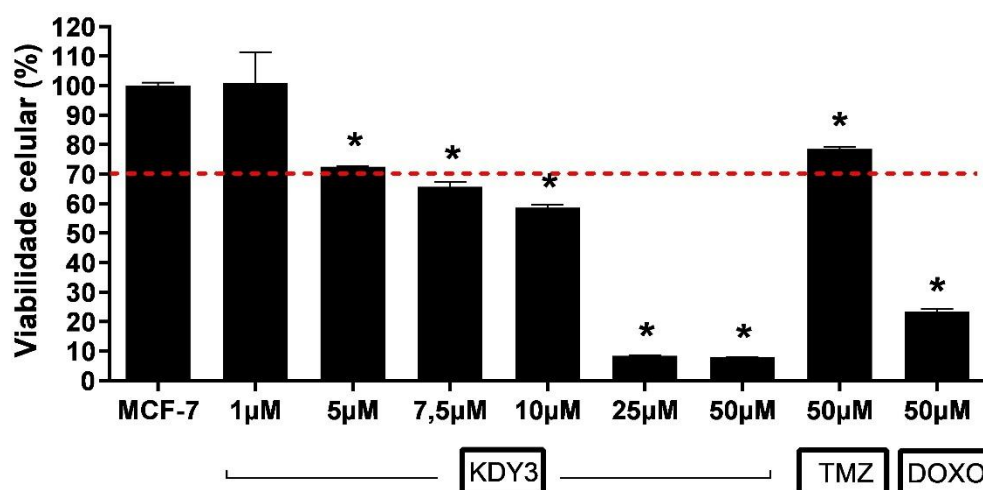
Poon et al. (2021) avaliou a sensibilidade à TMZ medida pela metade da concentração inibitória máxima (IC₅₀) em diferentes linhagens celulares. O IC₅₀ de TMZ para linhagem T98G foi de 438,3 μM . Este resultado demonstra que KDY3 utiliza doses mais baixas para a diminuição da viabilidade celular de GBM, sugerindo maior eficácia *in vitro* comparada à TMZ.

5.4.4 Avaliação do efeito dose-resposta de KDY3 na viabilidade celular em linhagem de câncer de mama

A inibição da viabilidade celular da linhagem celular tumoral MCF-7 de câncer de mama foi avaliada após tratamento com diferentes concentrações de KDY3 (1 μM , 5 μM , 7,5 μM , 10 μM , 25 μM e 50 μM), representado na Figura 17.

No caso do câncer de mama, as células MCF-7 são comumente aplicadas como modelo na pesquisa do câncer para definir o prognóstico e as especificidades do tratamento em nível molecular, que podem então ser utilizadas para o desenvolvimento de fármacos anticâncer (RAMAZI et al., 2023).

Figura 17 - Dose resposta de KDY3 em linhagem tumoral de câncer de mama (MCF-7)



* $p < 0,05$ tratamento realizado por 48 horas vs MCF-7. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

DMSO: dimetilsulfóxido; TMZ: temozolomida; DOXO: doxorrubimicina

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

No experimento para obter a dose-resposta (Figura 17) foi observado que à medida que a concentração de KDY3 aumenta, seu potencial citotóxico para a linhagem tumoral MCF-7 também aumenta devido à redução da viabilidade celular nesta linhagem celular. Apenas o tratamento de KDY3 na concentração de 1 µM não induziu alteração significativa da viabilidade celular. Os tratamentos com 25 µM e 50 µM de KDY3 apresentaram melhores resultados reduzindo significativamente a viabilidade celular em mais de 90% em ambas as concentrações. Este resultado demonstra que o tratamento com KDY3 na concentração de 25 µM apresenta maior redução da viabilidade celular quando comparado com a redução promovida pela TMZ e DOXO em concentração mais alta, ou seja, na concentração de 50 µM dos fármacos citados.

De acordo com estudos realizados por Kheradmand et al. (2021) a DOXO tem efeitos antitumorais nas células MCF-7 de uma maneira dependente da dose. Células tratadas com DOXO em 1 µM, 5 µM e 10 µM apresentaram redução de aproximadamente 18%, 32% e 60% da viabilidade celular. No presente estudo, os resultados seguiram na mesma proporção visto que a DOXO na concentração de 50 µM reduziu a viabilidade celular em aproximadamente 75%.

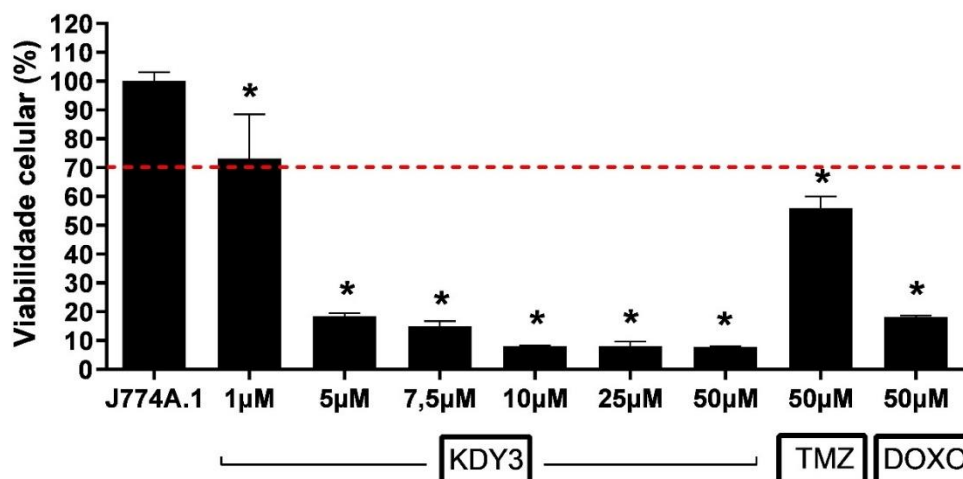
A doxorubicina (DOXO) é um dos medicamentos mais comumente usados no tratamento de pacientes com câncer de mama. Apesar disso, seu uso clínico é amplamente restrito devido aos seus efeitos adversos críticos, como: mucosite, alopecia, mielossupressão vômitos e insuficiência cardíaca (RAMAZI et al., 2023). A DOXO deve ser administrada em altas doses durante o tratamento quimioterápico devido à sua baixa capacidade de distribuição e tem sido associada a causar toxicidades em vários órgãos, como coração, fígado e rim (DHUNGEL et al., 2024). Diante disso, é importante a busca por outras alternativas terapêuticas que possam apresentar melhores resultados de citotoxicidade para células tumorais, em doses menores e com menores efeitos adversos. Assim, o resultado obtido por KDY3 em apresentar uma maior redução da viabilidade celular em linhagem tumoral de câncer de mama em relação à DOXO, sugere uma possibilidade de novo tratamento com uma provável dose efetiva menor do que a DOXO. Isso pode acarretar menor possibilidade de reações adversas.

Uma vez que a DOXO é conhecida por causar danos cardíacos, diminuindo a função cardíaca em até 11%, Chen et al. (2023) realizou ensaios de MTT para avaliar a redução da viabilidade celular induzida pela DOXO em células saudáveis de cardiomiócitos humanos da linhagem celular AC16. Os resultados demonstraram diminuição de 6,5%, 22,3% e 37,2% em tratamento com 0,1 μ M, 0,2 μ M e 0,3 μ M de DOXO, respectivamente, confirmando que DOXO induz toxicidade em células saudáveis. Conforme foi descrito acima, um dos grandes problemas do tratamento com a DOXO é provocar toxicidade cardíaca (DHUNGEL et al., 2024). Considerando-se que diversos fármacos da mesma classe do KDY3 possuir o grupo farmacofórico quinazolina não apresentar relatos de toxicidade cardíaca, isso pode ser considerado uma vantagem de KDY3 em relação à DOXO para o tratamento do câncer de mama.

5.4.5 Avaliação do efeito dose-resposta de KDY3 na viabilidade celular em linhagem não tumoral (J774.A1)

A avaliação da inibição de viabilidade celular em uma linhagem não tumoral também foi realizada. Assim, foi utilizado a linhagem de células não tumorais de macrófagos J774 para avaliar o efeito citotóxico de KDY3 nessas células. Foi realizado tratamento com diferentes concentrações de KDY3 (1 μ M 5 μ M, 7,5 μ M, 10 μ M, 25 μ M e 50 μ M) representado na Figura 18.

Figura 18 - Dose resposta de KDY3 em linhagem não tumoral de macrófagos (*JTT4.A1*)



* $p < 0,05$ tratamento realizado por 48 horas vs J774A.1. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

DMSO: dimetilsulfóxido; TMZ: temozolomida; DOXO: doxorrubimicina

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

O tratamento com KDY3 reduziu a viabilidade celular de *JTT4.A1* em todas as concentrações. TMZ e DOXO também reduziram significativamente a viabilidade celular.

Embora a seletividade seja uma característica positiva em um quimioterápico, a grande maioria dos fármacos hoje disponíveis para tratamento de câncer atinge também as células não cancerosas, isso acontece também com a TMZ que embora seja o fármaco padrão para tratamento de GBM, apresenta, dentre alguns pontos negativos já citados nesse trabalho, uma toxicidade severa que desencadeia vários efeitos adversos (RAMALHO, 2019; KADHIM, 2022). Frequentemente, até mesmo os medicamentos antineoplásicos mais eficazes atualmente usados na clínica não permitem a cura completa de forma eficiente devido à toxicidade relacionada. A razão para a toxicidade está na falta de seletividade para células cancerígenas da grande maioria dos agentes anticâncer.

A quimioterapia tradicional afeta as principais vias de sinalização, proliferação celular, sobrevivência, migração, adesão, diferenciação e superexpressão em vários tumores sólidos. No entanto, alguns tecidos saudáveis têm uma alta taxa fisiológica de proliferação e os danos às células normais não podem ser evitados (CATANZARO

et al., 2020). A maioria dos agentes anticancerígenos atuais não diferencia entre células cancerígenas e normais, levando a toxicidade sistêmica e efeitos adversos.

Uma possibilidade viável pode ser a utilização de nanotecnologia, empregando metodologias para preparar materiais e dispositivos com características e tamanhos únicos, muitas vezes na faixa de 1 a 100 nanômetros. As nanopartículas poliméricas demonstraram aumentar a biodisponibilidade do fármaco para as células cancerosas, ao mesmo tempo em que superam a resistência a múltiplos fármacos, proporcionando assim uma entrega segura através da circulação sistêmica e através da administração oral direta, se adotada (KADHIM et al., 2022; BAHJAT et al., 2022; PATRA et al., 2018). Conforme já foi relatado, nosso grupo de pesquisa irá pesquisar a possibilidade de realizar a nanoestruturação das moléculas mais promissoras (KDY3 e KDY23) para o tratamento do glioblastoma e câncer de mama.

5.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

5.5.1 Avaliação de expressão gênica das células T98G após tratamento com KDY3

Os ensaios de qRT-PCR foram realizados através da extração de RNA total das células T98G tratadas com PBS, KDY3 (50 μ M) e TMZ (400 μ M). A Tabela 3 apresenta a quantificação do RNA total e os valores da razão da absorbância A260nm / A280nm, que mostram a qualidade do RNA extraído.

Tabela 3 - Quantificação de RNA total e razão da absorbância A260nm/ A280nm

Amostras	Quantificação RNA total	Relação Abs 260/280
PBS	68,4 ng/ μ L	1,379
KDY3	76 ng/ μ L	1,377
TMZ	106,8 ng/ μ L	1,467

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Através dos ensaios de qRT-PCR foi avaliada a expressão de genes relacionados com a sobrevivência e a proliferação celular afim de verificar a(s) via(s) de sinalização que são modificadas positiva ou negativamente após o tratamento com

KDY3 em células T98G. Foram avaliados 6 genes sendo um deles o normalizador *GAPDH*.

Para quantificar com precisão os níveis de mRNA em diferentes tipos de amostras de estudo, é fundamental normalizar os dados de RT-qPCR utilizando um gene de manutenção apropriado como controle interno, conhecido por expressar-se de forma estável em todas as condições experimentais. Esses genes são chamados de normalizadores porque sua expressão permanece constante nas células ou tecidos sob investigação (VERMANI; KUMAR; KUMAR, 2020). Entre muitos genes de manutenção, o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) tem sido amplamente utilizado para normalização de dados de expressão gênica (SIKAND et al., 2012).

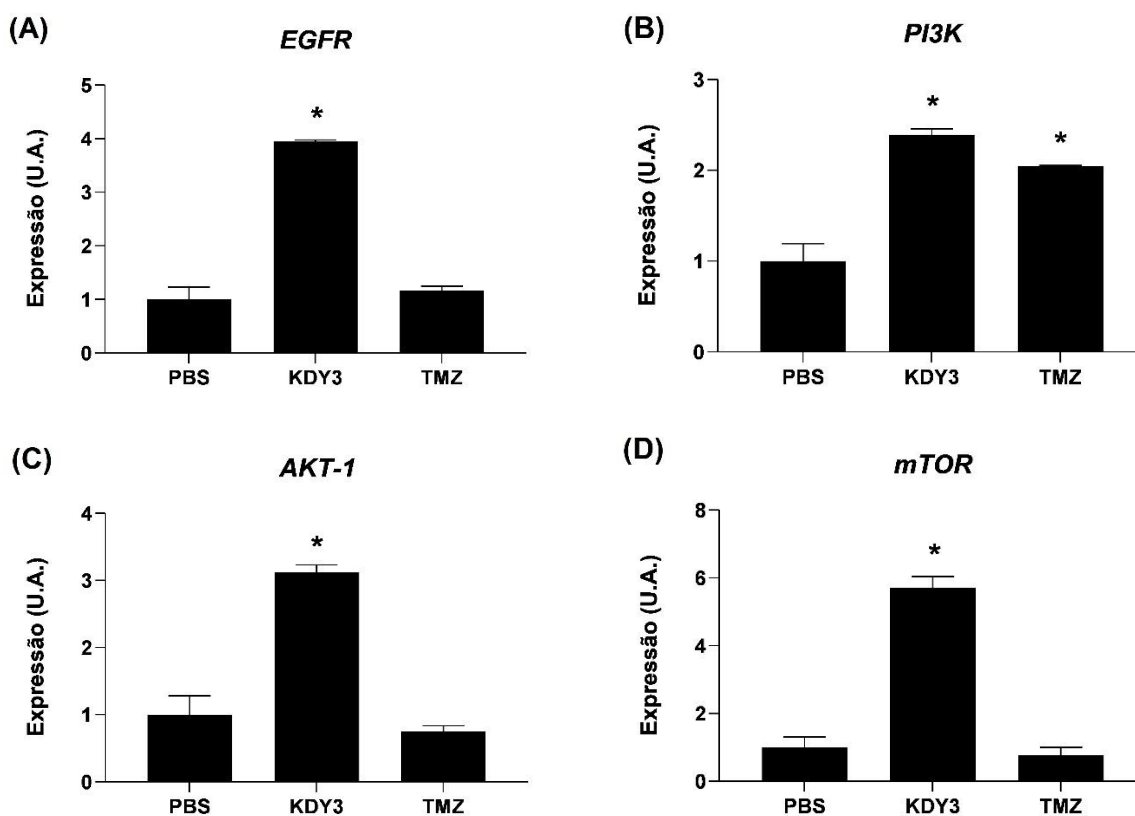
Além do gene normalizador *GAPDH*, foram avaliados os genes: *EGFR*, *PI3K*, *AKT-1*, *mTOR* e *Src*. Todos esses genes expressam proteínas relacionadas as vias de proliferação, apoptose, migração e/ ou angiogênese celular. A hiperativação do *EGFR*, que é amplamente encontrado na maioria dos GBMs, pode ativar *Src*. A relação entre a ativação de *Src* e a progressão do câncer parece ser significativa e pode ter influência no desenvolvimento do fenótipo metastático (FANG, 2021; IRBY; YEATMAN, 2000).

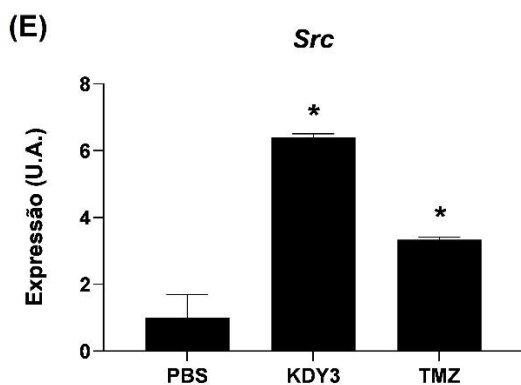
O receptor EGFR é um dos alvos terapêuticos mais utilizadas para bloquear a progressão de diversos tipos de tumores malignos, incluindo câncer de pulmão, mama, esôfago, cólon, pâncreas e próstata. A primeira geração de agentes inibidores de tirosina quinase, gefitinib e erlotinib reduzem rapidamente o tamanho do tumor no tratamento de câncer de pulmão de células não pequenas, bem como, lapatinib é reconhecido como um inibidor duplo de EGFR e HER2 (receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano), aprovado para câncer de mama metastático. Esses inibidores de tirosinas quinases (gefitinibe, erlotinibe e lapatinibe) são competidores reversíveis contra o sítio de ligação do EGFR e têm sido usados com sucesso clínico. EGFR é um dos alvos de fármacos mais valiosos para o tratamento do câncer de pulmão de células não pequenas (SUN, 2020; CUARTAS, 2021; LI, 2019).

Estudos demonstraram que a via *PI3K/AKT/mTOR* está presente nos processos biológicos de células cancerígenas, incluindo a iniciação, crescimento, metástase, senilidade e morte. Já foi demonstrado que a via *PI3K/AKT* contribui para o crescimento e a sobrevivência de vários tumores e que *mTOR*, uma das proteínas a jusante na via *PI3K/AKT*, é considerada o ponto de verificação central para a regulação negativa da autofagia (XING et al., 2023).

Na Figura 19 podemos observar que a análise por PCR em tempo real dos grupos tratado com KDY3 apresentou aumento expressivo no nível de RNA mensageiro (mRNA) em todos os genes transcritos (*EGFR*, *PI3K*, *AKT-1*, *mTOR* e *Src*) de 295%, 139%, 212%, 472% e 540% respectivamente comparado ao grupo controle (PBS). O tratamento com TMZ apresentou aumento no nível de mRNA em relação ao controle nos genes transcritos *EGFR*, *PI3K* e *Src* de aproximadamente 16%, 105% e 234% respectivamente, e apresentou redução nos níveis de mRNA nos genes transcritos *AKT-1* e *mTOR* de aproximadamente 25% em ambos comparados ao grupo controle.

Figura 19 - Avaliação da expressão gênica dos genes *EGFR*, *PI3K*, *AKT-1*, *mTOR* e *Src* após tratamento das células T98G com KDY3





* $p < 0,05$ vs PBS

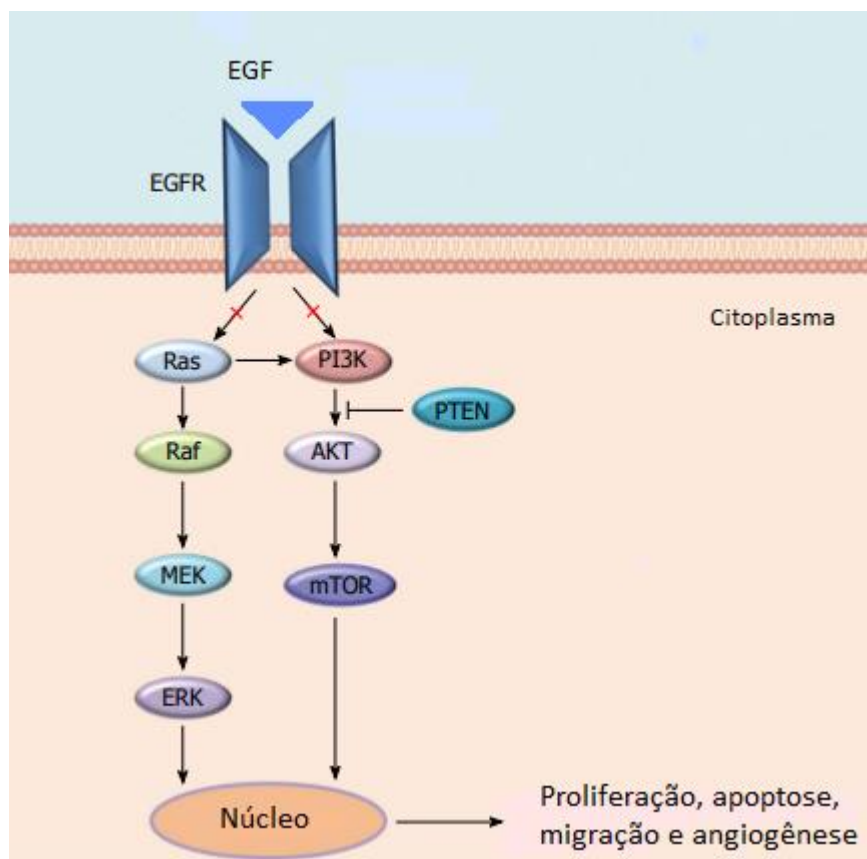
Legenda: **(A)** *EGFR*, **(B)** *PI3K*, **(C)** *AKT-1*, **(D)** *mTOR*, **(E)** *Src*

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Diante dos resultados apresentados é possível observar que KDY3 não reduziu a expressão de EGFR, PI3K, AKT, mTOR e Src em relação ao controle PBS, o que sugere que não é através da inibição desses genes que esta quinazolina exerce seu mecanismo de ação de morte celular em T98G. Em vez disso, KDY3 aumentou significativamente a expressão de todos os genes transcritos. Isso pode sugerir a possibilidade de KDY3 estar atuando na inibição de outra via de sobrevivência das células, e com isso, através de uma resposta celular compensatória, pode estar aumentando a expressão da via EGFR/PI3K/AKT/mTOR como mecanismo de defesa das células cancerígenas na tentativa de sobrevivência quando tratadas com KDY3.

A via RAS/RAF/MEK/ERK é uma via de sinalização crítica na transmissão de sinais das membranas para o núcleo. E assim como PI3K/AKT/mTOR, a ativação das vias de sinalização RAS/RAF/MEK/ERK foi observada em uma grande fração de cânceres sólidos. Ambas as vias compartilham entradas comuns e também podem ser ativadas via RAS (Figura 20). Além disso, quando uma via é suprimida, a outra via pode oferecer eficácia compensatória, de forma que as vias interagem extensivamente para regular positiva e negativamente uma à outra (MENDOZA; BLENIS, 2011; JOKINEN; KOIVUNEN, 2015). Uma vez que KDY3 aumentou a expressão gênica da via PI3K/AKT/mTOR, é possível que seja uma resposta compensatória da inibição da via RAS/RAF/MEK/ERK.

Figura 20 - Esquema ilustrativo da via EGFR



Inicialmente foi avaliada apenas a via PI3K/AKT/mTOR de proliferação e sobrevivência celular, sendo importante avaliar a atuação do KDY3 na redução da expressão de outros genes que atuem em outras vias importantes, como a RAS/RAF/MEK/ERK. Essa hipótese é possível uma vez que as quinazolininas podem atingir múltiplos alvos intracelulares, característica que possibilita a ação do KDY3 em outras vias de sobrevivência celular (PENG et al., 2016).

É bem conhecido que o EGFR é superexpresso na maioria dos glioblastomas humanos e desempenha um papel crítico na formação de tumores regulando a via de sobrevivência PI3K/Akt/mTOR. Porém, a alta malignidade do GMB se deve principalmente ao seu genoma altamente mutado, que é caracterizado pela desregulação de muitas vias de sinalização importantes envolvendo crescimento, proliferação, sobrevivência e apoptose. É fundamental explorar novas estratégias diagnósticas e terapêuticas que visem estas vias para melhorar o tratamento do GMB no futuro (DAI, 2018; MAO, 2012).

O resultado do estudo da expressão gênica demonstrou que KDY3 age de modo diferente na expressão dos genes EGFR, AKT-1 e mTOR em relação à TMZ.

Isso pode ser uma vantagem de KDY3 em relação à TMZ, pois novas possibilidades de tratamento através de mecanismos de ação diferentes podem levar a diminuição da resistência do fármaco anticâncer e assim, aumentar a eficácia do tratamento.

6 CONCLUSÃO

Devido ao alto grau de malignidade e agressividade do glioblastoma multiforme e às alternativas terapêuticas ineficazes, é de extrema importância a busca por novas moléculas promissoras candidatas a fármacos anticâncer. O presente estudo demonstrou que KDY3 é uma molécula promissora visto que apresentou bons parâmetros farmacocinéticos em estudos *in silico* e nos estudos *in vitro* reduziu significativamente a viabilidade celular das linhagens U87-MG e T98G de glioblastoma e de células MCF-7 de câncer de mama. Tais resultados foram obtidos em concentrações mais baixas que TMZ e DOXO, que são fármacos de referência para o tratamento do glioblastoma e câncer de mama. Além disso, KDY3 age de modo diferente na expressão dos genes EGFR, AKT-1 e mTOR em relação à TMZ. Isso pode ser uma vantagem em relação à TMZ, pois novas possibilidades de tratamento podem levar a diminuição da resistência do fármaco anticâncer e assim, aumentar a eficácia terapêutica.

Os resultados obtidos neste estudo contribuíram para a concessão de uma patente das moléculas KDY3 e KDY23 (BR1020240191927) (Apêndice B). Portanto, esse registro evidencia a relevância científica e tecnológica deste estudo.

7 REFERÊNCIAS

- AGU, P. C. *et al.* Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management. **Sci Rep.** v. 13, n. 1, ago. 2023.
- AHMED, M. F.; KHALIFA, A. S.; EED, E. M. Synthesis of new hybrid quinazoline compounds as antiproliferative agents for breast and colon cancer treatment. **Trop J Pharm Res.** v. 21, n. 4, p. 834, abr. 2022.
- ANDRADES-LAGOS, J. *et al.* QSAR Studies, Synthesis, and Biological Evaluation of New Pyrimido-Isoquinolin-Quinone Derivatives against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Pharmaceuticals.** v. 16, n. 11, p. 1621, nov. 2023.
- ANTUNES, J. E. **Novas Quinazolinias 2,4,8-disubstituídas com Potencial Atividade de Inibição da Quinase de Adesão Focal (FAK).** 2013. 186 p. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Campinas.
- ANTUNES, J. E.; PEREIRA, M. B. M. Rational Computational Study for New Kinase Inhibitors. **Journal of Drug Design and Medicinal Chemistry.** v. 5, n. 3, p. 40-43, set. 2019.
- ARTER, C. *et al.* Structural features of the protein kinase domain and targeted binding by small-molecule inhibitors. **J Biol Chem.** v. 298, n. 8, ago. 2022.
- ATIF, F. *et al.* The Synergistic Effect of Combination Progesterone and Temozolomide on Human Glioblastoma Cells. **PLoS One.** v. 10, n. 6, jun. 2015.
- BAHJAT, H. H. *et al.* Preparation of Iron Oxide and Titania-Based Composite, Core-Shell Populated, Nanoparticulates Material by Two-Step LASER Ablation in Aqueous Media as Antimicrobial and Anticancer Agents. **Bioinorg Chem Appl.** jan. 2022.
- BAIER, A.; SZYSZKA, R. Compounds from Natural Sources as Protein Kinase Inhibitors. **Biomolecules.** v. 10, n. 11, p. 1546, nov. 2020.
- BEHL, T. *et al.* Current Perspective on the Natural Compounds and Drug Delivery Techniques in Glioblastoma Multiforme. *Cancers (Basel).* v. 13, n. 11, p. 2765, jun. 2021.
- BEN-DROR, J.; SHALAMOV, M.; SONNENBLICK, A. The History of Early Breast Cancer Treatment. **Genes.** v. 13, n. 6, p. 960, jun. 2022.
- BETH-TASDOGAN, N. H. *et al.* Interventions for managing medication-related osteonecrosis of the jaw. **Cochrane Database Syst Rev.** v. 12, n. 7, p. 7, jul. 2022.
- BOCCELLATO, C.; REHM, M. Glioblastoma, from disease understanding towards optimal cell-based in vitro models. **Cell Oncol.** v. 45, n. 4, p. 527-541, jun. 2022.

BRANNON-PEPPAS, L.; BLANCHETTE, J. O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 56, n. 11, p. 1649-1659, set. 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira 2º Edição-Revisão 02. Brasília- DF: ANVISA, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Diretrizes para a Detecção Precoce do Câncer de Mama no Brasil. Rio de Janeiro, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Inovação e do Complexo Econômico-Industrial da Saúde – SECTICS. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas de Câncer de Mama. Brasília, 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas de Tumor Cerebral no Adulto. Brasília, 2020.

BURANAAMNUAY, K. The MTT assay application to measure the viability of spermatozoa: A variety of the assay protocols. **Open Vet J**. v. 11, n. 2, p. 251-269, mai. 2021.

CARMICHAEL, N.; DAY, P. J. R. Cell Surface Transporters and Novel Drug Developments. **Front Pharmacol**. v. 13, mar. 2022.

CATANZARO, E. *et al.* Antitumor Potential of Marine and Freshwater Lectins. **Mar Drugs**. v. 18, n. 1, p. 11, dez. 2020.

CHEN, L. *et al.* Wnt10b protects cardiomyocytes against doxorubicin-induced cell death via MAPK modulation. **PLoS One**. v. 18, n. 10, out. 2023.

CONNOLLY, D. J. *et al.* Synthesis of quinazolinones and quinazolines. **Tetrahedron**. v. 61, n. 43, p. 10153-10202, oct. 2005.

CUARTAS, V. *et al.* Anticancer activity of pyrimidodiazepines based on 2-chloro-4-anilinoquinazoline: synthesis, DNA binding and molecular docking. **RSC Advances**. v. 11, n. 38, p. 23310-23329, 2021.

CUI, W. *et al.* Discovering Anti-Cancer Drugs via Computational Methods. **Front Pharmacol**. v. 11, p. 733, mai. 2020.

CZARNYWOJTEK, A. *et al.* Glioblastoma Multiforme: The Latest Diagnostics and Treatment Techniques. **Pharmacology**. v. 108, n. 5, p. 423-431, jul. 2023.

DAI, Z. *et al.* Oxymatrine induces cell cycle arrest and apoptosis and suppresses the invasion of human glioblastoma cells through the EGFR/PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and STAT3. **Oncology Reports**. v. 40, n. 2, p. 867-876, ago. 2018.

DEORE, A. B. *et al.* The Stages of Drug Discovery and Development Process. **Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development**. v. 7, n. 6, p. 62-67, dez. 2019.

DHUGURU, J.; GHONEIM, O. A. Quinazoline Based HDAC Dual Inhibitors as Potential Anti-Cancer Agents. **Molecules**. v. 27, n. 7, p. 2294, abr. 2022.

DHUNGEL, L. *et al.* Synergistic Effects of Temozolomide and Doxorubicin in the Treatment of Glioblastoma Multiforme: Enhancing Efficacy through Combination Therapy. **Molecules**. v. 29, n. 4, p. 840, jan, 2024.

DWIVEDI, A. R. *et al.* Morpholine substituted quinazoline derivatives as anticancer agents against MCF-7, A549 and SHSY-5Y cancer cell lines and mechanistic studies. **RSC Med Chem**. v. 13, n. 5, p. 599-609, mai. 2022.

EJALONIBU, M. A. *et al.* Drug Discovery for Mycobacterium tuberculosis Using Structure-Based Computer-Aided Drug Design Approach. **Int J Mol Sci**. v. 22, n. 24, dez. 2021.

FAISAL, M.; SAEED, A. Chemical Insights Into the Synthetic Chemistry of Quinazolines: Recent Advances. **Front Chem**. v. 8, p. 1, jan. 2021.

FANG, R. *et al.* EGFR/SRC/ERK-stabilized YTHDF2 promotes cholesterol dysregulation and invasive growth of glioblastoma. **Nat Commun**. v. 12, n. 1, p. 177, jan. 2021.

FANTACUZZI, M.; AGAMENNONE, M. Computational Methods in the Design of Anticancer Drugs. **Pharmaceuticals**. v. 17, n. 4, p. 404, mar. 2024.

FERNANDES, G. S. *et al.* In Silico Pharmacokinetics Studies for Quinazolines Proposed as EGFR Inhibitors. **Open Journal of Medicinal Chemistry**. v. 5, n. 4, p. 106-1115, dez. 2015.

FERREIRA, E. I. *et al.* **Fundamentos de Química Farmacêutica Medicinal**. 1 ed. Santana de Parnaíba: Manole, 2022.

FILIPPONE, A. *et al.* Protein Kinase Inhibitors as a New Target for Immune System Modulation and Brain Cancer Management. **Int J Mol Sci**. v. 23, n. 24, dez. 2022.

GAO, Z. *et al.* PDIA3P1 promotes Temozolomide resistance in glioblastoma by inhibiting C/EBP β degradation to facilitate proneural-to-mesenchymal transition. **J Exp Clin Cancer Res**. v. 41, n. 1, p. 223, jul. 2022.

GASPARINI, L. S. *et al.* In vitro Cell Viability by CellProfiler® Software as Equivalent to MTT Assay. **Pharmacogn Mag**. v. 12, n. 2, p. 365-369, jul, 2017.

HASHEM, H. E. Synthesis of Quinazoline and Quinazolinone Derivatives. **Quinazolinone and Quinazoline Derivatives**, abr. 2020.

HORNEMANN, A. *et al.* A pilot study on fingerprinting Leishmania species from the Old World using Fourier transform infrared spectroscopy. **Anal Bioanal Chem.** v. 409, n. 29, p. 6907-6923, out. 2017.

INDUMATHY, P. *et al.* A review on quinazoline containing compounds: Molecular docking and pharmacological activities. **Annals of Phytomedicine.** v. 12, n. 1, p. 220-229, jan. 2023.

INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION. ISO:10993-5: Biological evaluation of medical devices—Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. **Geneve, Switzerland**, 2009.

IRBY, R. B.; YEATMAN, T. J. Role of Src expression and activation in human cancer. **Oncogene.** v. 19, p. 5636-5642, nov. 2000.

JANSOOK, P.; OGAWA, N.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. **Int J Pharm.** v. 535, n. 1-2, p. 272-284, jan. 2018.

JOHNSON, T. O. *et al.* Modern drug discovery for inflammatory bowel disease: The role of computational methods. **World J Gastroenterol.** v. 20, n. 2, p. 310-331, jan. 2023.

JOKINEN, E.; KOIVUNEN, J. P. MEK and PI3K inhibition in solid tumors: rationale and evidence to date. **Ther Adv Med Oncol.** v. 7, n. 3, p. 170-180, mai. 2015.

JORISSEN, R. N. *et al.* Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. **Exp Cell Res.** v. 284, n. 1, p. 31-53, mar. 2003.

KADHIM, Z. A. *et al.* Oncolytic Newcastle Disease Virus Co-Delivered with Modified PLGA Nanoparticles Encapsulating Temozolomide against Glioblastoma Cells: Developing an Effective Treatment Strategy. **Molecules.** v. 27, n. 18, p. 5757, set. 2022.

KARAMI, T. K. *et al.* Eyes on Lipinski's Rule of Five: A New "Rule of Thumb" for Physicochemical Design Space of Ophthalmic Drugs. **J Ocul Pharmacol Ther.** v. 38, n. 1, p. 43-55, fev. 2022.

KHABIBOV, M. *et al.* Signaling pathways and therapeutic approaches in glioblastoma multiforme (Review). **Int J Oncol.** v. 60, n. 6, p. 69, jun. 2022.

KHADDOUR, K.; JOHANNIS, T. M.; ANSSTAS, G. The Landscape of Novel Therapeutics and Challenges in Glioblastoma Multiforme: Contemporary State and Future Directions. **Pharmaceuticals.** v. 13, n. 11, p. 389, nov. 2020.

KHERADMAND, P.; BOROOJENI, S. V.; ESMAEILI-MAHANI, S. MiR-221 Expression Level Correlates with Insulin-Induced Doxorubicin Resistance in MCF-7 Breast Cancer Cells. **Cell J.** v. 23, n. 3, p. 329-334, ago. 2021.

KOUAL, M. *et al.* Environmental chemicals, breast cancer progression and drug resistance. **Environ Health**. v. 19, n. 1, p. 117. 2020.

LI, Y. *et al.* The association between anti-tumor potency and structure-activity of protein-kinases inhibitors based on quinazoline molecular skeleton. **Bioorg Med Chem**. v. 27, n. 3, p. 568-577, fev. 2019.

LU, C. *et al.* DNA-methylation-mediated activating of lncRNA SNHG12 promotes temozolomide resistance in glioblastoma. **Mol Cancer**. v. 19, n. 1, p. 28, fev. 2020.

LUN, X. *et al.* Disulfiram when Combined with Copper Enhances the Therapeutic Effects of Temozolomide for the Treatment of Glioblastoma. **Clin Cancer Res**. v. 22, n. 15, p. 3860-3875, ago. 2016.

MAO, H. *et al.* Deregulated Signaling Pathways in Glioblastoma Multiforme: Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets. **Cancer Invest**. v. 30, n. 1, p. 48-56, jan. 2012.

MELHEM, J. M. *et al.* Updates in IDH-Wildtype Glioblastoma. **Neurotherapeutics**. v. 19, n. 6, p. 1705-1723, oct. 2022.

MENDOZA, M. C.; ER, E. E.; BLENIS, J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR Pathways: Cross-talk and Compensation. **Trends Biochem Sci**. v. 36, n. 6, p. 320-328, abr. 2011.

MIRZA, F. J. *et al.* Multitargeted Molecular Docking and Dynamic Simulation Studies of Bioactive Compounds from Rosmarinus officinalis against Alzheimer's Disease. **Molecules**. v. 27, n. 21, p. 7241. 2022.

Molinspiration Cheminformatics. Disponível em: <<https://www.molinspiration.com/>>.

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

MUTEBI, M. *et al.* Breast cancer treatment: A phased approach to implementation. **Cancer**. v. 126, n. 10, p. 2365-2378, mai. 2020.

NAKADA, M. *et al.* Aberrant signaling pathways in glioma. **Cancers (Basel)**. v. 3, n. 3, p. 3242-3278, ago. 2011.

PATRA, J. K. *et al.* Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. **J Nanobiotechnol**. v. 16, n. 1, p. 1-2, set. 2018.

PAZHOUHI, M. *et al.* Thymoquinone synergistically potentiates temozolomide cytotoxicity through the inhibition of autophagy in U87-MG cell line. **Iranian Journal Of Basic Medical Sciences**, v. 19, n. 8, p. 890-898, ago. 2016.

PENG, F. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of N-phenylquinazolin-4-amine hybrids as dual inhibitors of VEGFR-2 and HDAC. **Eur. J. Med. Chem**. v. 109, p. 1-12, fev. 2016.

PEREIRA, I. V.; FREITAS, M. P. Double focus in the modelling of anti-influenza properties of 2-iminobenzimidazolines: pharmacology and toxicology. **SAR QSAR Environ Res.** v. 32, n. 8, p. 643-654, ago. 2021.

PHAM, T. T. T.; RAINEY, J. K. On-cell nuclear magnetic resonance spectroscopy to probe cell surface interactions. **Biochem. Cell Biol.** v. 99, n. 6, p. 683-692, mai. 2021.

POON, M. T. C. *et al.* Temozolomide sensitivity of malignant glioma cell lines – a systematic review assessing consistencies between in vitro studies. **BMC Cancer.** v. 21, n. 1, p. 1240, nov. 2021.

RAJARATNAM, V. *et al.* Glioblastoma: Pathogenesis and Current Status of Chemotherapy and Other Novel Treatments. **Cancers.** v. 12, n. 4, p. 937, abr. 2020.

RAJESH, Y. *et al.* Insights into molecular therapy of glioma: current challenges and next generation blueprint. **Acta Pharmacol Sin.** v. 38, n. 5, p. 591-613, mar. 2017.

RAMALHO, M. J. *et al.* Biophysical interaction of temozolomide and its active metabolite with biomembrane models: The relevance of drug-membrane interaction for Glioblastoma Multiforme therapy. **Eur J Pharm Biopharm.** v. 136, p. 156-163, mar. 2019.

RAMAZI, S. *et al.* Synergistic cytotoxic effects of an extremely low-frequency electromagnetic field with doxorubicin on MCF-7 cell line. **Sci Rep.** v. 13, n. 1, p. 8844, mai. 2023.

RAMOHLOLA, *et al.* Instrumental Techniques for Characterization of Molybdenum Disulphide Nanostructures. **J Anal Methods Chem.** dez. 2020.

ROSKOSKI, R. Rule of five violations among the FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors. **Pharmacological Research.** v. 191, mai. 2023.

SA, T. S. Uso da Bioinformática para selecionar moléculas candidatas a fármacos. 2022. 83 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Instituto Ciências da Vida, Universidade Federal de Juiz de Fora – Campus Governador Valadares, 2022.

SIGISMUND, S.; AVANZATO, D.; LANZETTI, L. Emerging functions of the EGFR in cancer. **Mol Oncol.** v. 12, n. 1, p. 3-20, jan. 2018.

SIKAND, K. *et al.* Housekeeping Gene Selection Advisory: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) and β -Actin Are Targets of miR-644a. **PLoS One.** v. 7, n. 10, out. 2012.

SINGH, A. S.; VELLAPANDIAN, C. In silico and pharmacokinetic assessment of echinocystic acid effectiveness in Alzheimer's disease like pathology. **Future Sci OA.** v. 10, n. 1, mai. 2024.

SINGH, N. *et al.* Inflammation and Cancer. **Ann Afr Med.** v. 18, n. 3, p. 121-126, jul/set. 2019.

SMOLARSKA, A. *et al.* Targeted therapies for glioblastoma treatment. **J Physiol Pharmacol.** v. 74, n. 3, jun. 2023.

SOUSA, S. M. R. *et al.* Síntese de novos 1,2,3-triazóis inspirados no SRPIN340 e avaliação de seus efeitos em linhagem celular de glioblastoma humano. **Quim. Nova.** v. 44, n. 10, p. 1268-1279. 2021.

SOUZA, I. *et al.* High levels of NRF2 sensitize temozolomide-resistant glioblastoma cells to ferroptosis via ABCC1/MRP1 upregulation. **Cell Death Dis.** v. 13, n. 7, p. 591, jul. 2022.

STOCKERT, J. C. *et al.* Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. **Acta Histochemica.** v. 120, n. 3, p. 159-167, abr. 2018.

SUN, M. *et al.* Design and synthesis of a novel class EGFR/HER2 dual inhibitors containing tricyclic oxazine fused quinazolines scaffold. **Bioorg Med Chem Lett.** v. 30, n. 9, mai. 2020.

SWARBRICK, J. **Encyclopedia of pharmaceutical technology.** 3 ed. New York: Informa Healthcare, 2007.

TAN, A. C. *et al.* Management of glioblastoma: State of the art and future directions. **CA Cancer J Clin.** v. 70, n. 4, p. 299-312, jul/ago, 2020.

TANG, X. *et al.* Targeting Glioblastoma Stem Cells: A Review on Biomarkers, Signal Pathways and Targeted Therapy. **Front Oncol.** v. 11, jul. 2021.

TAO, Q. *et al.* The efficacy and safety of low-dose temozolomide maintenance therapy in elderly patients with glioblastoma: a retrospective cohort study. ed. **Ann Palliat Med.** v. 11, n. 11, p. 3513-3519, nov. 2022.

TOBE, M. *et al.* Discovery of quinazolines as a novel structural class of potent inhibitors of NF- κ B activation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry.** v. 11, n. 3, p. 383-391, fev. 2003.

TOUAT, M. *et al.* Glioblastoma targeted therapy: updated approaches from recent biological insights. **Ann Oncol.** v. 28, n. 7, p. 1457-1472, jul. 2017.

TRAYES, K. P.; COKENAKES, S. E. H. Breast Cancer Treatment. **Am Fam Physician.** v. 104, n. 2, p. 171-178, ago. 2021.

TRESCH, N. S. *et al.* Temozolomide is additive with cytotoxic effect of irradiation in canine glioma cell lines. **Vet Med Sci.** v. 7, n. 6, p. 2124-2134, set. 2021.

UDREA, A. M. *et al.* Quinazoline Derivatives Designed as Efflux Pump Inhibitors: Molecular Modeling and Spectroscopic Studies. **Molecules**. v. 26, n. 8, p. 2374, abr. 2021.

VERMANI, L.; KUMAR, R.; KUMAR, N. S. GAPDH and PUM1: Optimal Housekeeping Genes for Quantitative Polymerase Chain Reaction-Based Analysis of Cancer Stem Cells and Epithelial-Mesenchymal Transition Gene Expression in Rectal Tumors. **Cureus**. v. 12, n. 12, dez. 2020.

WDOWIAK, P. *et al.* Quinazoline Derivatives as Potential Therapeutic Agents in Urinary Bladder Cancer Therapy. **Front Chem**. v. 9, p. 1, nov. 2021.

WILKINSON, L.; GATHANI, T. Understanding breast cancer as a global health concern. **Br J Radiol**. v. 95, fev. 2022.

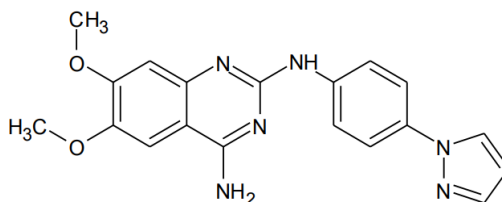
XING, Y. *et al.* Raddeanin A promotes autophagy-induced apoptosis by inactivating PI3K/AKT/mTOR pathway in lung adenocarcinoma cells. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. v. 396, p. 1987-1997, mar. 2023.

XU, H. *et al.* Epidermal growth factor receptor in glioblastoma. **Oncol Lett**. v. 14, n. 1, p. 512-516, jul. 2017.

YANG, E. *et al.* PTRF/Cavin-1 enhances chemo-resistance and promotes temozolomide efflux through extracellular vesicles in glioblastoma. **Theranostics**. v. 12, n. 9, p. 4330-4347, mai. 2022.

ZHANG, Y. *et al.* Review of Breast Cancer Pathological Image Processing. **Biomed Res Int**. set. 2021.

APÊNDICE A – KDY3 e testes *in silico*



6,7-dimethoxy-*N*³-[4-(1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl]naphthalene-1,3-diamine

Cálculo das propriedades moleculares	Cálculos das pontuações de bioatividade	Distribuição e Probabilidade de atravessar BHE			
Molinspiration property engine v2022.08	Molinspiration bioactivity score v2022.08	Propriedade	Valores previstos	Probabilidade	Sugestões
milogP 2.80	GPCR ligand 0.11				
IPSA 100.13	Ion channel modulator -0.21				
natoms 27	Kinase inhibitor 0.60	PPB (Ligação às Proteínas Plasmáticas)	88.05 %		90%
MW 362.39	Nuclear receptor ligand -0.85				
nON 8	Protease inhibitor -0.21	VD (Distribuição de Volume)	-0.013 L/kg		0.04-20 L/kg
nOHNH 3	Enzyme inhibitor 0.12				
nviolations 0	Score:				
nrotb 5	BBB = 0,51 x 3 = 1,53				
volume 318.53	Inibidor de <u>Quinase</u> = 0,60 x 2 = 1,2				
	Inibidor de Enzima = 0,12 x 1 = 0,12				
	TOTAL= 2,85				
	Referência: Score > 2,5	BBB (Barreira Hematoencefálica)	+	0.51	

APÊNDICE B – Patente das moléculas KDY3 e KDY23



18/09/2024 09:56 870240079645
29409162321958100

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2024 019192 7

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA - UFJF

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 21195755000169

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: José Lourenço Kelmer, s/n, São Pedro

Cidade: Juiz de Fora

Estado: MG

CEP: 36036900

País: Brasil

Telefone: (032)21023435

Depositante 2 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCUR

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 16888315000157

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Pessoa Jurídica

Endereço: Rodovia MGT 367, Km 583 - nº 5000 - Alto da Jacuba - Diamantina, MG

Cidade: Diamantina

Estado: MG

CEP: 39100-000

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): DERIVADOS DE 2-ANILINOQUINAZOLINA PARA PREPARAÇÃO DE FÁRMACO PARA TRATAMENTO DE GLIOBLASTOMA E CÂNCER DE MAMA

Resumo: Esta invenção refere-se ao produto da síntese de derivados 2-anilinoquinazolinas cuja denominação IUPAC é 6,7-dimethoxy-N3-[4-(1H-pyrazol-1-yl)phenyl]naphthalene-1,3-diamine com efeito antitumoral para tratar de câncer cerebral do tipo glioblastoma e também de câncer de mama. Também se refere ao produto da síntese de derivados 2-anilinoquinazolinas cuja denominação IUPAC é 6,7 dimethoxy-2-(4-benzyloxyanilino)-4-quinazolamine para tratar de câncer cerebral do tipo glioblastoma e também de câncer de mama. Os produtos derivados da síntese de derivados 2-anilinoquinazolinas foram selecionados após estudos computacionais considerando parâmetros farmacocinéticos satisfatórios. Os produtos sintéticos apresentaram, além de efeito citotóxico em linhagens tumorais, efeitos diferentes nas vias de proliferação e sobrevivência celular daquele demonstrado pelos fármacos de referência para o tratamento desses tipos de câncer. Portanto, os produtos sintéticos requeridos nesta invenção apresentam mecanismos de ação diferentes do fármaco de referência, acarretando em novo tratamento para câncer cerebral do tipo Glioblastoma e o câncer de mama. Os tratamentos farmacológicos para câncer cerebral do tipo glioblastoma são normalmente ineficazes o que diminui a sobrevida dos pacientes, assim novas possibilidades de tratamentos farmacológicos são extremamente necessários.

Figura a publicar: 1