

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

GUILHERME ÁLVARO FERREIRA DA SILVA

**MECANISMOS ASSOCIADOS À ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE
DERIVADOS *N*-ACILIDRAZÔNICOS SOBRE LINHAGENS DERIVADAS
DE CARCINOMA HEPATOCELULAR**

Alfenas/MG

2021

GUILHERME ÁLVARO FERREIRA DA SILVA

MECANISMOS ASSOCIADOS À ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE
DERIVADOS *N*-ACILIDRAZÔNICOS SOBRE LINHAGENS DERIVADAS DE
CARCINOMA HEPATOCELULAR

Tese apresentada como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Doutor em Biociências Aplicadas à Saúde
pela Universidade Federal de Alfenas.
Área de concentração: Fisiopatologia

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Marisa Ionta.
Coorientador: Prof. Dr. Angel Mauricio
Castro Gamero.

Alfenas/MG

2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Sede

Silva, Guilherme Álvaro Ferreira da
S584m Mecanismos associados à atividade antiproliferativa de derivados
n-acilidrazônicos sobre linhagens derivadas de carcinoma hepatocelular. /
Guilherme Álvaro Ferreira da Silva. – Alfenas, MG, 2021.
103f.: il. –

Orientadora: Marisa Ionta.
Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas à Saúde) – Universidade
Federal de Alfenas, 2021.
Bibliografia.

1. Carcinoma hepatocelular. 2. Inibidores histonas desacetilases. 3. Apoptose.
4. Senescência. 5. Catástrofe mitótica. I. Ionta, Marisa. II. Título.

CDD- 610

Guilherme Álvaro Ferreira da Silva

MECANISMOS ASSOCIADOS À ATIVIDADE
ANTIPROLIFERATIVA DE DERIVADOS N-ACILIDRAZÔNICOS SOBRE LINHAGENS
DERIVADAS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR

A Banca examinadora abaixo-assinada, aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Fisiopatologia.

Aprovada em: 08 de outubro de 2021

Prof^ª. Dr^ª. Marisa Ionta
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Dias Fernandes
Instituição: Universidade Federal do Rio de Janeiro
UFRJ

Prof^ª. Dr^ª. Juliana Lott de Carvalho
Instituição: Universidade de Brasília
UNB

Prof^ª. Dr^ª. Thaysa Paschoalin
Instituição: Universidade Federal de São Paulo
UNIFESP

Prof^ª. Dr^ª. Pollyanna Francieli de Oliveira
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Marisa Ionta, Professor do Magistério Superior**, em 13/10/2021, às 10:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Pollyanna Francielli de Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 13/10/2021, às 14:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Lott de Carvalho, Usuário Externo**, em 13/10/2021, às 19:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thaysa Paschoalin, Usuário Externo**, em 14/10/2021, às 09:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Patricia Dias Fernandes, Usuário Externo**, em 14/10/2021, às 08:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0599014** e o código CRC **63BBE998**.

Dedico esta tese:

*À **Hello**, meu porto seguro;*

*E ao **Bernardo**, meu farol.*

*Agradeço especialmente à professora **Marisa Ionta**. Minha querida orientadora e exemplo de dedicação, profissionalismo, perseverança e humildade. Obrigado por sempre me mostrar o caminho.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais, **Anélio** e **Sandra**, e irmãos, **Gustavo** e **Maria**, pela admiração e por sempre acreditarem em mim.

A toda a minha família, que sempre torceu pelas minhas conquistas.

Aos meus queridos sogros, **Paulo** e **Lázara**, que sempre estiveram presentes.

Aos queridos **Renato**, **Camila** e **Guiomar**, minha família de Alfenas.

Aos amigos do laboratório de cultura celular, **Carolina Giroto**, **Amanda Negretti**, **Antônio Fregnan**, **Rafael Fonseca** e **Amanda Andrade** pelas conversas, conselhos, choros e risadas. Tornaram meus dias melhores.

A todos os outros amigos do **LABAInt** e professores do departamento.

À **Adriana**, secretária do PPGB, um anjo em minha vida.

Ao Prof. Dr. **Carlos Alberto Mansour Fraga** e Dr. **Daniel Alencar Rodrigues**, por terem sintetizado e confiado os seus derivados *N*-acilidrazônicos à minha experimentação.

À Dr^a. **Marta Miyazawa**, pelos ensinamentos e por prontamente nos ter ajudado com a execução do ensaio de ferida.

À Prof^a. Dr^a. **Ester Siqueira Caixeta Nogueira**, por nos ter ajudado com a execução e análises de qPCR.

Ao Prof. Dr. **Angel Mauricio Castro Gamero**, pelos conselhos.

Às Prof^{as}. Dr^{as}. **Patrícia Dias Fernandes**, **Juliana Lott de Carvalho**, **Thaysa Paschoalin** e **Pollyanna Francielli de Oliveira**, por prontamente terem aceitado participar da banca de conclusão deste trabalho.

À **UNIFAL/MG**, minha segunda morada.

A **Deus**, por ter permitido que eu aprendesse tanto e por ter colocado pessoas excepcionais em meu caminho.

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

*Ninguém ignora tudo,
Ninguém sabe tudo,
Todos nós sabemos alguma coisa,
Todos nós ignoramos alguma coisa,
Por isso aprendemos sempre.*

(Paulo Freire, 1989)

RESUMO

O câncer de fígado constitui a segunda principal causa de morte por câncer entre homens, sendo que o carcinoma hepatocelular (CHC) é o câncer primário de fígado mais comumente diagnosticado. Apesar da introdução de novas modalidades terapêuticas para o CHC em estágio avançado (terapias alvo-dirigidas e imunoterapia), as taxas de mortalidade continuam altas. A ineficácia do tratamento, em geral, está associada à resistência primária ou adquirida das células tumorais aos fármacos disponíveis. Dessa forma, é relevante identificar novos agentes com atividade antitumoral para ampliar o arsenal terapêutico para o CHC. Estudos mostram que inibidores seletivos de histonas desacetilases (HDACs) podem ser úteis como agentes antineoplásicos. Em um estudo prévio, derivados *N*-acilidrazônicos foram obtidos (**LASSBio-1909, 1911, 1935 e 1936**) com a proposta de atuarem como inibidores seletivos para as HDACs 6/8. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial antiproliferativo dessas substâncias sobre linhagens derivadas de CHC e investigar os possíveis mecanismos de ação da substância mais ativa. Os resultados mostraram que os derivados NAH (**LASSBio-1911 e 1935**, principalmente) efetivamente inibiram a proliferação e induziram morte celular nas linhagens HepG2 e Hep3B. Além disso, as substâncias foram seletivas para as células tumorais em relação às células normais. **LASSBio-1911** induziu bloqueio do ciclo celular na transição G2/M, o qual foi associado à sua capacidade de causar lesões no DNA e ativar o checkpoint G2/M. Foi observado aumento nos níveis de expressão de *CDKN1A* (p21) e ativação sustentada de ERK em culturas de HepG2 e Hep3B tratadas com **LASSBio-1911**. A substância **LASSBio-1911** induziu apoptose nas linhagens de CHC, sendo que essa atividade foi mais efetiva na linhagem HepG2 em relação a Hep3B. A atividade pró-apoptótica foi correlacionada com aumento na razão Bax/Bcl-2. Além disso, **LASSBio-1911** inibiu a capacidade de migração e induziu senescência na linhagem Hep3B. Os dados apresentados no presente estudo mostram que **LASSBio-1911** tem promissora atividade antitumoral contra o CHC. Os efeitos dessa substância sobre o comportamento proliferativo e migratório das linhagens testadas foram correlacionados com a inibição de HDAC6, uma vez que houve aumento significativo na expressão de alfa-tubulina acetilada, um importante alvo de HDAC6. Assim, nós demonstramos que a inibição de HDAC6 em células de CHC representa uma estratégia promissora para o tratamento do CHC.

Palavras-chave: Carcinoma hepatocelular; Inibidores histonas desacetilases; Apoptose; Senescência; Catástrofe mitótica.

ABSTRACT

Liver cancer is the second leading cause of cancer death among men, with hepatocellular carcinoma (HCC) being the most commonly diagnosed primary liver cancer. Regardless of the introduction of new therapeutic modalities for HCC advanced-stage (target-directed therapies and immunotherapy), mortality rates remain high. The ineffectiveness of the treatment is generally associated with primary or acquired resistance of tumor cells to available drugs. Therefore, it is relevant to identify new drugs with antitumor activity to improve the therapeutic arsenal for HCC. It is known that selective inhibitors of histone deacetylases (HDACs) can be useful as antineoplastic agents. In a previous study, N-acylhydrazonic derivatives were obtained (**LASSBio-1909**, **1911**, **1935** and **1936**) with the proposal of acting as selective inhibitors for HDACs 6/8. In this way, the aim of the present study was to evaluate the anti-proliferative potential of these substances on HCC-derived cell lines and to investigate the mechanisms of action of the most active compound. The results showed that NAH derivatives (mainly **LASSBio-1911** and **1935**) effectively inhibited the proliferation and induced cell death in the HepG2 and Hep3B cell lines. Furthermore, the substances were selective for tumor cells when compared to normal cells. **LASSBio-1911** induced cell cycle arrest at the G2/M transition which was associated with its ability to cause DNA damage and activate the G2/M checkpoint. Increased levels of expression of *CDKN1A* (p21) and sustained activation of ERK were observed in cultures of HepG2 and Hep3B treated with **LASSBio-1911**. The substance **LASSBio-1911** induced apoptosis in HCC cell lines, and this activity was more expressive on HepG2 when compared to Hep3B. The pro-apoptotic activity was correlated with an increase in the Bax/Bcl-2 ratio in both cell lines. Moreover, **LASSBio-1911** inhibited the migration capacity and induced senescence in Hep3B. The data here presented show that **LASSBio-1911** has promising antitumor activity against HCC. The effects of this substance on the proliferative and migratory behavior of the HepG2 and Hep3B cell lines were correlated with the inhibition of HDAC6, since there was a significant increase in the expression of acetylated alpha-tubulin, an important target of HDAC6. Therefore, we demonstrate that inhibition of HDAC6 is a promising strategy for HCC treatment.

Keywords: Hepatocellular carcinoma; Histone deacetylase inhibitors; Apoptosis; Senescence; Antiproliferative activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Derivados <i>N</i> -acilidrazônicos como potentes inibidores da HDAC6. ...	21
Figura 2 - Mecanismo proposto para a catálise de grupos acetila por enzimas HAT/HDAC.....	27
Figura 3 - Esquema genérico para síntese da classe de derivados <i>N</i> -acilidrazônicos.	31
Figura 4 - Estruturas dos derivados NAH (LASSBio-1909, 1911, 1935 e 1936) propostos por Rodrigues <i>et al.</i> (2016).	36
Figura 5 - Viabilidade celular, determinada por MTS, em culturas de HepG2, Hep3B, FB1 e FPM tratadas com os derivados NAH.	44
Figura 6 - Populações de células viáveis em culturas de HepG2 e Hep3B, determinadas por meio do ensaio de exclusão com azul de Trypan.	46
Figura 7 - Aspecto morfológico das culturas de HepG2 e Hep3B tratadas com LASSBio-1911 e 1935	48
Figura 8 - Ensaio de incorporação de BrdU em linhagens derivadas de CHC tratadas com LASSBio-1911 e 1935	49
Figura 9 - Padrão de marcação para BrdU em culturas de Hep3B após tratamento com LASSBio-1911 e 1935	50
Figura 10 - Análises de ciclo celular em culturas de HepG2 e Hep3B tratadas com LASSBio-1911	52
Figura 11 - Análises de ciclo celular em culturas de HepG2 e Hep3B tratadas com LASSBio-1935	53
Figura 12 - Análises de ciclo celular em culturas de HepG2 e Hep3B tratadas com LASSBio-1911, 1935 e TSA	54
Figura 13 - Análise do perfil de fosforilação de H3 (ser10) em culturas de HepG2 e Hep3B após tratamento com LASSBio-1911	55
Figura 14 - Análise da abundância de RNAm de <i>CCNB1</i> em culturas de HepG2 e Hep3B após tratamento com LASSBio-1911	57
Figura 15 - Análise dos níveis de ciclina B1 em culturas de HepG2 e Hep3B após tratamento com LASSBio-1911	58
Figura 16 - Análise da abundância de RNAm de <i>CDK1</i> em culturas de HepG2 e Hep3B após tratamento com LASSBio-1911	59

Figura 17 - Análise da abundância de RNAm de <i>CDKN1A</i> em culturas de HepG2 e Hep3B após tratamento com LASSBio-1911	60
Figura 18 - Análise da abundância de RNAm de <i>WEE1</i> e <i>CDC25</i> em culturas de HepG2 e Hep3B após tratamento com LASSBio-1911	61
Figura 19 - Análise da abundância de RNAm de <i>PLK1</i> , <i>AURKA</i> e <i>AURKB</i> em culturas de HepG2 e Hep3B após tratamento com LASSBio-1911	61
Figura 20 - Análise dos níveis de fosforilação de ERK em culturas de HepG2 e Hep3B após tratamento com LASSBio-1911	63
Figura 21 - Populações de células inviáveis em culturas de HepG2 e Hep3B, determinadas por meio do ensaio de exclusão com azul de Trypan.....	64
Figura 22 - Imagens obtidas por microscopia confocal evidenciando células em catástrofe mitótica e apoptose em culturas de HepG2 após tratamento com LASSBio-1911	65
Figura 23 - Potencial pró-apoptótico de LASSBio-1911 e 1935 em culturas de HepG2.....	67
Figura 24 - Potencial pró-apoptótico de LASSBio-1911 em culturas de Hep3B. ..	68
Figura 25 - Ensaio de detecção de β -Galactosidase associada à senescência em culturas de Hep3B tratadas com LASSBio-1911 e 1935	69
Figura 26 - Ensaio de COMETA em culturas de HepG2 e Hep3B após tratamento com LASSBio-1911 e 1935	70
Figura 27 - Imagens fluorescentes evidenciando o perfil de análise dos nucleóides em culturas de Hep3B após tratamento com LASSBio-1911 e 1935 . .	71
Figura 28 - Análise do perfil de acetilação da α -Tubulina (lis40) em culturas de HepG2 e Hep3B após tratamento com LASSBio-1911 e 1935	72
Figura 29 - Análise do perfil de acetilação da α -Tubulina (lis40) em culturas de Hep3B após tratamento com LASSBio-1911	73
Figura 30 - Ensaio clonogênico em culturas de Hep3B após tratamento com LASSBio-1911	74
Figura 31 - Análise da abundância de RNAm de <i>HDAC6</i> e <i>HDAC8</i> em culturas de HepG2 e Hep3B após tratamento com LASSBio-1911	75
Figura 32 - Ensaio de fechamento da ferida em culturas de Hep3B após tratamento com LASSBio-1911	76

Figura 33 - Imagens obtidas por microscopia confocal evidenciando os elementos do citoesqueleto em células Hep3B tratadas por 48 horas com LASSBio-1911	77
Figura 34 - Imagens obtidas por microscopia confocal evidenciando os microtúbulos e microfilamentos em culturas de Hep3B tratadas por 48 horas com LASSBio-1911	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Inibidores de histonas desacetilases (HDACi) aprovados pela FDA para uso clínico no tratamento de câncer.....	29
Tabela 2 - Valores de IC ₅₀ (nM) determinados a partir de ensaios enzimáticos in vitro para avaliar o potencial dos derivados NAH em inibir a atividade de HDACs humanas.	31
Tabela 3 - Relação de anticorpos primários e especificações.....	39
Tabela 4 - Sequência de bases dos primers utilizados na qPCR.....	40
Tabela 5 - Valores de IC ₅₀ (μM), determinados a partir dos ensaios de MTS, após tratamento com os derivados NAH.	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitros
μM	Micromolar
AKT	<i>Protein kinase B</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	<i>Ataxia-telangiectasia mutated kinase</i>
ATR	<i>ATM and Rad3 related kinase</i>
<i>AURKA</i>	Gene que codifica para Aurora A
<i>AURKB</i>	Gene que codifica para Aurora B
Bad	Membro pró-apoptótico da família Bcl-2 (<i>Bcl-2-associated death promoter</i>)
Bak	Membro pró-apoptótico da família Bcl-2 (<i>Bcl-2 homologous antagonist/Killer</i>)
Bax	Membro pró-apoptótico da família Bcl-2 (<i>Bcl-2-associated X protein</i>)
BCA	Ácido bicinconínico (<i>Bicinchoninic acid</i>)
Bcl-2	Membro anti-apoptótico da família Bcl-2 (<i>B-cell lymphoma 2</i>)
Bcl-xL	Membro anti-apoptótico da família Bcl-2 (<i>B-cell lymphoma-extra large</i>)
Bid	Membro pró-apoptótico da família Bcl-2 (<i>BH3-interacting domain agonist</i>)
<i>CCND1</i>	Gene que codifica para ciclina D1
<i>CDC25</i>	Gene que codifica para CDC25
<i>CDKN1A</i>	Gene que codifica para p21
CDK	Cinase dependente de ciclina (<i>cyclin-dependent kinase</i>)
CDK1/2	Cinase dependente de ciclina 1/2 (<i>cyclin-dependent kinase 1/2</i>)
CKI	Inibidor de CDK (<i>cyclin-dependent kinase inhibitor</i>)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenil-indol
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DP	Desvio padrão
DXR	Doxorrubicina (<i>Doxorubicin</i>)

E2F-1	Membro da família E2F de fatores de transcrição (<i>E2 promoter binding factor 1</i>)
ECL	<i>Enhanced chemiluminescent reagent</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EGF	Fator de crescimento epidermal (<i>Epidermal growth factor</i>)
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal (<i>Epidermal growth factor receptor</i>)
ERK1/2	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinases 1/2</i>
FAS-R	Receptor de superfície envolvido na ativação da apoptose (<i>Fas cell surface death receptor</i>)
FBS	Soro Bovino Fetal (<i>Fetal bovine serum</i>)
FDA	Agência Federal de regulamentação dos EUA (<i>Food and Drug Administration</i>)
FITC	Isocianato de fluoresceína (<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>)
HAT	<i>Histone acyltransferase</i>
HDAC	<i>Histone deacetylase</i>
<i>HDAC6</i>	Gene que codifica para Histona desacetilase 6
<i>HDAC8</i>	Gene que codifica para Histona desacetilase 8
IC ₅₀	Concentração inibitória média
IgG	Imunoglobulina G
K-RAS	GTPase monomérica (<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue</i>)
M	Molar
mA	Miliampère
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEK	<i>mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase</i>
m-TOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MTS	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2-tetrazólio)
NAD ⁺	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NAH	<i>N-acilidrazona</i>
p21	Proteína 21 KDa
p53	Proteína 53 KDa
PBSA	Phosphate-buffered saline without sodium and magnesium
PI	Iodeto de propídeo (<i>Propidium Iodide</i>)

PI3K	<i>Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase</i>
pRb	Proteína Retinoblastoma
PVDF	Fluoreto de polivinilideno (<i>polyvinylidene flouride</i>)
<i>PLK1</i>	Gene que codifica para Polo Like -1
Raf	<i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma serine/threonine protein kinase</i>
RIPA	Tampão de lise (<i>Radio-Immunoprecipitation Assay</i>)
RNase	Ribonuclease
Rpm	Rotações por minuto
RTK	Receptor tirosino-cinase
SDS	Dodecil sulfato de sódio (<i>Sodium dodecyl sulfat</i> e)
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TCT	Tomografia computadorizada de tórax
TGF- α	Fator de crescimento tumoral (<i>tumor growth fator-alpha</i>)
TNF	Fator de necrose tumoral (<i>tumor necrosis factor</i>)
<i>TP53</i>	gene que codifica para p53
TSA	Tricostatina A
TTBS	<i>Tris-Buffered Saline with Tween</i>
UV	Ultravioleta
V/cm ²	Volts por centímetro quadrado
<i>WEE1</i>	Gene que codifica para Wee1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1	O CARCINOMA HEPATOCELULAR	22
2.2	A INIBIÇÃO DE HISTONAS DESACETILASES COMO ALVOS PROMISSORES PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER	27
3	OBJETIVOS	34
3.1	OBJETIVO GERAL.....	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	LINHAGEM CELULAR E CONDIÇÕES DE CULTIVO	35
4.2	OBTENÇÃO DOS DERIVADOS NAH	35
4.3	VIABILIDADE CELULAR.....	36
4.3.1	Ensaio colorimétrico baseado na conversão do sal tetrazólio em formazano (MTS)	36
4.3.2	Ensaio de exclusão com azul de Trypan	36
4.4	ENSAIO DE CAPACIDADE CLONOGÊNICA	37
4.5	ANÁLISE DE INCORPORAÇÃO DE BRDU.....	37
4.6	ANÁLISE DO CICLO CELULAR.....	38
4.7	<i>IMMUNOBLOT</i>	38
4.8	qPCR	39
4.9	ANÁLISE DO CITOESQUELETO.....	41
4.10	ENSAIO DE FECHAMENTO DE FERIDA.....	42
4.11	ENSAIO DE ANEXINA V/7-AAD.....	42
4.12	ENSAIO DE COMETA	42
4.13	ENSAIO DE DETECÇÃO DE β -GALACTOSIDASE ASSOCIADA À SENESCÊNCIA (SA- β -GAL)	43
4.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
5	RESULTADOS.....	44
5.1	OS DERIVADOS NAH REDUZIRAM A PROLIFERAÇÃO DE LINHAGENS DERIVADAS DE CHC	44

5.2	O TRATAMENTO COM LASSBIO-1911 AFETOU A EXPRESSÃO E ATIVAÇÃO DE REGULADORES CRÍTICOS DA FASE G2/M EM LINHAGENS DERIVADAS DE CHC	56
5.3	O TRATAMENTO COM LASSBIO-1911 ALTEROU OS NÍVEIS DE ATIVAÇÃO DE ERK1/2 EM LINHAGENS DERIVADAS DE CHC ...	62
5.4	O TRATAMENTO COM LASSBIO-1911 INDUZIU APOPTOSE EM LINHAGENS DERIVADAS DE CHC	63
5.5	O TRATAMENTO COM LASSBIO-1911 AFETOU O PERFIL DE ACETILAÇÃO DA α -TUBULINA EM LINHAGENS DERIVADAS DE CHC	72
5.6	O TRATAMENTO COM LASSBIO-1911 INIBIU A MIGRAÇÃO E ALTEROU A DINÂMICA DE POLIMERIZAÇÃO DE MICROTÚBULOS EM CÉLULAS HEP3B	75
6	DISCUSSÃO	79
7	CONCLUSÃO	90
	REFERÊNCIAS	91

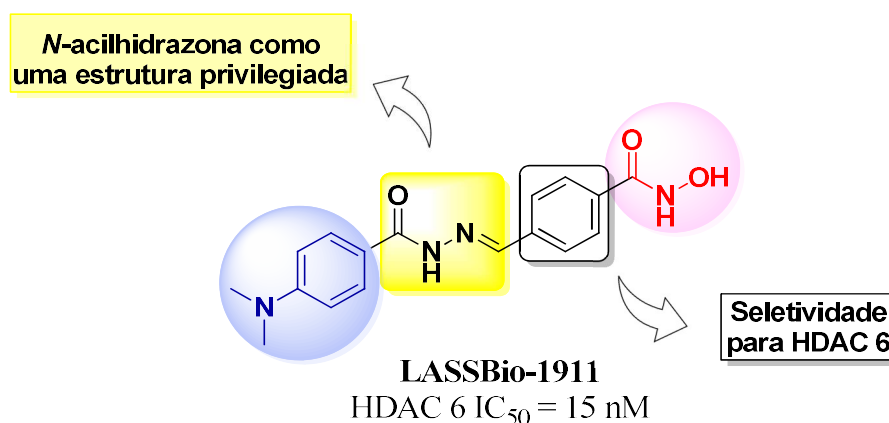
1 INTRODUÇÃO

O estabelecimento do câncer é multifatorial e complexo. A origem da doença envolve alterações genéticas e epigenéticas que culminam com a inativação ou perda de função de genes supressores de tumor e/ou ativação de oncogenes. A transformação maligna promove a desregulação de vias que controlam a proliferação, sobrevivência e morte celular. Subsequentemente, o acúmulo de mutações confere às células transformadas a capacidade de invasão e metástase. A associação das células tumorais às células do estroma favorece o estabelecimento de um microambiente, o que dá suporte à evolução tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O câncer de fígado constitui a segunda principal causa de morte por câncer entre homens. O CHC é o tipo mais comum dos cânceres primários que acometem o fígado. Além disso, o CHC apresenta-se como o mais agressivo e com elevada heterogeneidade intratumoral. Estes aspectos dificultam o estabelecimento de abordagens terapêuticas mais direcionadas para cada tipo histológico (CALDERARO *et al.*, 2019; CRAIG *et al.*, 2019; FORNER; REIG; BRUIX, 2018; LLOVET *et al.*, 2016; VILLANUEVA, 2019).

A tricostatina A (TSA) é um produto natural que demonstrou potente inibição de múltiplas isoformas de histona desacetilases (HDACs). A estrutura molecular e a interação com o sítio ativo das HDACs foram eficientemente caracterizadas o que contribuiu para que o TSA servisse de protótipo para a síntese de potentes inibidores de HDACs (BEIJANSKI, 2009; RODRIGUEZ *et al.*, 2006; SOMOZA *et al.*, 2004; TSUJI *et al.*, 1976; YOSHIDA *et al.*, 1987).

Rodrigues *et al.* (2016) sintetizaram uma série de derivados *N*-acilidrazônicos (NAH), projetados com base na estrutura da TSA. As principais modificações estruturais envolveram a substituição da dupla conjugada ao grupo farmacofórico (ácido hidroxâmico) por um anel aromático e a exploração da subunidade NAH (Figura 1). As substâncias sintetizadas foram testadas quanto ao seu potencial em inibir *in vitro* a atividade enzimática das HDACs 1, 2, 6 e 8, as quais são preferencialmente expressas em humanos. Os resultados mostraram que os derivados NAH obtidos inibem preferencialmente as HDACs 6/8. Além disso, foi demonstrado que algumas substâncias são efetivas em inibir a proliferação de células da linhagem HepG2, a qual é derivada de carcinoma hepatocelular.

Figura 1 - Derivados *N*-acilhidrazônicos como potentes inibidores da HDAC6.

Fonte: Adaptado de RODRIGUES *et al.* (2016).

No presente estudo nós avaliamos o potencial antitumoral dos derivados NAH, principalmente **LASSBio-1911**, frente as linhagens HepG2 e Hep3B. Os nossos resultados demonstraram que **LASSBio-1911** é um potente inibidor de HDAC6 com impacto sobre a proliferação e indução de morte celular em culturas derivadas de CHC. Além disso, nós demonstramos que as modificações estruturais foram eficientes e melhoraram o perfil de seletividade do protótipo de partida TSA, uma vez que **LASSBio-1911** e **1935** apresentaram baixa citotoxicidade para células normais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O CARCINOMA HEPATOCELULAR

De acordo com as estimativas recentes feitas pelo GLOBOCAN e publicadas pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, mais de 19 milhões de pessoas foram diagnosticadas com câncer em 2020 e o número de óbitos chegou a quase 10 milhões. O câncer primário de fígado foi o sexto tipo de câncer mais diagnosticado e a terceira principal causa de morte por câncer, com mais de 900 mil novos casos e 830 mil mortes em todo o mundo. O câncer de fígado também foi mais prevalente entre homens do que entre mulheres sendo considerado o quarto mais incidente e o segundo tipo de câncer com maior mortalidade entre os homens (SUNG, *et al.* 2021).

Os cânceres que acometem o fígado podem ser primários com origem no próprio órgão ou secundários, provenientes de metástases originadas no intestino ou reto, principalmente. Os cânceres primários são classificados em (1) CHC com origem nos hepatócitos; (2) colangiocarcinoma, originário nas vias biliares; (3) hepatoblastoma, câncer raro que atinge recém-nascidos e crianças nos primeiros anos de vida e (4) angiossarcoma, câncer raro que se origina nos vasos sanguíneos do fígado (CALDERARO *et al.*, 2019; CRAIG *et al.*, 2019; FORNER; REIG; BRUIX, 2018; LLOVET *et al.*, 2016; VILLANUEVA, 2019).

O CHC é o tipo mais comum, diagnosticado em 85-90% dos casos de cânceres primários de fígado e constitui o tipo histológico mais agressivo. Os fatores de risco para o desenvolvimento da doença são bem estabelecidos e incluem as infecções crônicas ocasionadas pelos vírus das hepatites B (VHB) e C (VHC), consumo excessivo de álcool, tabagismo, ingestão de alimentos contaminados com aflatoxina B1 e síndrome metabólica associada ao diabetes e obesidade (GOMES *et al.*, 2013; LLOVET *et al.*, 2016; MARTIN; HERCEG, 2012). Nos países da África Sub-Saariana e Ásia Oriental, que abrigam as maiores taxas de incidência de CHC, a hepatite B e exposição à aflatoxina B1 são os principais fatores de risco para a doença. Nos EUA, Europa e Japão, a Hepatite C é o principal fator de risco (SUNG, *et al.* 2021). No Brasil, a cirrose constitui o principal fator predisponente para o desenvolvimento do CHC (INCA, 2020).

O CHC é uma doença complexa e heterogênea que surge em decorrência a múltiplos fatores, os quais incluem alterações epigenéticas, mutações somáticas, instabilidade cromossômica e fatores ambientais (BERTINO *et al.*, 2014; DAOUDAKI; FOUZAS, 2014). Os modelos de estudos propõem duas vertentes para o estabelecimento do CHC: (1) Na doença crônica do fígado, a inflamação sustentada provoca a fibrose do estroma hepático e regeneração aberrante dos hepatócitos. Estas anormalidades podem causar cirrose e o acúmulo de alterações culminam com a formação das lesões pré-neoplásicas e (2) A inserção do genoma viral, principalmente por HBV, leva à transformação maligna dos hepatócitos sem o estabelecimento de cirrose ou inflamação acentuada (SCHULZE; NAULT; VILLANUEVA, 2016; VILLANUEVA, 2019). Na infecção por HBV, os danos aos hepatócitos estão principalmente envolvidos com o ciclo de vida viral que favorece a expressão de oncoproteínas virais (HBX), estresse oxidativo e inflamação (XU *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2005).

A infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) é considerado o principal fator de risco para CHC em todo o mundo (ACS, 2019). Cerca de 50% dos casos diagnosticados são atribuídos ao VHB e em menor grau ao VHC (EL-SERAG; RUDOLPH, 2007; PERZ *et al.*, 2006). Dentre as pessoas infectadas pelo VHB, somente 10% desenvolvem infecção crônica. Contudo, a maioria desses indivíduos desenvolve CHC. Por outro lado, 60-80% das pessoas infectadas com o VHC desenvolvem infecção crônica, entretanto apenas 2% desses indivíduos desenvolvem o CHC sugerindo que outros fatores, além da inflamação crônica, devem ser críticos no processo de hepatocarcinogênese associada à infecção viral (LEE *et al.*, 2016). Tem sido relatado que a taxa de integração genômica é maior em CHCs com histórico de infecção pelo VHB quando comparado àqueles associados à infecção pelo VHC. Esse aspecto pode explicar, parcialmente, a maior probabilidade dos indivíduos infectados pelo VHB terem maior susceptibilidade ao desenvolvimento do CHC em relação àqueles infectados pelo VHC (KAWAI-KITAHATA *et al.*, 2015).

Elevadas taxas de instabilidade cromossômica têm sido observadas no CHC. Os eventos de amplificação e/ou deleção promovem a alteração do número de cópias cromossômicas no decorrer no processo de hepatocarcinogênese (AHN *et al.*, 2014; NAULT *et al.*, 2014; SCHULZE; NAULT; VILLANUEVA, 2016; SCHULZE *et al.*, 2015). As alterações que culminam com a ativação de oncogenes ou inativação de genes supressores de tumor são frequentemente observadas e afetam a regulação do

ciclo celular. Tais genes codificam para as proteínas c-myc, p53, ciclinas A e D, PTEN, E-caderina, p16 e pRb (FENG *et al.*, 2012; HU *et al.*, 2003; NIU; NIU; WANG, 2016; SHIRAHA; YAMAMOTO; NAMBA, 2013;). As mutações em *TP53* estão presentes em 30% dos casos e mutações de *CTNNB1* e *AXINI*, que afetam a via Wnt/ β -catenina, podem ser observadas em 30 e 10% dos casos de CHC, respectivamente. As mutações em genes relacionados à remodelação da cromatina (*ARID1A* e *ARID2*) e estresse oxidativo (*NFE2L2* e *KEAP1*) também são observadas (LLOVET *et al.*, 2006; NAULT *et al.*, 2013; PARADIS *et al.*, 2003; PILATI *et al.*, 2014; TOTOKI *et al.*, 2014; WURMBACH *et al.*, 2007).

Estudos demonstram que mutações na região promotora do gene da telomerase (*TERT*), que promovem a reativação de *TERT*, são frequentemente observadas em 60% dos casos CHC em estágio inicial. A região também funciona como um sítio para inserção do genoma viral do HBV, 10% dos casos apresentam este tipo de alteração (LLOVET *et al.*, 2006; NAULT *et al.*, 2014; NAULT *et al.*, 2013; PARADIS *et al.*, 2003; WURMBACH *et al.*, 2007). O alongamento dos telômeros constitui o principal iniciador tumoral associado à cirrose. Além disso, a ausência de mutações nos genes *TP53* e *CTNNB1* nas lesões pré-neoplásicas indicam que tais genes contribuem para a progressão ao invés da iniciação do CHC (ZUCMAN-ROSSI *et al.*, 2015).

As principais vias de sinalização, comumente alterados no CHC são RAS/RAF/MEK/ERK, Wnt/ β -catenina, PI3K/AKT/m-TOR e JAK/STAT (HU *et al.*, 2003; LUPBERGER; HILDT, 2007; NIU, NIU, WANG, 2016; SINGH *et al.* 2014; SPANGENBERG *et al.*, 2009).

A classificação histopatológica que integra as alterações morfológicas e moleculares é de fundamental importância na prática clínica, pois a heterogeneidade intratumoral no CHC é elevada. A compreensão dos fatores associados à hepatocarcinogênese é importante para o direcionamento das propostas terapêuticas e melhor prognóstico (CALDERARO *et al.*, 2019).

Pacientes em um mesmo estágio clínico podem apresentar subtipos moleculares diferentes de CHC. Estes pacientes foram divididos em dois grandes grupos (classe proliferativa e não proliferativa). A classe proliferativa é associada a um comportamento mais agressivo e apresenta altos níveis de α -fetoproteína, alto grau histológico, baixa diferenciação celular e pior prognóstico. Geralmente estão associados às infecções pelo HBV. Além disso, esses tumores apresentam alta

instabilidade cromossômica, mutações em *TP53* e ativação de vias oncogênicas, MAPK, AKT e angiogênese, por exemplo (BOYAULT *et al.*, 2007; CGARN, 2017; CHIANG *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2004; LLOVET *et al.*, 2018; LLOVET *et al.*, 2015;). A classe não proliferativa é geralmente associada às infecções por HCV e abuso de álcool. São tumores de baixo grau histológico e baixa frequência de invasão vascular que apresentam melhor prognóstico. Apresentam mutações de *CTNNB1*, a expressão gênica é semelhante à de hepatócitos normais e ausência de infiltrado imune. As vias JAK/STAT e Wnt/ β -catenina estão geralmente alteradas nesse subtipo (BOYAULT *et al.*, 2007; HOSHIDA *et al.*, 2009; ZUCMAN-ROSSI *et al.*, 2015).

As abordagens terapêuticas empregadas no CHC variam com base nas características do tumor e nas condições do paciente. O estadiamento da doença é feito com base em protocolos que foram estabelecidos nas últimas décadas, sendo que o protocolo proposto pela *Barcelone Clinic Liver Cancer (BCLC)* tem sido amplamente utilizado. Os protocolos de estadiamento consideram diferentes parâmetros incluindo o tamanho do tumor bem como o número deles, os níveis de bilirrubina, albumina e α -fetoproteína, e a presença de trombos e ascites (LLOVET *et al.*, 2016; TROJAN; ZANGOS; SCHNITZBAUER *et al.*, 2016).

O diagnóstico precoce é imprescindível para o bom prognóstico da doença, o que ocorre muito raramente. O diagnóstico geralmente é realizado por tomografia computadorizada, ressonância magnética ou ultrassonografia (BERTINO *et al.*, 2014). As terapias potencialmente curativas (ressecção cirúrgica, transplante de fígado ou ablação local) são indicadas apenas para os pacientes que são diagnosticados nas fases iniciais da doença. Cerca de 70% dos pacientes submetidos a cirurgia sobrevivem por 5 anos após o diagnóstico. Pacientes que são diagnosticados em estágio intermediário (função hepática preservada e lesão restrita ao fígado) são encaminhados para quimioembolização (TRACE, *transarterial chemoembolization*), enquanto aqueles que estão em estágio avançado da doença são submetidos a quimioterapia.

Avanço na terapia sistêmica para o CHC ocorreu com a aprovação, em 2007, pela FDA, do sorafenibe (Nexavar®), um inibidor multi-alvo de RTKs, o qual se tornou única opção de medicamento para o tratamento do CHC (LLOVET *et al.*, 2008; RAOUL *et al.*, 2018; RIBEIRO DE SOUZA; REIG; BRUIX, 2016; ZHAO *et al.*, 2019). Os principais alvos do sorafenibe incluem RAF, VEGFR 2, VEGFR 3,

PDGFR β , c-KIT, FLT-3 e RET. De acordo com os estudos clínicos, o tratamento com sorafenibe aumentou a sobrevida dos pacientes em aproximadamente 3 meses.

Em 2017 foi aprovado o uso de regorafenibe (Stivarga[®]) em pacientes que tiveram progressão da doença durante o tratamento com sorafenibe (LLOVET *et al.*, 2018; ZHAO *et al.*, 2019). Em 2018, o lenvatinibe foi aprovado como um medicamento alternativo ao sorafenibe para tratamento de 1^o escolha. No mesmo ano, ramucirumab (um anticorpo monoclonal contra o VEGFR2) foi aprovado como tratamento de 2^o escolha para pacientes refratários ao sorafenibe. Em 2019, o cabozantinibe (CABOMETYX[®]) foi aprovado como fármaco de 2^a escolha, a exemplo do sorafenibe, pela FDA. Lenvatinib, regorafenibe e cabozantinibe são inibidores multikinase, como o sorafenibe. Alvos importantes do lenvatinibe incluem VEGFR 1-3, FGFR 1-4, PDGFR α , RET e c-KIT; para regorafenibe, VEGFR 1-3, PDGFR β , FGFR 1, c-KIT, RET e B-RAF; e para cabozantinibe, VEGFR 1-3, MET e AXL. A imunoterapia com nivolumab e pembrolizumab foi aprovada como 2^o opção para pacientes com CHC em estágio avançado que são intolerantes ao sorafenibe ou demonstraram progressão da doença (ABOU-ALFA *et al.*, 2018; BRUIX *et al.*, 2017; CHENG *et al.*, 2009; KUDO *et al.*, 2018; LLOVET *et al.*, 2008; ZHU *et al.*, 2018).

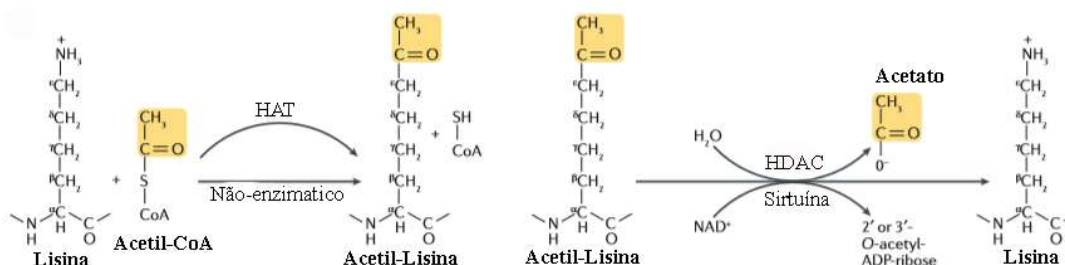
Segundo Pascual *et al.* (2016) o sorafenibe induz perda de peso, hipertensão, diarreia, hipofosfatemia e problemas de pele. Efeitos semelhantes têm sido observados nos pacientes que recebem tratamento com regorafenibe ou cabozantinibe (DEEKS, 2019). Na prática clínica, o sorafenibe possui baixa eficácia e proporciona pouca melhora na sobrevida dos pacientes com CHC em estágio avançado. Esse aspecto justifica a busca por novos protótipos que possam contribuir de modo efetivo nas propostas terapêuticas para o CHC (NICOLAS *et al.*, 2020; WORNIS; GALLE, 2010).

Diante do exposto, estudos têm sido conduzidos com a finalidade de incrementar o arsenal terapêutico para o CHC em estágio avançado. Alguns protocolos terapêuticos empregam o uso combinado de substâncias, uma estratégia importante para inibir, concomitantemente, diferentes vias oncogênicas e superar eventos de refração e de resistência aos fármacos disponíveis. O estudo conduzido por Jeannot *et al.* (2016) demonstrou que o uso combinado de sorafenibe e vorinostat, um inibidor de histona desacetilase, reduziu significativamente o crescimento de CHC em modelo de xenoinxerto.

2.2 A INIBIÇÃO DE HISTONAS DESACETILASES COMO ALVOS PROMISSORES PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER

O processo de acetilação e desacetilação constitui uma das principais formas de modificações pós-traducionais capazes de influenciar muitos processos fisiológicos e patológicos (NARITA; WEINERT; CHOUDHARY, 2018). A acetilação é geralmente modulada pelas HATs que catalisam a transferência do grupo acetila originário da acetil-coenzima A para a porção amino lateral dos resíduos de lisina. O processo é revertido pelas HDACs (Figura 2).

Figura 2 - Mecanismo proposto para a catálise de grupos acetila por enzimas HAT/HDAC.



Fonte: Adaptado de NARITA; WEINERT; CHOUDHARY, 2018.

Notas: A acetilação das lisinas ocorre por meio da transferência de um grupo acetila, proveniente da acetil-CoA, para a cadeia amino lateral ϵ -amino da lisina pelas HATs. Alternativamente, acetil-CoA pode acetilar lisinas em um processo não-enzimático dependente dos níveis de acetil-CoA. A acetilação é revertida por HDACs ou pelas Sirtuínas, desacetilases dependente de NAD^+ . A desacetilação, catalisada pelas HDACs, gera lisina desacetilada e acetato enquanto a desacetilação, catalisada pelas sirtuínas, produz lisina desacetilada, nicotinamida e 2' ou 3'-O-acetil-ADP-ribose.

As HDACs são enzimas capazes de remover, por meio de hidrólise, grupos acetila dos resíduos de lisina em histonas e proteínas não-histonas (KUNNIMALAIYAAN *et al.* 2016). Enquanto a acetilação neutraliza os resíduos de lisina da cadeia lateral das histonas e promove a diminuição da afinidade dos octâmeros de histonas ao DNA favorecendo a transcrição gênica, o processo inverso (desacetilação) promove maior compactação da cromatina impedindo a transcrição gênica (GLOZAK; SETO, 2007; KOUZARIDES, 2007).

Tem sido descrito que células tumorais apresentam alterações no perfil de expressão de HDACs, o que contribui para o silenciamento de genes supressores de tumor. Recentemente Freeze *et al.* (2019) demonstraram que as diferentes classes de HDACs são superexpressas em linhagens celulares e tecidos provenientes de

carcinoma hepatocelular acarretando pior prognóstico. As alterações dos padrões normais de acetilação/desacetilação modificam o perfil de expressão de genes envolvidos com a proliferação, diferenciação e morte celular (JOHNSTONE, 2002; KUMAGAI *et al.*, 2007; MARKS, XU, 2009). Além disso, proteínas não-histonas também podem ser moduladas por algumas isoformas de HDACs incluindo p53, E2F1, STAT3 e Hsp90 (CARON *et al.*, 2005; WITT *et al.*, 2009).

No genoma humano, foram identificados 18 membros de HDACs, os quais estão agrupados nas classes: I, II, III e IV. As classes I, II e IV contêm 11 isoformas de HDACs, cuja atividade catalítica é dependente de zinco (Zn^{+2}) e são consideradas HDACs clássicas. A classe III contém 7 isoformas que diferem das HDACs clássicas por atuarem utilizando como principal cofator o NAD^+ . As diferentes classes estão agrupadas da seguinte forma: Classe I (HDAC 1, 2, 3 e 8), classe IIa (HDAC 4, 5, 7 e 9), classe IIb (HDAC 6 e 10), classe IV (HDAC 11). A classe III é constituída pelas sirtuínas 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 (GREGORETTI *et al.*, 2004; WITT *et al.*, 2009).

Nos últimos anos, muitas substâncias têm sido testadas quanto a capacidade de inibir múltiplas HDACs (pan-inibidores) ou isoformas específicas. De acordo com a estrutura química, os inibidores de HDACs têm sido organizados em cinco classes: (I) ácidos hidroxâmicos, (II) ácidos graxos de cadeia curta, (III) benzamidinas, (IV) tetrapeptídeos cíclicos e (V) inibidores de sirtuínas (CECCACCI *et al.*, 2016; ECKSCHLAGER *et al.*, 2017).

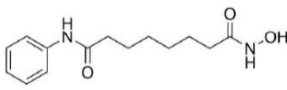
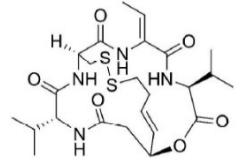
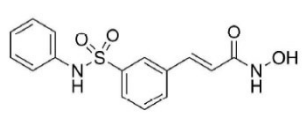
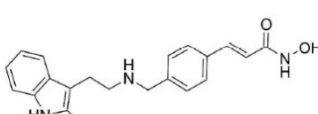
Tricostatina A (ácido hidroxâmico) foi originalmente descrita como um antifúngico obtido de culturas de *Streptomyces platensis*. Posteriormente, sua atividade antiproliferativa foi relatada e descobriu-se que a TSA causava acúmulo de histonas acetiladas em inúmeras linhagens tumorais. Subseqüentemente, o potente efeito inibidor da TSA sobre a atividade das HDAC foi elucidado. Descobriu-se que o ácido hidroxâmico, presente na estrutura da TSA, interage fortemente com o Zn^{2+} no sítio ativo das HDACs. Este processo evita o desempacotamento das histonas e torna o DNA menos disponível para transcrição. A TSA continua sendo um dos inibidores de HDAC mais potentes disponíveis e esta característica faz com que a sua estrutura seja utilizada como esqueleto para a síntese de novos e potentes inibidores (BEIJANSKI, 2009; RODRIGUEZ *et al.*, 2006; SOMOZA *et al.*, 2004; TSUJI *et al.*, 1976; YOSHIDA *et al.*, 1987).

O medicamento oral vorinostat, também conhecido como SAHA (derivado do ácido hidroxâmico relacionado estruturalmente a TSA) e comercializado como

Zolinza[®], foi o primeiro membro dessa classe a entrar em ensaios clínicos em humanos e o primeiro inibidor de HDAC a chegar ao mercado. Foi aprovado pelo FDA em 2006 para o tratamento do linfoma cutâneo de células T (CTCL) em pacientes com doença progressiva, persistente ou recorrente ou após falha de duas terapias sistêmicas (DUVIC *et al.*, 2007; VIGUSHIN *et al.*, 2001).

Atualmente, existem 4 inibidores de HDAC aprovados para uso clínico pela FDA. Vorinostat (SAHA) e, subsequentemente, romidepsin (FK-228) e belinostat (PXD-101) foram aprovados para tratamento de linfoma de células T periféricas. Em 2015, panobinostat (LBH-589) foi aprovado para o tratamento de mieloma múltiplo (MARKS; BRESLOW, 2007; POOLE, 2014; PRINCE; DICKINSON, 2012; YANG, 2011). Vale ressaltar que os inibidores de HDACs aprovados para uso clínico são pan-inibidores e, portanto, inibem diferentes isoformas de HDACs (Tabela 1).

Tabela 1 - Inibidores de histonas desacetilases (HDACi) aprovados pela FDA para uso clínico no tratamento de câncer

Inibidor de HDAC	Estrutura molecular / classe química	Alvo molecular	Uso clínico	Aprovação pela FDA
Vorinostat (SAHA)	 Ácido hidroxâmico	<i>pan-inibidor</i> HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC6	Linfoma cutâneo de células T	06/10/2006
Romidepsin (FK-228)	 Tetrapeptídeo cíclico	<i>pan-inibidor</i> HDAC1, HDAC2 e HDAC3	Linfoma de células T periféricas	05/11/2009
Belinostat (PXD-101)	 Ácido hidroxâmico	<i>pan-inibidor</i> HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC6, HDAC9, HDAC10 e HDAC11	Linfoma de células T periféricas	03/07/2014
Panobinostat (LBH-589)	 Ácido hidroxâmico	<i>pan-inibidor</i> HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC6	Mieloma múltiplo	23/02/2015

Fonte: Adaptado de MARKS; BRESLOW, 2007; POOLE, 2014; PRINCE; DICKINSON, 2012; YANG, 2011.

Considerando que a atividade de HDACs regula eventos biológicos não relacionados ao processo oncogênico, a inibição de diferentes isoformas pode levar a vários efeitos secundários incluindo fadiga, náusea, diarreia, trombocitopenia e problemas cardíacos (HABERLAND *et al.*, 2009; MONTGOMERY *et al.*, 2008). Assim sendo, a identificação de inibidores mais seletivos pode melhorar as propostas terapêuticas contra o câncer (BALASUBRAMANIAN; VERNER; BUGGY, 2009). Dessa forma, estudos pré-clínicos e clínicos estão sendo desenvolvidos para identificar inibidores específicos de HDAC que possam ser úteis para o tratamento de tumores sólidos, seja em esquema de monoterapia ou de terapia combinada.

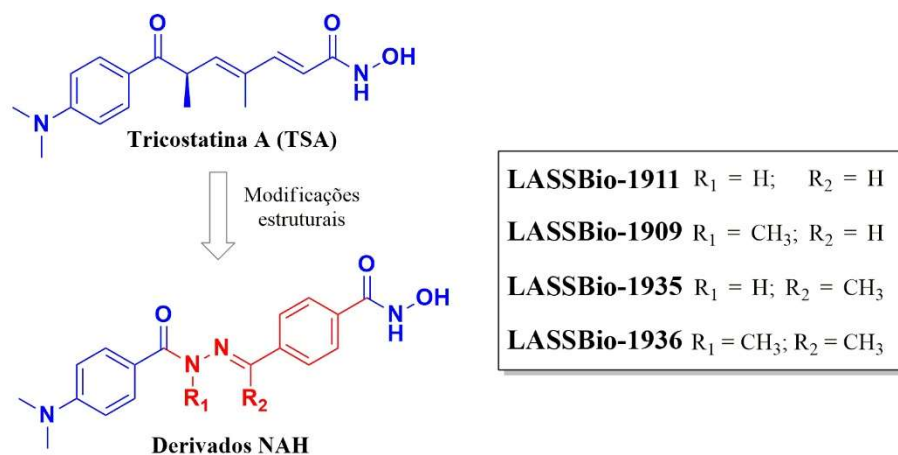
Rodrigues *et al.* (2016) sintetizaram uma série de derivados NAH, projetados com base na estrutura da TSA. O perfil de seletividade de **LASSBio-1909**, **1911**, **1935** e **1936** foi avaliado frente a inibição das HDACs classe I e IIb, que constituem as principais isoformas humanas. A tabela 2 mostra os valores de IC₅₀ obtidos após os estudos de inibição enzimática, realizados *in vitro* e livre de um sistema celular, das HDACs 1, 2, 6 e 8. Os derivados **1909** e **1911** inibiram com maior potência as HDAC8 e HDAC6, respectivamente. Os estudos da relação estrutura-atividade comprovaram que a inserção do grupo metila nos derivados **1909**, **1935** e **1936** melhorou a capacidade inibitória dessas substâncias sobre a HDAC8 (Figura 3). Os dados do estudo realizado por aqueles autores mostraram que os derivados NAH inibem com alta eficiência as HDACs 6 e 8, com mínimos efeitos sobre as HDACs 1 e 2. Em comparação a TSA, parece que as modificações estruturais melhoraram o perfil de seletividade para a inibição das HDACs 6/8 dos derivados NAH. Subsequentemente, estudos de *docking molecular* foram conduzidos e mostraram alta afinidade de **LASSBio-1909** e **1911** pelo sítio ativo das HDACs 6/8. Além disso, a habilidade de inibição da HDAC6 foi confirmada em linhagens derivadas de câncer de pulmão de células não pequenas (A549 e Calu-1) por meio da avaliação dos níveis de acetilação da tubulina e redução da capacidade de migração de células Calu-1. Paralelamente, os derivados NAH demonstraram promissora atividade antitumoral e exibiram seletividade para linhagem HepG2, derivada de carcinoma hepatocelular, em detrimento às linhagens A549, MCF-7 e HT-144 (derivadas de adenocarcinoma de pulmão, adenocarcinoma de mama e melanoma, respectivamente).

Tabela 2 - Valores de IC₅₀ (nM) determinados a partir de ensaios enzimáticos in vitro para avaliar o potencial dos derivados NAH em inibir a atividade de HDACs humanas

	HDAC1	HDAC2	HDAC6	HDAC8
TSA	8,5	52,0	9,0	360,0
LASSBio-1909	> 3000,0	> 3000,0	27,0	130,0
LASSBio-1911	> 3000,0	> 3000,0	15,0	230,0
LASSBio-1935	> 3000,0	> 3000,0	56,0	110,0
LASSBio-1936	> 3000,0	> 3000,0	97,0	54,0

Fonte: Adaptado de RODRIGUES *et al.* (2016).

Figura 3 - Esquema genérico para síntese da classe de derivados *N*-acilidrazônicos.



Fonte: Adaptado de RODRIGUES *et al.* (2016).

Notas: A estrutura dos derivados *N*-acilidrazônicos foi projetada com base da estrutura da Tricostatina A. A principal estratégia de modificação foi realizada por meio de bioisosterismo clássico entre grupos metina (=CH-) e nitrogênio. A região conjugada ao ácido hidroxâmico foi substituída por um anel aromático. As modificações em R₁ e R₂ deram origem aos derivados **LASSBio-1909, 1911, 1935 e 1936**.

A HDAC6 tem características bastante peculiares em relação as outras isoformas de HDACs, pois contém dois domínios catalíticos e o átomo de zinco está localizado próximo à porção C-terminal. É uma desacetilase citoplasmática que age sobre diferentes substratos incluindo α -tubulina, Hsp90, cortactina, p53 (DING *et al.*, 2013; HUBBERT *et al.*, 2002; KONG *et al.*, 2006; KOVACS *et al.*, 2005). Dessa forma, HDAC6 pode modular diferentes processos biológicos relacionados com o desenvolvimento e progressão tumoral, os quais incluem proliferação, migração, angiogênese e morte celular (HUBBERT *et al.*, 2002; KOVACS *et al.*, 2005).

De acordo com relatos na literatura, o papel da HDAC6 no processo de tumorigênese varia de acordo com o tecido considerado. Parece bem estabelecido que HDAC6 tem característica oncogênica, contudo em CHC os dados são controversos. Enquanto alguns estudos mostram que HDAC6 tem atividade oncogênica em CHC e, portanto, os inibidores de HDAC6 podem ser úteis no desenvolvimento de novos agentes antineoplásicos (DING *et al.*, 2013; KALUZA *et al.*, 2011; KONG *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2018), outros mostram que HDAC6 atua como supressor de tumor, de modo que a redução do perfil de expressão de HDAC6 está associada ao processo de hepatocarcinogênese (BAE *et al.*, 2015; JUNG *et al.*, 2012; LV *et al.*, 2016). No estudo de Kanno *et al.* (2013), 3 linhagens derivadas de CHC foram utilizadas (Hep3B, HLF e PLC/PRF/5) para demonstrar que o silenciamento de HDAC6, via RNA de interferência, reduz significativamente a capacidade de migração e invasão dessas células. Ding *et al.* (2013) avaliaram o impacto do silenciamento e expressão ectópica de HDAC6 em células derivadas de CHC (HepG2) e observaram, respectivamente, redução e aumento na taxa de proliferação. Além disso, Kaluza *et al.* (2011) descreveram que HDAC6 atua indiretamente como fator anti-angiogênico por inibir a proliferação e migração de células endoteliais via hipoacetilação de cortactina.

A HDAC8 difere-se das outras enzimas da mesma classe, pois o domínio de ligação às proteínas, localizado na porção C-terminal, não está presente nesta isoforma (SOMOZA *et al.*, 2004). A enzima possui uma estrutura extremamente flexível capaz de acomodar diferentes substratos como as histonas H3 e H4 e proteínas não histonas como coesina, cortactina e outras (DEARDORFF *et al.*, 2012; OLSON *et al.*, 2014). Dessa forma, HDAC8 pode modular diferentes processos biológicos como a separação das cromátides irmãs, a organização do citoesqueleto e a contração muscular (LI *et al.*, 2014). Além disso, HDAC8 também pode modular a função de p53, a qual está envolvida nos processos de proliferação, reparo de DNA e morte celular (VANNINI *et al.*, 2007). Recente estudo demonstrou que HDAC8 desacetila α -tubulina, um alvo conhecido da HDAC6, indicando que alguns alvos moleculares podem ser comuns entre as HDACs 6 e 8 (VANAJA *et al.*, 2018). Nos últimos anos, vários estudos têm sido conduzidos para avaliar o papel de HDAC8 em diferentes tipos de câncer incluindo os tumores sólidos. Os estudos são convergentes e indicam que HDAC8 tem atividade oncogênica em muitos tipos de tumores incluindo o carcinoma hepatocelular, de modo que sua inibição representa uma

estratégia terapêutica importante contra CHC (ADHIKARI *et al.* 2019; TIAN *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2013).

O uso de inibidores de HDACs ainda não foi liberado para o tratamento de pacientes portadores de CHC, entretanto, parece ser uma opção terapêutica promissora, principalmente, porque o câncer de fígado é diagnosticado em estágio avançado, com prognóstico ruim e estratégias de tratamento limitadas (HARD; MANN, 2016). As taxas de sobrevivência em 5 anos são muito baixas (3 a 11 %) (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018).

O estudo SHELTER avaliou o uso combinado de resminostat (derivado do ácido hidroxâmico) e sorafenibe em pacientes com CHC avançado. O estudo encontrou um tempo de progressão e sobrevida geral de 1,8 e 4,1 meses para resminostat, respectivamente, e 6,5 e 8,0 meses para a combinação, demonstrando um benefício na sobrevivência (3,8 meses) em pacientes tratados com resminostat + sorafenibe (BITZER *et al.*, 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os mecanismos relacionados à atividade antiproliferativa de derivados *N*-acilidrazônicos sobre as linhagens HepG2 e Hep3B, as quais são derivadas de carcinoma hepatocelular.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar o perfil de citotoxicidade de derivados NAH sobre linhagens celulares derivadas de CHC com diferentes características genéticas;
- ✓ Avaliar o perfil de seletividade das substâncias frente às células tumorais;
- ✓ Investigar os mecanismos moleculares associados às atividades antiproliferativa e citotóxica das substâncias mais ativas;
- ✓ Avaliar se há correlação entre a atividade antiproliferativa e inibição de HDAC6;
- ✓ Investigar a capacidade da substância líder em inibir o comportamento migratório de células Hep3B.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LINHAGEM CELULAR E CONDIÇÕES DE CULTIVO

No presente estudo foram utilizadas as linhagens HepG2 e Hep3B, derivadas de carcinoma hepatocelular. Culturas primárias de fibroblastos foram incluídas no estudo para avaliar os perfis de citotoxicidade das substâncias estudadas frente células saudáveis.

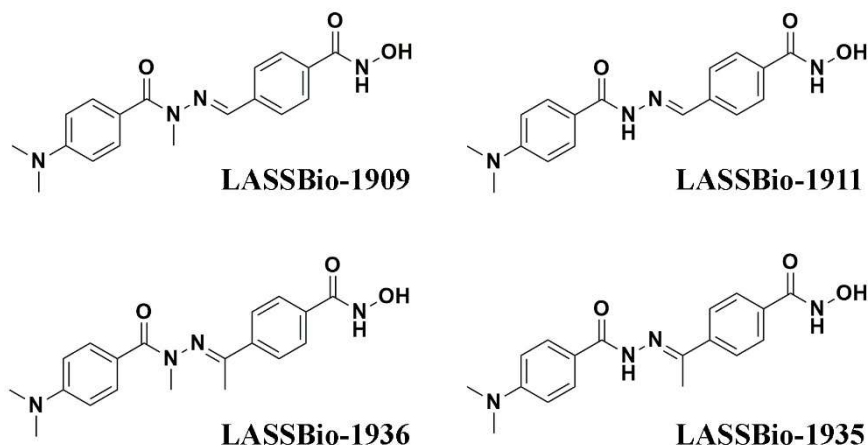
As linhagens HepG2 e Hep3B foram adquiridas junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro e cultivadas em Meio Mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM/F12, Sigma, CA, USA) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS, Cultilab, SP, Brasil). As culturas foram mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera controlada (95 % de ar e 5 % de CO₂) e subculturas foram feitas regularmente a cada 2 ou 3 dias.

As culturas primárias de fibroblastos foram estabelecidas a partir de fragmentos (1,5 x 1,5 mm) de tecido gengival (FB1) e de pele (FPM) usando meio de cultura DMEM/F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina/estreptomicina (50 unidades/50 µg/mL) e anfotericina B (2,5 µg/mL). Os fragmentos de tecido gengival foram coletados durante gengivoplastia na clínica de odontologia da UNIFAL-MG e as culturas primárias foram estabelecidas pela Dra. Marta Miyazawa. O fragmento de pele foi coletado na Santa Casa de Alfenas durante cirurgia eletiva e a cultura primária foi estabelecida pelo prof. Dr. Angel Mauricio Castro Gamero. A coleta do material biológico foi realizada de acordo com o as normas estabelecidas pelo comitê de ética em pesquisa em humanos (#69453817.9.0000.5142).

4.2 OBTENÇÃO DOS DERIVADOS NAH

Os derivados NAH (**LASSBio-1909**, **1911**, **1935** e **1936**) foram obtidos por síntese orgânica no Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio)/Universidade Federal do Rio de Janeiro e cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. Carlos Alberto Mansour Fraga (Figura 4). As substâncias foram solubilizadas em DMSO para a obtenção das soluções-estoque (10,0 mM).

Figura 4 - Estruturas dos derivados NAH (**LASSBio-1909**, **1911**, **1935** e **1936**) propostos por Rodrigues *et al.* (2016).



Fonte: Adaptado de RODRIGUES *et al.* (2016).

4.3 VIABILIDADE CELULAR

4.3.1 Ensaio colorimétrico baseado na conversão do sal tetrazólio em formazano (MTS)

Para este ensaio, as células foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de $1,0 \times 10^4$ células/poço. As substâncias (**LASSBio-1909**, **1911**, **1935** e **1936**) foram testadas nas concentrações de 5,0; 10,0; 20,0; 40,0 e 80,0 μM por 48 horas. Decorrido o tempo de tratamento, foi adicionado 10 μL de MTS por poço e a placa foi incubada por 4 horas a 37 °C. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (490 nm). Os valores de IC_{50} (concentração capaz de inibir 50 % do crescimento) foram determinados por meio do programa Calcsyn (Biosoft, Ferguson, Missouri, USA).

4.3.2 Ensaio de exclusão com azul de Trypan

As células foram semeadas em placa de 12 poços com densidade de $5,0 \times 10^4$ células/poço. Após adesão, as células foram tratadas com **LASSBio-1911** e **1935** nas concentrações de 5,0 e 10,0 μM por 24, 48 e 72 horas. Nos dias de interesse, as populações de células viáveis e inviáveis foram quantificadas em hemocitômetro na presença do corante azul de Trypan (0,4 %).

4.4 ENSAIO DE CAPACIDADE CLONOGÊNICA

As células foram semeadas em baixa densidade (1000 células por placa) em placas de 35 mm de diâmetro. Após adesão, as células semeadas estavam aderidas, porém isoladas, ocasião em que as culturas foram tratadas com **LASSBio-1911** por 24 horas. Decorrido o período de tratamento, o meio foi substituído por meio fresco e as placas foram mantidas em estufa a 37 °C, contendo 5 % de CO₂, por 12 dias. Após o período de incubação, as culturas foram lavadas com PBSA e as células foram fixadas por 30 minutos com metanol P.A (Sigma-Aldrich LTDA, Brasil). Após secagem, as placas foram coradas com cristal violeta por 5 minutos. A quantificação das colônias foi realizada com auxílio de estereomicroscópico (aumento de 20 x) e foram consideradas na análise as colônias que tinham, pelo menos, 50 células.

4.5 ANÁLISE DE INCORPORAÇÃO DE BRDU

As células foram semeadas em placas de 35 mm sobre lamínula com inóculo inicial de 1×10^5 células/placa. Após adesão, as culturas foram tratadas por 48 horas com **LASSBio-1911** e **1935** nas concentrações de 5,0 e 10,0 μ M. decorrido o tempo de tratamento, o meio de cultura foi substituído por meio fresco suplementado com BrdU (EMD Biociences) 100,0 μ M. Após esse período, as células foram fixadas com formaldeído 3,7 % por 30 minutos e tratadas com triton X-100 (0,5 %) por 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram tratadas com HCl (1,5 M) por 30 minutos e após sucessivas lavagens, as amostras foram incubadas com anti-BrdU (1:100, Bu20a Mouse mAb/ Cell Signaling Technology) a 4° C por 12 horas. No dia seguinte, foi adicionado anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo 1:100, Sigma-Aldrich LTDA, Brasil) conjugado a fluoresceína por 2 horas. Os núcleos foram contra corados com DAPI (Molecular Probes-LifeTechnologies) por 30 minutos. As lâminas foram montadas com VectaShield (Vector-Lab, California, EUA) e analisadas em microscópio de fluorescência (Zeiss Axio Scope, A1, NY, USA). Os resultados referem-se à média de 3 experimentos independentes. Foram quantificadas 1000 células por lâmina.

4.6 ANÁLISE DO CICLO CELULAR

As células foram semeadas em placa com 35 mm com densidade de $1,0 \times 10^5$ células/poço. Após adesão, as células foram tratadas por 48 horas com **LASSBio-1911** e **1935** nas concentrações de 1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 μM . Após tratamento as células foram coletadas por digestão enzimática (trypsin-EDTA solution/Sigma-Aldrich LTDA, Brasil) e transferidas para tubos Falcon. O precipitado de células foi obtido por centrifugação (5 minutos a 1000 rpm). As amostras foram fixadas com etanol (75 % em PBSA-Salina fosfato tamponada) a 4 °C por 24 horas. Após nova centrifugação, as células foram coradas por 1 hora em uma solução contendo PBSA, RNase (1,5 mg/mL) e iodeto de propídio (90 $\mu\text{g/mL}$). A análise foi realizada em citômetro de fluxo (Guava Mini EasyCyte, 8HT) usando o software GuavaSoft 2.7.

4.7 IMMUNOBLOT

As células foram semeadas em placas de 100 mm de diâmetro ($2,0 \times 10^6$ células/placa). Após tratamento, as células foram homogeneizadas em tampão RIPA (NaCl 150mM, NP-40 1,0 %, ácido deoxicolato de sódio 1,0 % em Tris-HCL 50 mM, pH= 7,5) contendo inibidores de proteases (Sigma-Aldrich LTDA.). Após centrifugação (12000 g) por 10 minutos, o sobrenadante foi coletado e a quantificação de proteínas foi realizada pelo método BCA (GE Healthcare). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (filtro de 562 nm).

As amostras foram diluídas em tampão de amostra 4x (Tris 0,5 M – pH 6,8, 4 ml de glicerol, SDS 10 %, azul de bromofenol 1,0 % e betamercaptoetanol 1,0 % em água deionizada) e desnaturadas por 5 minutos (100 °C). O fracionamento das proteínas foi realizado em minigel de poliacrilamida 12 % com SDS (2,5 horas a 100V). Em cada poço foi colocado 30 μg de proteínas totais.

A transferência para membrana de PVDF (Amersham Pharmacia) foi realizada por 2 horas a 200 mA em tampão (Tris 0,025 M, glicina 0,192 M e metanol a 20 % em água destilada). Após a transferência das proteínas, a membrana foi corada em solução de Ponceau 0,5 % por 3 minutos para verificar a eficiência da transferência. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes em TBS (solução salina tamponada com Tris) a 0,02 M (10 minutos cada lavagem). O bloqueio foi realizado

com TBS a 0,02 M contendo leite desnatado em pó (Molico – Nestlé) a 5 % e tween 20 (Pharmacia) a 0,05 % por 1 hora à 27 °C, sob agitação.

As membranas foram incubadas com os anticorpos primários, diluídos em solução de bloqueio por 12 horas a 4 °C, sob agitação. Os anticorpos utilizados, bem como suas especificações estão inseridos na tabela 3. Após sucessivas lavagens com TBS e TTBS (tampão tris-salina acrescido de 0,1 % de tween 20), a membrana foi incubada com anticorpos secundários anti-IgG de camundongo ou de coelho (1:1000) (Kit ECL[®], Amersham Pharmacia) por 2 horas a 27 °C, sob agitação. Foi então lavada novamente e revelada por quimioluminescência (ECL[®], Amersham Pharmacia) conforme especificações do fabricante. Os resultados foram registrados em filme Hyperfilm Amershan. A quantificação das bandas imunorreativas foi realizada usando o programa de domínio público ImageJ (*Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA*).

Tabela 3 - Relação de anticorpos primários e especificações

Anticorpo Primário	Código	Diluição	Fabricante
p-ERK (E-4)	sc-7383	1:200	
ERK 1 (K-23)	sc-94	1:200	Santa Cruz
p-Histone H3 (Ser10)	sc-8656-R	1:200	Biotechnology
Cyclin B1 (GNS1)	sc-245	1:200	
α -Tubulin	T9026	1:1000	Sigma-Aldrich
Ac- α -Tubulin (K40)	D20G3	1:1000	Cell Signaling

Fonte: Do autor.

4.8 qPCR

As células foram semeadas em placas de 35 mm de diâmetro a uma densidade de $2,0 \times 10^5$ células por placa. As células foram coletadas por digestão enzimática e após centrifugação (1000 rpm por 5 minutos a 4 °C), o precipitado de células foi homogeneizado em 350 μ L de tampão de lise do kit RNeasy Mini[®] (Qiagen, Mississauga, Ontario, CA).

As amostras foram armazenadas a -80 °C até o momento da extração do RNA. O RNA total de cada grupo experimental (n = 4) foi extraído utilizando o kit RNeasy Mini[®] (Qiagen, Mississauga, Ontario, CA) de acordo com as instruções do fabricante e, então, eluído em 30 μ L de água livre de RNase. A concentração de

RNA total das amostras foi mensurada através do espectrofotômetro NanoDrop® ND 1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Em seguida 1 µg de RNA total foi incubado com DNase (1U; Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) para eliminação de possível contaminação com DNA genômico e então submetido à reação de transcrição reversa (RT) utilizando Randon primers e High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit® (Applied Biosystems, São Paulo, SP, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. Os reagentes foram incubados a 25 °C por 10 min, 37 °C por 120 min e então, 85 °C por 5 min para a inativação da enzima.

A abundância de mRNA dos genes alvos foi investigada através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, utilizando o termociclador ABI Prism7500® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e o protocolo de amplificação do kit Power Syber Green Master Mix® (Applied Biosystems).

Os valores de expressão dos genes alvos foram normalizados pela expressão do gene constitutivo β-actina. A abundância relativa de RNAm de cada gene foi calculada utilizando o método ΔΔCt com correção da eficiência e utilizando uma amostra controle como calibradora (PFAFFL, 2001). Os valores médios de eficiência para cada gene foram calculados através do perfil de amplificação de cada amostra utilizando-se o programa LinRegPCR (RAMAKERS *et al.*, 2003).

Tabela 4 - Sequência de bases dos primers utilizados na qPCR

Gene	Sequência do primer
<i>AURKA</i>	F 5'- TCTTCACAGGAGGCAAATCCA-3'
	R 5'-AATAAGTTACACACTCACTCAGGTACTA-3'
<i>AURKB</i>	F 5'-AAAGAGCCTGTCACCCCATC-3'
	R 5'-CGCCCAATCTCAAAGTCATC-3'
<i>BAX</i>	F 5'-TTCCTTACGTGTCTGATCAATCC-3'
	R 5'-GGGCAGAAGGCACTAATCAA-3'
<i>BCL2</i>	F 5'-CAGAAGTCTGGGAATCGATCTG-3'
	R 5'-AATCTTCAGCACTCTCCAGTTATAG-3'
<i>CCNB1</i>	F 5'- GTACCCTCCAGAAATTGGTGA-3'
	R 5'- GACTACATTCTTAGCCAGGTG-3'
<i>CDKN1A</i>	F: 5'-CCATAGCCTCTACTGCCACCATC-3'
	R 5'-GTCCAGCGACCTTCCTCATCCA-3'
<i>CDK1</i>	F 5' -ATGAGGTAGTAACACTCTGG-3'
	R 5' -CCTATACTCCAAATGTCAACTG-3'
<i>CDC25C</i>	F 5'-TGGAACCTCCCCGACAGTAAGG-3'
	R 5'-TTTTTCCAAGGTATGTGCGCTG-3'

(continua)

Tabela 5 - Sequência de bases dos primers utilizados na qPCR

Gene	Sequência do primer
<i>HDAC6</i>	F 5' -CAACTGAGACCGTGGAGAG- 3'
	R 5' -CCTGTGCGAGACTGTAGC- 3'
<i>HDAC8</i>	F 5' -CCAAGAGGGCGATGATGATC- 3'
	R 5' -GTGGCTGGGCAGTCATAACC- 3'
<i>PLK1</i>	F 5'-CCTGCACCGAAACCGAGTTAT-3'
	R 5'-CCGTCATATTCGACTTTGGTTGC-3'
<i>WEE1</i>	F 5'- GGG AATTTGATGTGCGACAG-3'
	R 5'-CTTCAAGCTCATAATCACTGGCT-3'
<i>ACTB</i>	F 5' - AGAGCTACGAGCTGCCTGAC-3'
	R 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG – 3'
<i>GAPDH</i>	F 5'- GGATTTGGTCGTATTGGGC-3'
	R 5'- TGGAAGATGGTGTGATGGGATT-3'
<i>18srRNA</i>	F 5'- GTAACCCGTTGAACCCCAT-3'
	R 5'- CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'

Fonte: Do autor.

4.9 ANÁLISE DO CITOESQUELETO

As células foram semeadas em placas com 35 mm de diâmetro ($2,0 \times 10^5$ células/placa) sobre lamínula. As amostras foram tratadas com **LASSBio-1911** nas concentrações de 5,0 e 10,0 μM por 48 horas. Ao término do tratamento, as células foram fixadas em 3,7 % de formaldeído por 30 minutos e tratadas com triton X-100 (0,5 %) por 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram incubadas com anti-tubulina (1:100, Sigma-Aldrich, Califórnia, Estados Unidos) a 4° C por 12 horas. No dia seguinte, após lavagens em PBSA, as amostras foram incubadas com anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo 1:100, Sigma) conjugado a fluoresceína por 2 horas. Para análise de F-actina, as amostras foram coradas com faloidina conjugada a rodamina (Sigma-Aldrich, Califórnia, Estados Unidos). Os núcleos foram contra corados com DAPI (4',6- Diamidino-2'-Phenilindol diidrocloreto, Sigma-Aldrich, Califórnia, Estados Unidos). As lâminas foram montadas com VectaShield (Vector, California, EUA) e analisadas em microscópio confocal de varredura a laser (C2, Nikon, Tóquio, Japão).

4.10 ENSAIO DE FECHAMENTO DE FERIDA

As células foram semeadas em placa de 24 poços com inóculo de $2,0 \times 10^5$ células por poço. Após 24 horas, a ferida foi realizada raspando-se a monocamada com o auxílio de uma ponteira de 200 μL . Em seguida, as culturas de Hep3B foram incubadas com **LASSBio-1911** nas concentrações de 5,0 e 10,0 μM , em estufa (37,0 °C, 95,0 % de ar e 5,0 % de CO_2) integrada ao sistema de microscópio invertido Zeiss Axio Observer Z1 e câmera MRc (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha). Imagens no momento T0 foram capturadas para registrar a área inicial das feridas. Posteriormente, as imagens foram registradas no decorrer de 48 horas. A migração para área das feridas foi expressa como percentual de fechamento da ferida. A área da ferida foi quantificada utilizando o software ZEN (ZEISS Efficient Navigation).

4.11 ENSAIO DE ANEXINA V/7-AAD

O ensaio foi realizado utilizando o Kit Guava Nexin Reagent (Merck/millipore) de acordo com instruções do fabricante. As células foram tratadas por 48 ou 72 horas com **LASSBio-1911** e **1935** nas concentrações de 5,0 e 10,0 μM . Após o tempo de tratamento, as células foram coletadas por digestão enzimática (trypsin-EDTA solution/Sigma-Aldrich LTDA, Brasil), centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos, lavadas em PBSA e homogeneizadas em solução contendo anexina V conjugada a PE e 7-AAD. As amostras foram incubadas por 20 minutos, protegidas da luz em temperatura ambiente e a análise foi realizada no citômetro fluxo (Guava Mini Easy Cyte, 8HT) através do software GuavaSoft 2.7.

4.12 ENSAIO DE COMETA

As células foram semeadas em placas de 35 mm (2×10^5 células/poço). As culturas foram tratadas com **LASSBio-1911** e **1935** por 24 horas. A suspensão celular foi obtida por digestão enzimática (Trypsin-EDTA solution/Sigma-Aldrich LTDA, Brasil). As amostras foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. O precipitado foi homogeneizado em 100 μL de meio de cultura. Foi realizada contagem em hemocitômetro na presença de azul de Trypan (1:1) para ajuste de inóculo (5×10^4 células/lâmina) e 70 % de viabilidade. O material foi homogeneizado com 100 μL de

agarose de baixo ponto de fusão (Sigma-Aldrich LTDA, Brasil). A amostra adicionada sobre lâminas revestidas previamente com agarose ponto padrão de fusão (Sigma-Aldrich LTDA, Brasil). As lâminas foram mantidas a 4 °C em solução tampão de lise.

A eletroforese foi realizada em cuba horizontal em condições alcalinas por 20 minutos, 20 volts e 300 mA. Deste modo, foi aplicado $1\text{v}/\text{cm}^2$. Após eletroforese, as lâminas foram transferidas para tampão de neutralização por 15 minutos, secas e coradas com Sybr Green (Molecular Probes SYBR® Green I nucleic acid gel stain) para observação em microscopia de fluorescência (Microscópio de Fluorescência Zeiss Axio Scope, A1, NY, USA). Foram analisados 50 cometas por lâmina por meio do software OpenComet /ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Os resultados apresentados referem-se à média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em duplicata.

4.13 ENSAIO DE DETECÇÃO DE β -GALACTOSIDASE ASSOCIADA À SENESCÊNCIA (SA- β -GAL)

Para o ensaio de SA- β -GAL, as células foram semeadas em placas de 35 mm com inóculo de $2,0 \times 10^5$ células/placa e tratadas com **LASSBio-1911 e 1935** na concentração de $10,0 \mu\text{M}$ por 48 horas. Após tratamento as amostras foram fixadas com 2 % de paraformaldeído/ 1 % de glutaraldeído por 5 minutos, lavadas com PBSA e incubadas por 6 horas a 37 °C com a solução de coloração contendo, X-gal ($1,0 \text{mg. mL}^{-1}$), NaCl (150,0 mM), MgCl_2 (2,0 mM), $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (5,0 mM) e $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (5,0 mM) em tampão fosfato (40,0 mM, pH = 6,00). As imagens foram obtidas no microscópio óptico de luz no aumento de 10 x. Foram quantificadas 1000 células/placa. As células azuis indicam células positivas para β -galactosidade.

4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

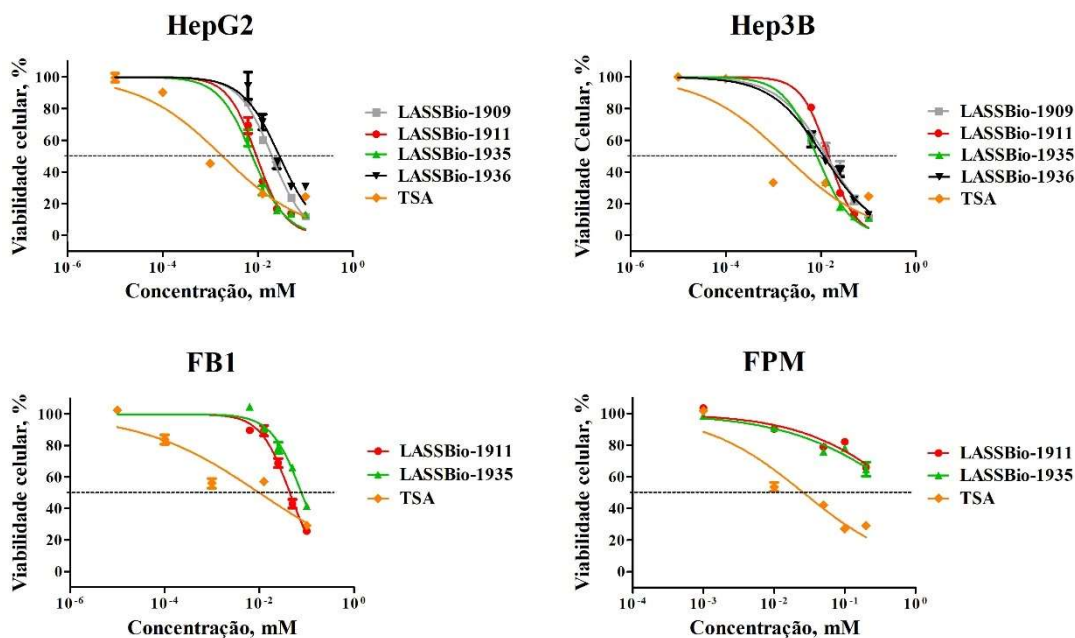
Os dados apresentados referem-se a média \pm desvio padrão (DP) de três experimentos independentes realizados em triplicata submetidos a análise de variância (ANOVA) seguida do pós- teste de Tukey por meio do programa GraphPadPrism® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

5 RESULTADOS

5.1 OS DERIVADOS NAH REDUZIRAM A PROLIFERAÇÃO DE LINHAGENS DERIVADAS DE CHC

Inicialmente, nós avaliamos a atividade citotóxica dos derivados NAH (**LASSBio-1909**, **1911**, **1935** e **1936**) frente linhagens derivadas de carcinoma hepatocelular (HepG2 e Hep3B) por meio do ensaio colorimétrico MTS. A Tricostatina A (TSA), um pan-inibidor de histonas desacetilases, foi utilizada como controle. A figura 5 mostra que os derivados NAH reduziram a viabilidade celular das linhagens HepG2 e Hep3B após 48 horas de exposição ao tratamento em um mecanismo dependente da concentração. Como mostrado na tabela 1, as substâncias **LASSBio-1911** e **1935** foram mais citotóxicas para a linhagem HepG2 em comparação à **LASSBio-1909** e **1936**. Na linhagem Hep3B, **LASSBio-1935** foi a substância mais ativa.

Figura 5 - Viabilidade celular, determinada por MTS, em culturas de HepG2, Hep3B, FB1 e FPM tratadas com os derivados NAH.



Fonte: Do autor.

Notas: As culturas foram tratadas com os derivados NAH (**LASSBio-1909**, **1911**, **1935** e **1936**) em diferentes concentrações (5,0; 10,0; 20,0; 40,0 e 80,0 μ M) por 48 horas. A TSA foi utilizado como controle. Decorrido o tempo de tratamento, o MTS foi adicionado e após 4 horas de incubação, as absorbâncias (abs) foram adquiridas em espectrofotômetro (ELISA). Viabilidade celular (%) refere-se à razão entre a abs das amostras tratadas e controle (x 100). Os resultados referem-se à média de 3 experimentos independentes realizados em quadruplicata.

Posteriormente, nós tratamos as culturas primárias de fibroblastos (FB1 e FPM) com **LASSBio-1911** e **1935** por 48 horas para avaliar o perfil de citotoxicidade em células normais. Os valores de IC_{50} determinados para as referidas substâncias em FB1 foram superiores aos obtidos para as linhagens HepG2 e Hep3B. O tratamento com **LASSBio-1911** apresentou seletividade para as linhagens HepG2 e Hep3B considerando o IS de 4,68 e 3,06, respectivamente. O tratamento com **LASSBio-1935** mostrou-se 10 e 8 vezes mais seletivo para as linhagens HepG2 e Hep3B. Nas culturas de FPM, nós não verificamos redução da viabilidade na faixa de concentração avaliada (5,0 a 200,0 μ M), portanto, a determinação dos valores de IC_{50} e IS não foi realizada. Além disso, nós tratamos as linhagens e as culturas primárias com TSA. Comparado a TSA, o tratamento com os derivados NAH exibiu menor citotoxicidade para células normais. Estes resultados indicam alta seletividade das substâncias **LASSBio-1911** e **1935** para células tumorais, nas condições experimentais avaliadas.

Tabela 6 - Valores de IC_{50} (μ M), determinados a partir dos ensaios de MTS, após tratamento com os derivados NAH

	HepG2	Hep3B	FB1	FPM
LASSBio-1909	19,78 \pm 0,68	13,07 \pm 1,39	NR	NR
LASSBio-1911	9,40 \pm 0,71	14,36 \pm 0,56	43,98 \pm 2,22	> 200,00
LASSBio-1935	7,64 \pm 0,78	8,86 \pm 0,47	77,70 \pm 5,36	> 200,00
LASSBio-1936	28,51 \pm 3,42	11,38 \pm 0,99	NR	NR
TSA	1,64 \pm 0,43	1,60 \pm 0,65	8,53 \pm 2,65	25,97 \pm 4,79

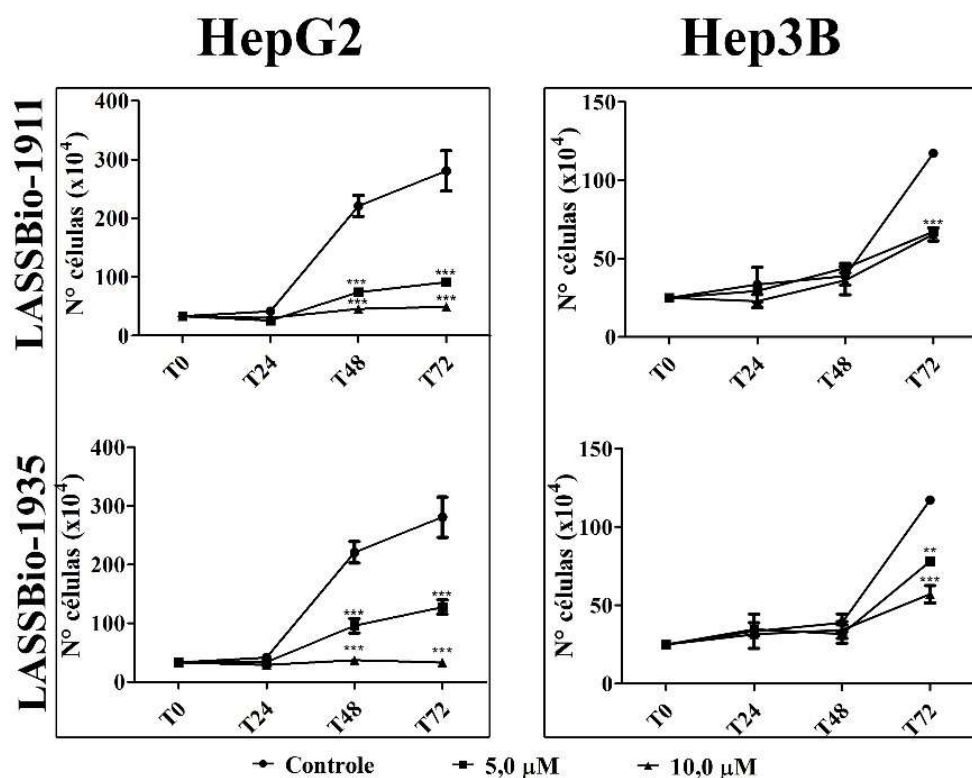
Fonte: Do autor. NR: não realizado.

Para melhor explorar os efeitos antiproliferativo e citotóxico dos derivados NAH, nós selecionamos as substâncias **LASSBio-1911** e **1935**, as quais obtiveram o melhor desempenho na redução da viabilidade celular e mostraram melhores índices de seletividade para as linhagens derivadas de CHC.

Nós utilizamos o ensaio de exclusão com azul de Trypan como parâmetro adicional para avaliar os efeitos do tratamento com **LASSBio-1911** e **1935** sobre a viabilidade celular das linhagens HepG2 e Hep3B. Nesta abordagem experimental é possível distinguir as populações de células viáveis e inviáveis, pois o corante penetra somente em células que perderam a integridade da

membrana e funciona como um marcador para identificação de células mortas (HYNES *et al.*, 2003; MINERVINI *et al.*, 2004). Para realização deste ensaio, nós tratamos as linhagens HepG2 e Hep3B com **LASSBio-1911** e **1935** nas concentrações de 5,0 e 10,0 μM e quantificamos as células viáveis e inviáveis após 24, 48 e 72 h de exposição ao tratamento. A figura 6 mostra que o tratamento com derivados alterou a curva de crescimento em ambas as linhagens. Quando as culturas de HepG2 foram tratadas com **LASSBio-1911** nas concentrações de 5,0 e 10,0 μM , nós observamos drástica redução na frequência de células viáveis após 48 horas de tratamento. Perfil semelhante foi observado quando as culturas de HepG2 foram tratadas com **LASSBio-1935**. Por conseguinte, a linhagem Hep3B mostrou-se mais resistente em relação à linhagem HepG2, considerando que a redução na frequência de células viáveis ocorreu somente após 72 horas de exposição ao tratamento com **LASSBio-1911** e **1935**.

Figura 6 - Populações de células viáveis em culturas de HepG2 e Hep3B, determinadas por meio do ensaio de exclusão com azul de Trypan.



Fonte: Do autor.

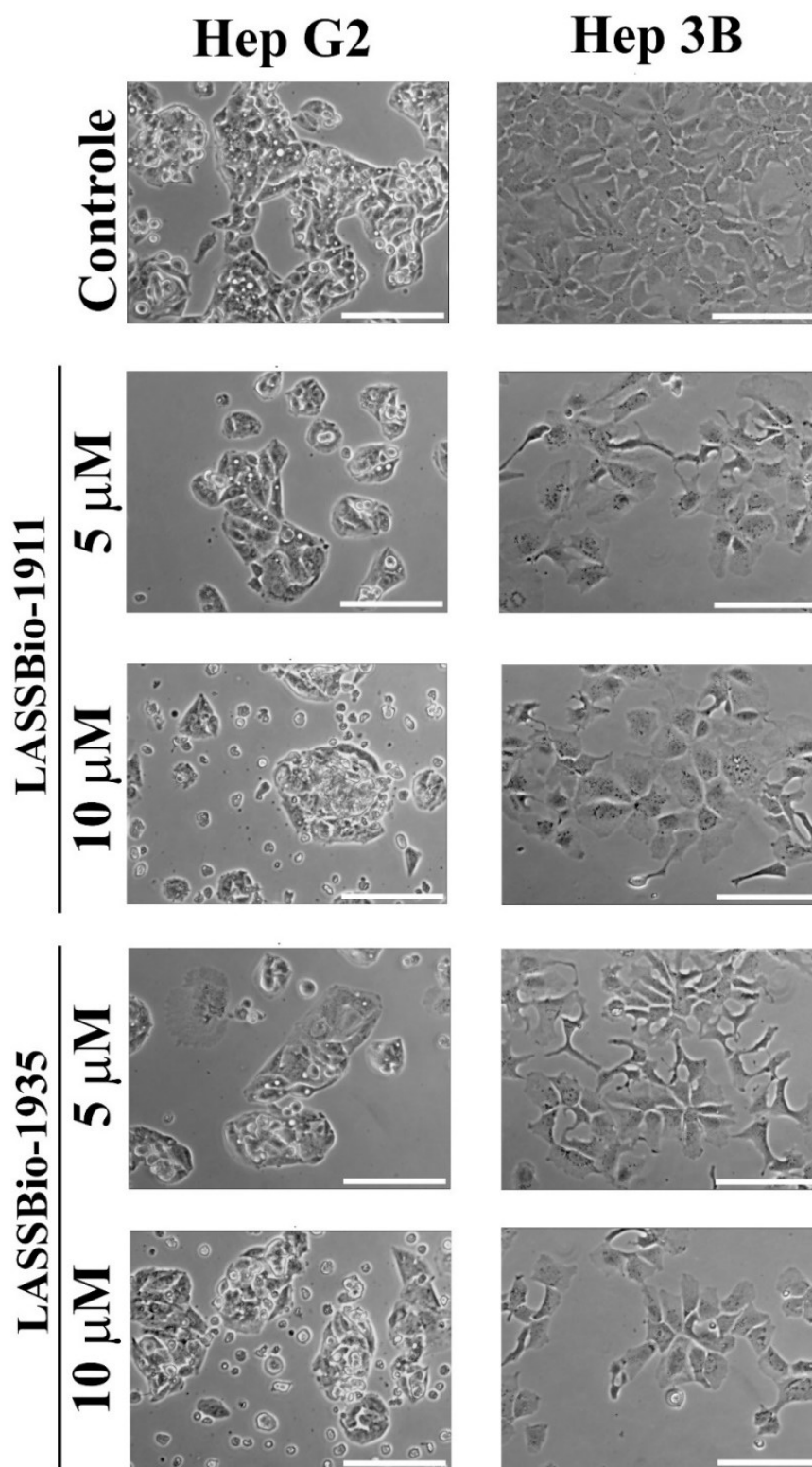
Notas: As culturas foram tratadas por 24, 48 e 72 horas com **LASSBio-1911** e **LASSBio-1935** utilizados nas concentrações de 5,0 e 10,0 μM . Decorrido o tempo de tratamento as células foram quantificadas com o auxílio do corante azul de Trypan. Os resultados referem-se a média de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$.

A figura 7 ilustra o aspecto morfológico das linhagens HepG2 e Hep3B tratadas por 48 horas com **LASSBio-1911** e **1935**. Na linhagem HepG2, nós observamos aumento na frequência de células arredondadas e parcialmente aderidas, além de restos celulares nos grupos tratados. Esses eventos indicam que essas substâncias têm efeito citotóxico quando utilizadas na concentração de 10,0 μM . Na linhagem Hep3B, células maiores foram observadas nos grupos tratados com **LASSBio-1911** e **1935** em comparação ao grupo controle. Além disso, as células das culturas tratadas apresentaram aspecto alongado e fusiforme, cujo padrão morfológico difere daquele observado em culturas controle (aspecto poliédrico). Nós também observamos menor densidade celular nas culturas tratadas com **LASSBio-1911** e **1935**.

Na sequência, ensaios de incorporação de BrdU (bromodeoxiuridina) e análise de progressão do ciclo celular foram empregados para avaliar a influência das substâncias **LASSBio-1911** e **1935** sobre o comportamento proliferativo das linhagens derivadas de CHC.

O ensaio de incorporação de BrdU é altamente específico e permite determinar a frequência de células na fase S do ciclo celular. Este nucleosídeo é um análogo da timidina, o qual é incorporado durante o processo de replicação de DNA em células que estão progredindo no ciclo celular. Para esta abordagem, nós tratamos as linhagens HepG2 e Hep3B por 48 horas com as substâncias nas concentrações de 5,0 e 10,0 μM e realizamos preparações citológicas imunomarcadas para BrdU. A figura 8 mostra que houve redução na frequência de células na fase S nos grupos tratados quando comparados aos controles, em ambas as linhagens, reforçando a hipótese de que **LASSBio-1911** e **1935** reduzem a proliferação das linhagens HepG2 e Hep3B. O padrão de marcação para BrdU pode ser observado na figura 9.

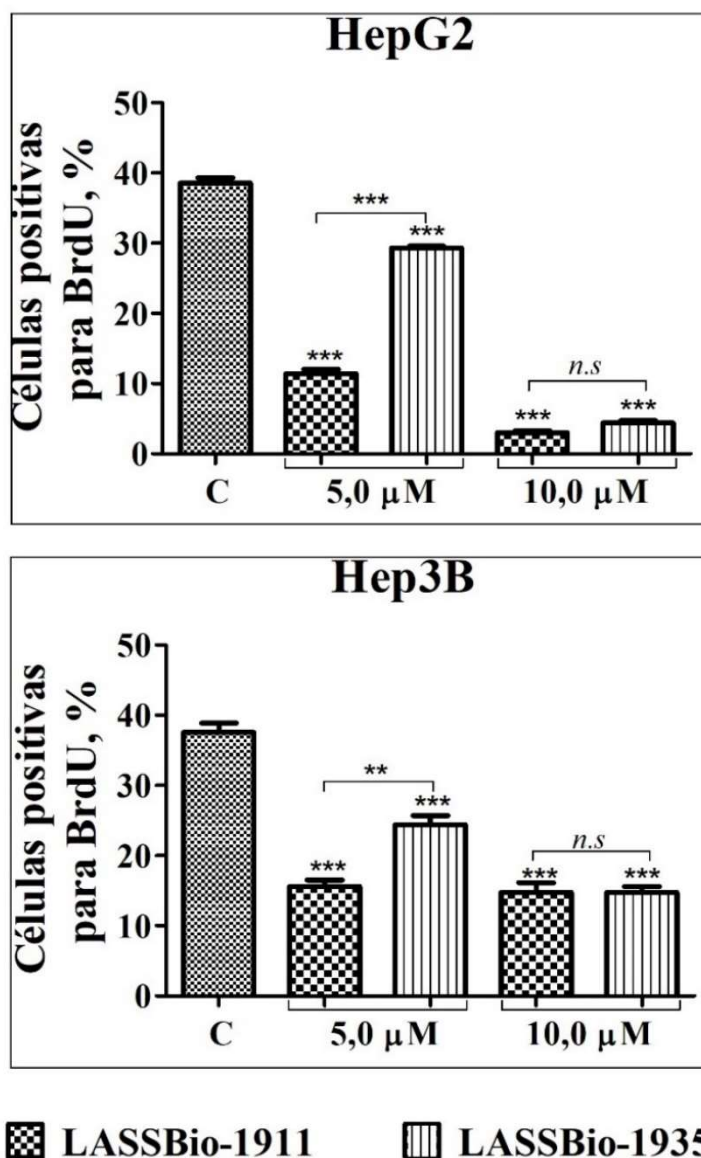
Figura 7 - Aspecto morfológico das culturas de HepG2 e Hep3B tratadas com LASSBio-1911 e 1935.



Fonte: Do autor.

Notas: Imagens ilustrativas obtidas por microscopia de contraste de fase mostrando o aspecto morfológico das culturas de HepG2 e Hep3B tratadas por 48 horas com LASSBio-1911 e 1935 nas concentrações de 5,0 e 10,0 μM . Aumento (60 \times)

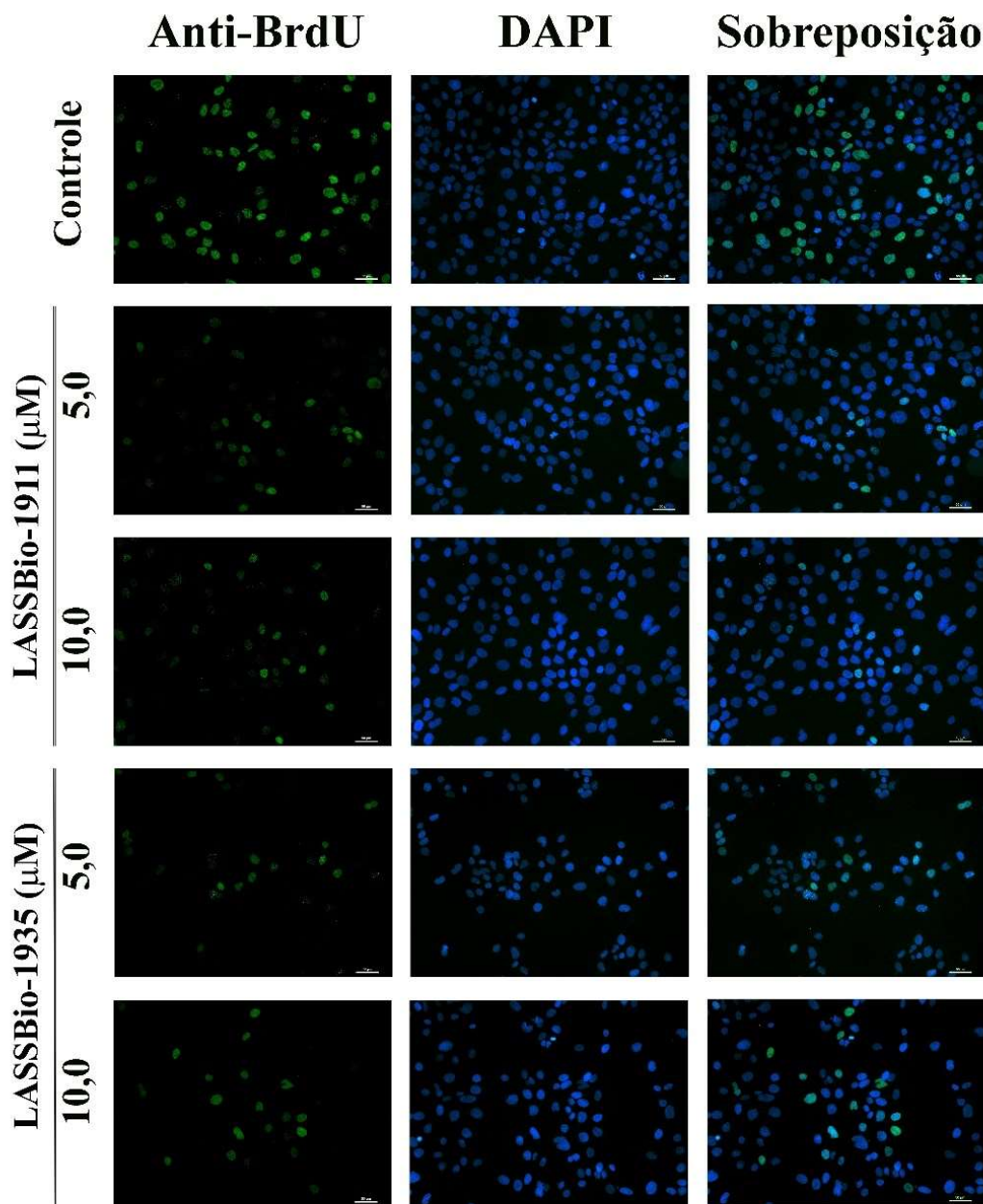
Figura 8 - Ensaio de incorporação de BrdU em linhagens derivadas de CHC tratadas com LASSBio-1911 e 1935.



Fonte: Do autor.

Notas: As culturas de HepG2 e Hep3B foram tratadas com os derivados NAH por 48 horas. Decorrido o tempo de tratamento, foi realizado pulso de BrdU (100 μM) por 1 hora. Em seguida, as amostras foram fixadas, permeabilizadas e marcadas com anti-BrdU/FITC. Os resultados referem-se a média de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. *** p<0,001 e **p<0,01.

Figura 9 - Padrão de marcação para BrdU em culturas de Hep3B após tratamento com LASSBio-1911 e 1935.

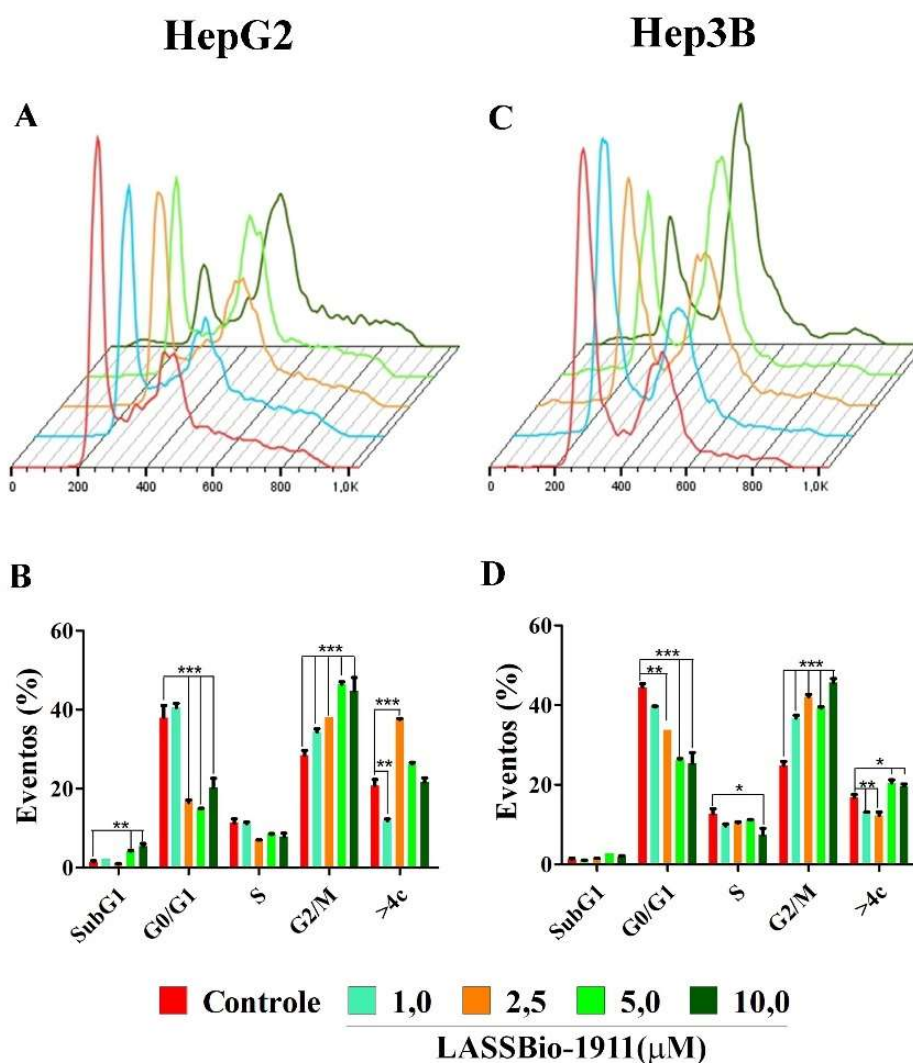


Fonte: Do autor.

Notas: As culturas de Hep3B foram tratadas por 48 horas com LASSBio-1911 e 1935 utilizados nas concentrações de 5,0 e 10,0 μM . Para as preparações imunomarcadas para BrdU, as células foram fixadas e incubadas com anti-BrdU/FITC (verde). Os núcleos foram contra corados com DAPI. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência.

A análise de progressão do ciclo celular foi realizada por citometria de fluxo considerando o conteúdo de DNA por célula. Inicialmente, nós tratamos as linhagens HepG2 e Hep3B com **LASSBio-1911** e **1935** nas concentrações de 1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 μM por 48 horas e observamos que o tratamento com **LASSBio-1911** alterou a distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular em ambas as linhagens avaliadas (Figura 10). Na linhagem HepG2, **LASSBio-1911**, nas concentrações de 1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 μM , reduziu a frequência de células em G0/G1 e aumentou a população de células em G2/M, em um mecanismo dependente da concentração. O mesmo perfil de distribuição das populações celulares foi observado quando culturas de Hep3B foram tratadas com **LASSBio-1911** nas mesmas concentrações. O acúmulo de células em G2/M após tratamento com **LASSBio-1911** constitui um indicativo de bloqueio da transição G2/M ou durante a fase M. Além disso, nós observamos aumento da frequência de células em Sub-G1 em culturas tratadas com **LASSBio-1911** nas concentrações de 5,0 e 10,0 μM . A população A população Sub-G1 é constituída por células com DNA fragmentado e indica que o tratamento induziu morte celular. Curiosamente, nós não observamos bloqueio do ciclo celular em culturas de HepG2 tratadas com **LASSBio-1935**. Já na linhagem Hep3B, o tratamento com a referida substância quando utilizada na concentração de 10,0 μM , induziu aumento pouco expressivo de células em G2/M. A figura 10 mostra que houve aumento na frequência de células em Sub-G1 nas culturas tratadas com **LASSBio-1935** (Figura 11).

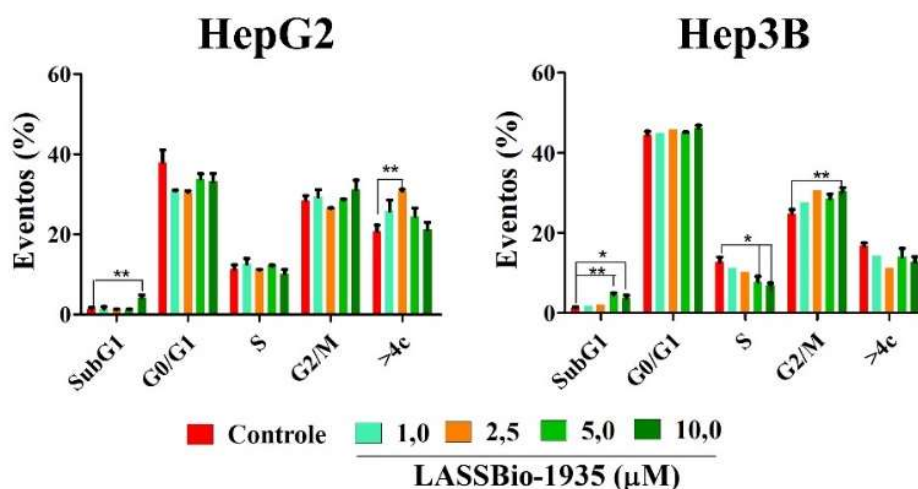
Figura 10 - Análises de ciclo celular em culturas de HepG2 e Hep3B tratadas com LASSBio-1911.



Fonte: Do autor.

Notas: As culturas de HepG2 e Hep3B foram tratadas por 48 horas com LASSBio-1911 nas concentrações de 1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 μM. Em A e C podem ser visualizados os histogramas obtidos por citometria de fluxo. Em B e D podem ser visualizadas as quantificações das populações de células nas diferentes fases do ciclo, em culturas de HepG2 e Hep3B, respectivamente. Os resultados referem-se a média de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. *** p<0,001 e **p<0,01.

Figura 11 - Análises de ciclo celular em culturas de HepG2 e Hep3B tratadas com LASSBio-1935.

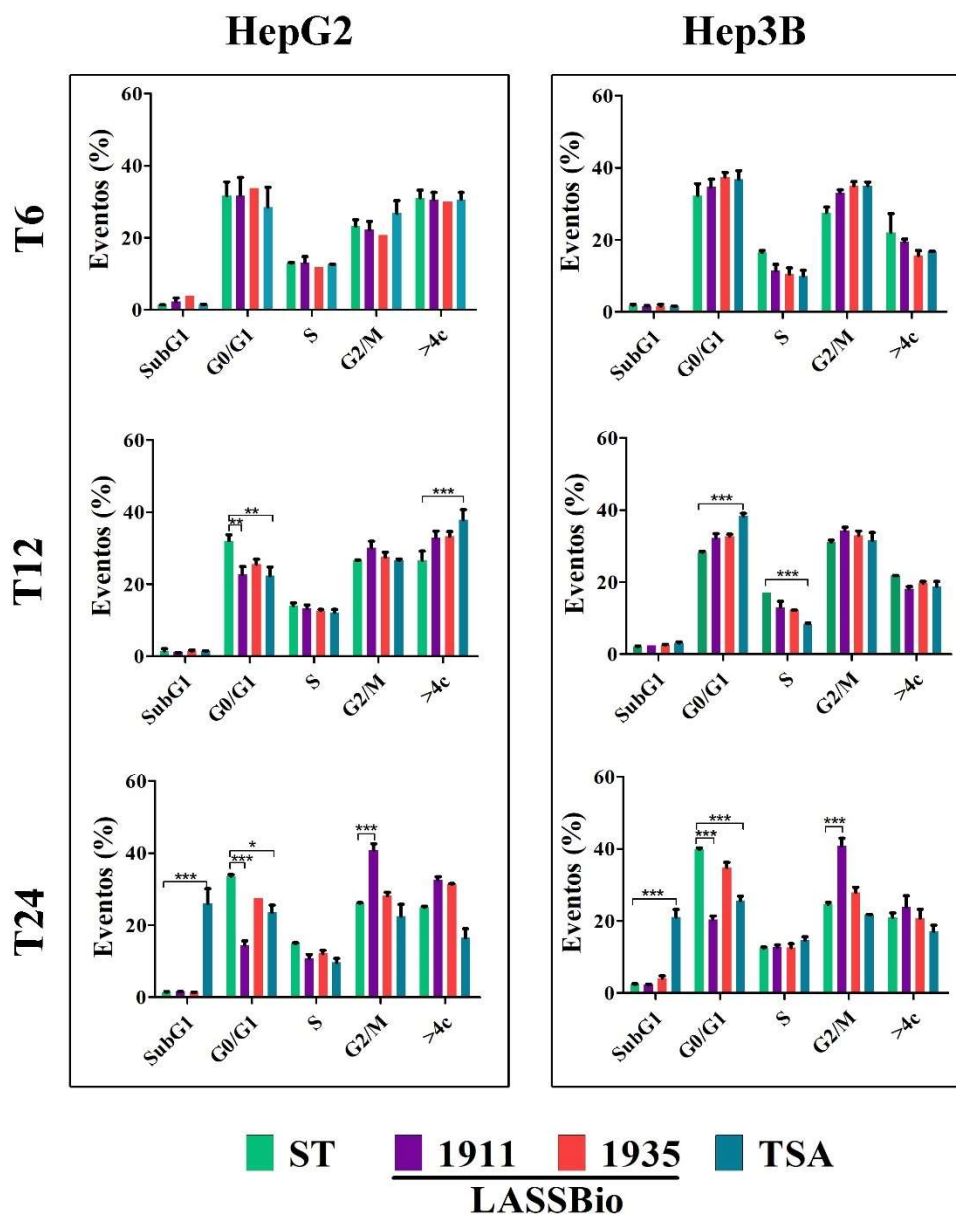


Fonte: Do autor.

Notas: As culturas de HepG2 e Hep3B foram tratadas por 48 horas com LASSBio-1935 nas concentrações de 1,0, 2,5, 5,0 e 10,0 µM. Os resultados referem-se a média de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. **p<0,01 e *p<0,05.

Considerando os dados anteriores, nós realizamos um novo ensaio para avaliar se o tratamento com as substâncias LASSBio-1911 e 1935 afetaria a progressão pelo ciclo celular em tempos de exposição inferiores a 48 horas. Para esta abordagem, nós tratamos as linhagens com essas substâncias na concentração de 5,0 µM. Nesta abordagem, os efeitos das substâncias avaliadas foram comparados aos efeitos induzidos por TSA. A figura 12 mostra que houve aumento na frequência de células em G2/M nos grupos tratados por 24 horas com LASSBio-1911, na concentração de 5,0 µM, em ambas as linhagens, indicando que o efeito citostático de LASSBio-1911 está associado à alterações na dinâmica de progressão do ciclo celular em linhagens derivadas de CHC. Por conseguinte, o tratamento com LASSBio-1935 não alterou a distribuição de células nas diferentes fases do ciclo celular, reforçando a ideia de que essa substância, nas condições experimentais avaliadas, não altera os mecanismos que regulam a progressão do ciclo celular nas linhagens HepG2 e Hep3B. Além disso, nós observamos que o tratamento com TSA na concentração de 1,0 µM foi capaz de induzir aumento nas populações hipertetraploide e G0/G1 nas linhagens HepG2 e Hep3B, respectivamente, após 12 horas de exposição. Com 24 horas de tratamento, TSA foi altamente citotóxico em ambas as linhagens avaliadas, como demonstrado pelo grande aumento na frequência de células em Sub-G1.

Figura 12 - Análises de ciclo celular em culturas de HepG2 e Hep3B tratadas com LASSBio-1911, 1935 e TSA.



Fonte: Do autor.

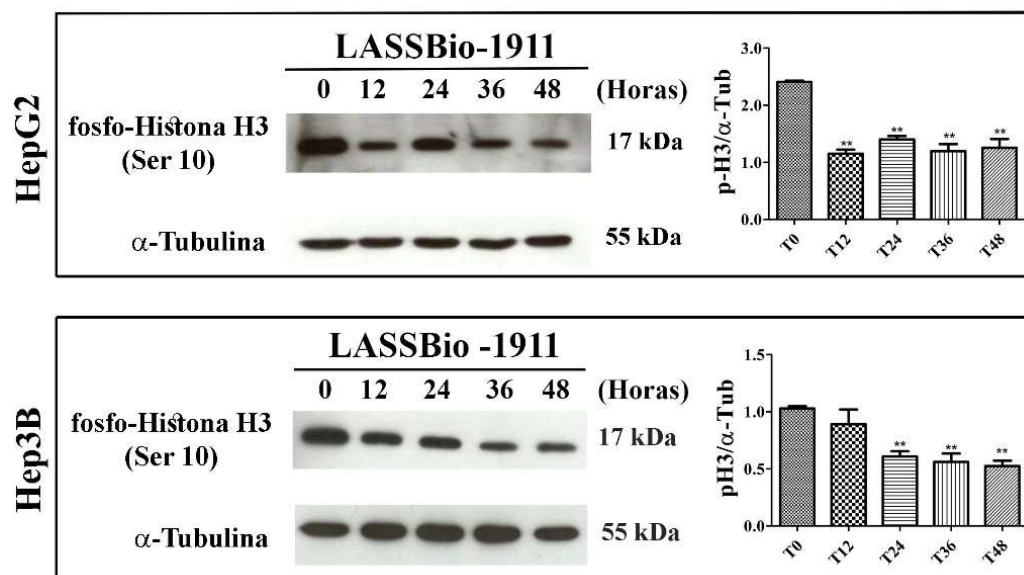
Notas: As culturas de HepG2 e Hep3B foram tratadas com **LASSBio-1911** e **1935** utilizados na concentração de 5,0 μ M. TSA foi utilizado na concentração de 1,0 μ M. As análises de ciclo celular foram realizadas após 6, 12 e 24 horas de exposição aos tratamentos. Os resultados referem-se a média de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. ***p<0,001, **p<0,01 e *p<0,05.

Os resultados obtidos por meio das análises de ciclo celular mostraram divergências importantes relacionadas a capacidade antiproliferativa de **LASSBio-1911** e **1935** frente as culturas de HepG2 e Hep3B. O bloqueio G2/M ocasionado por **LASSBio-1911**, mesmo quando utilizado em concentrações subtóxicas, não foi observado após tratamento com **LASSBio-1935**. Esses resultados motivaram novas

investigações para avaliar os mecanismos moleculares associados à capacidade de **LASSBio-1911** em inibir a progressão do ciclo celular nessa fase específica. Assim sendo, nós realizamos ensaios subsequentes para determinar se o bloqueio do ciclo celular ocasionado pelo tratamento com **LASSBio-1911** ocorreu durante a transição de G2 para M ou na fase M.

Nós verificamos o perfil de fosforilação de histona H3 nos resíduos de serina 10, pois este evento constitui um marcador específico de entrada na mitose. Para esta abordagem, nós tratamos as linhagens HepG2 e Hep3B com **LASSBio-1911** na concentração de 5,0 μM e avaliamos, por *immunoblot*, os níveis de fosforilação nos resíduos de Ser10 da histona H3 após 12, 24, 36 e 48 horas de tratamento. Os resultados mostraram que houve redução dos níveis de fosfo-histona H3 (ser10) na linhagem HepG2 ao longo do período avaliado. Contudo, na linhagem Hep3B, esse evento foi observado somente após 24 h de tratamento (figura 13). Os dados aqui apresentados indicam que o tratamento com **LASSBio-1911** retardou a entrada na mitose e, portanto, alterou os mecanismos regulatórios da transição de G2/M nas linhagens derivadas de CHC.

Figura 13 - Análise do perfil de fosforilação de H3 (ser10) em culturas de HepG2 e Hep3B após tratamento com **LASSBio-1911**.



Fonte: Do autor.

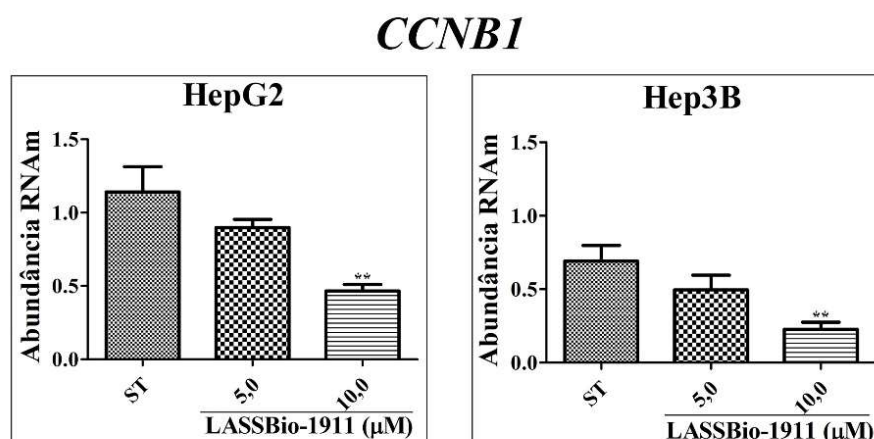
Notas: As culturas de HepG2 e Hep3B foram tratadas com **LASSBio-1911** utilizado na concentração de 5,0 μM e os níveis de fosforilação de Histona H3 (ser10) foram avaliados após 12, 24, 36 e 48 horas de exposição ao tratamento por *immunoblot*. Os resultados referem-se a média de 3 experimentos independentes. **p<0,01.

5.2 O TRATAMENTO COM **LASSBIO-1911** AFETOU A EXPRESSÃO E ATIVAÇÃO DE REGULADORES CRÍTICOS DA FASE G2/M EM LINHAGENS DERIVADAS DE CHC

Visto que o tratamento com **LASSBio-1911** foi capaz de induzir bloqueio em G2/M, além de reduzir os níveis de fosforilação da Histona H3 (Ser10), nós investigamos o perfil de expressão de reguladores da transição G2/M e início da fase M como os genes *CCNB1* (ciclina B1), *CDK1* (CDK1), *CDKN1A* (p21), *WEE1* (Wee1), *CDC25* (CDC25C), *PLK1* (Polo-Like 1), *AURKA* (aurora A) e *AURKB* (aurora B). Além disso, os níveis proteicos de ciclina B1 e fosforilação de ERK (Tyr204) também foram avaliados.

Considerando que a formação e ativação dos complexos CDK1/CiclinaB1 são críticos para a transição de G2 para M, nós avaliamos a influência de **LASSBio-1911** sobre a expressão de ciclina B1 (componente regulatório dos complexos CDK1/CiclinaB1), em diferentes níveis. Para avaliar os níveis de expressão do gene *CCNB1*, que codifica para a ciclina B1, nós tratamos as linhagens HepG2 e Hep3B por 24 horas e as análises de expressão em nível de RNAm foram realizadas por qPCR. Os resultados mostraram que o tratamento com **LASSBio-1911**, nas concentrações de 5,0 e 10,0 μM , reduziu a abundância relativa de RNAm de *CCNB1* nos grupos tratados, em ambas as linhagens, em comparação ao grupo controle. Contudo, diferenças significativas foram observadas somente nos grupos tratados com 10,0 μM indicando que o efeito é dependente da concentração utilizada (Figura 14).

Figura 14 - Análise da abundância de RNAm de *CCNB1* em culturas de HepG2 e Hep3B após tratamento com **LASSBio-1911**.

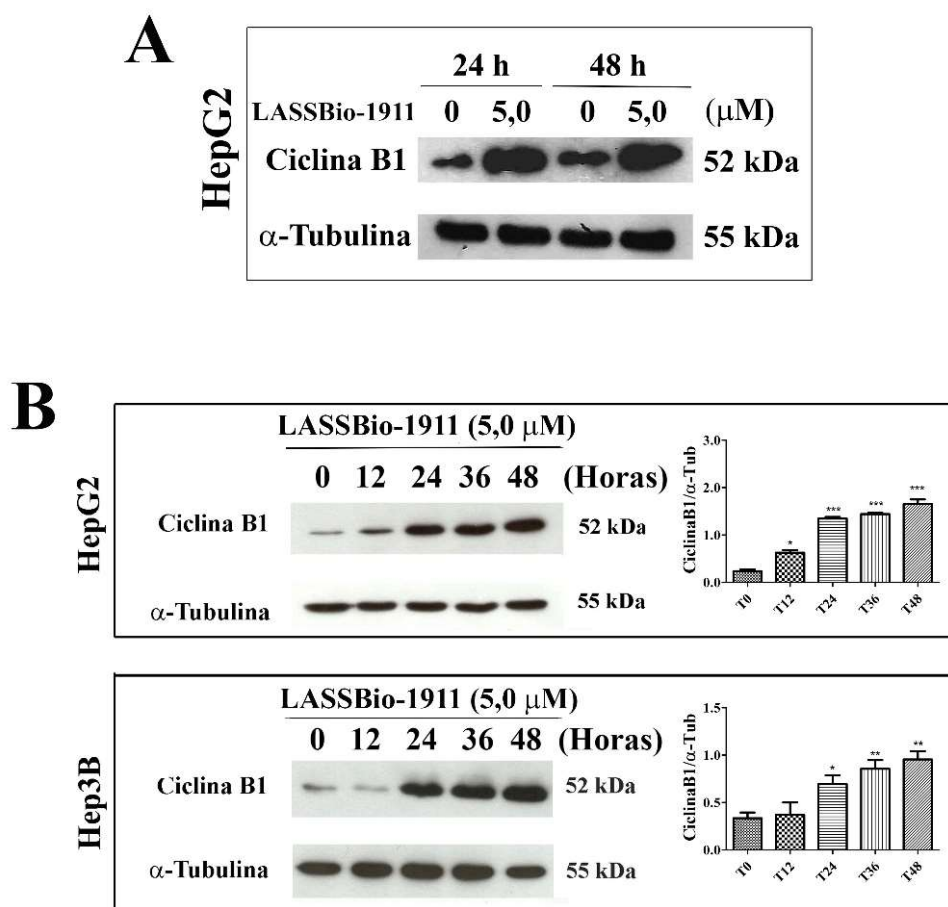


Fonte: Do autor.

Notas: As culturas de HepG2 e Hep3B foram tratadas com **LASSBio-1911** nas concentrações de 5,0 e 10,0 μM e os níveis de expressão de RNAm de *CCNB1* (ciclina B1) foram avaliados após 24 horas de exposição ao tratamento por qPCR. Os resultados referem-se a média de 4 experimentos independentes realizados em triplicata. ** $p < 0,01$.

Para investigar a influência de **LASSBio-1911** sobre o perfil de expressão proteica da ciclina B1, inicialmente, nós tratamos a linhagem HepG2 com **LASSBio-1911** na concentração de 5,0 μM e avaliamos os níveis de ciclina B1 após 24 e 48 horas de exposição. Em oposição aos dados obtidos por qPCR, que demonstraram redução da abundância de RNAm do gene *CCNB1*, nós observamos aumento na intensidade das bandas imunorreativas para ciclina B1 nos grupos tratados por 24 e 48 horas em comparação aos controles (Figura 15A). Posteriormente, nós avaliamos os níveis proteicos de ciclina B1 após tratamento com **LASSBio-1911** pelo período de 12, 24, 36 e 48 horas. Na linhagem HepG2, os níveis de expressão de ciclina B1 foram 6 vezes maiores no grupo tratado por 24 horas em comparação ao grupo controle (Figura 16B). Na linhagem Hep3B, os níveis de ciclina B1 foram 3,09 vezes maiores nos grupos tratados por 24 horas (Figura 15B). Em ambas as linhagens, nós observamos aumento das bandas imunorreativas para ciclina B1 em um mecanismo dependente do tempo de tratamento avaliado. Vale ressaltar que o aumento de ciclina B1 ocorreu simultaneamente à redução dos níveis de fosforilação dos resíduos de serina 10 da histona H3, indicando que nestas condições experimentais, o aumento observado pode ter sido decorrente do acúmulo de ciclina B.

Figura 15 - Análise dos níveis de ciclina B1 em culturas de HepG2 e Hep3B após tratamento com LASSBio-1911.

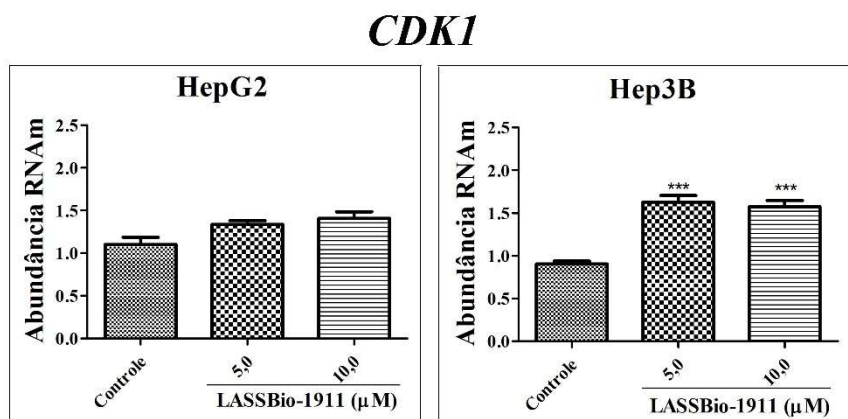


Fonte: Do autor.

Notas: As culturas de HepG2 e Hep3B foram tratadas com LASSBio-1911 (5,0 μM) e os níveis de ciclina B1 foram avaliados por *immunoblot*. (A) Os resultados evidenciaram aumento das bandas imunorreativas para ciclina B1 nas culturas tratadas por 24 e 48 horas com LASSBio-1911. (B) Aumento das bandas imunorreativas para ciclina B1 em um mecanismo dependente do tempo de tratamento avaliado, em ambas as linhagens. Os resultados referem-se a média de 3 experimentos independentes. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

Nós também avaliamos a influência do tratamento com LASSBio-1911 sobre o perfil de expressão do gene *CDK1*, que codifica a subunidade catalítica do complexo CDK1/CiclinaB1. Houve aumento dos níveis de RNAm de *CDK1* em culturas de Hep3B após tratamento por 24 horas com LASSBio-1911, em ambas as concentrações (Figura 16).

Figura 16 - Análise da abundância de RNAm de *CDK1* em culturas de HepG2 e Hep3B após tratamento com **LASSBio-1911**.

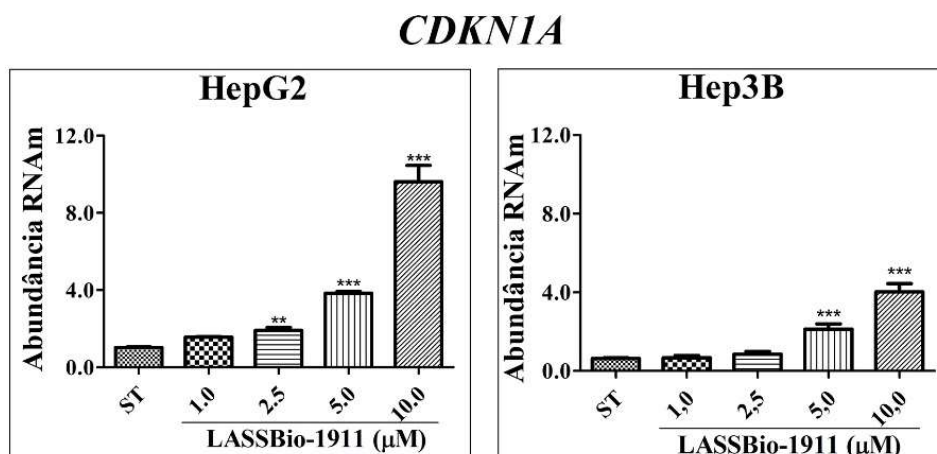


Fonte: Do autor.

Notas: As culturas de HepG2 e Hep3B foram tratadas com **LASSBio-1911** nas concentrações de 5,0 e 10,0 μM e os níveis de expressão de RNAm de *CDK1* (CDK1) foram avaliados após 24 horas de exposição ao tratamento por qPCR. Os resultados referem-se a média de 4 experimentos independentes realizados em triplicata. **p<0,01.

Uma vez que a ativação dos complexos CDK1/CiclinaB1 é altamente regulada por diferentes mecanismos, nós avaliamos a expressão dos genes *CDKN1A*, *WEE1* e *CDC25* que codificam para a proteína p21, a cinase Wee1 e a fosfatase CDC25C, respectivamente. Para verificar a expressão do gene *CDKN1A*, nós tratamos as linhagens HepG2 e Hep3B com **LASSBio-1911** em diferentes concentrações (1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 μM) por 24 horas e os níveis de RNAm foram avaliados por qPCR. A figura 17 mostra que, na linhagem HepG2, a abundância de RNAm de *CDKN1A* aumentou em cerca de 4 e 9 vezes nos grupos tratados com **LASSBio-1911** nas concentrações de 5,0 e 10,0 μM, respectivamente, quando comparados ao grupo controle. Na linhagem de Hep3B, nós observamos que os níveis de *CDKN1A* foram aproximadamente 3 e 6 vezes maiores nos grupos tratados com **LASSBio-1911** nas concentrações de 5,0 e 10,0 μM, respectivamente. Em ambas as linhagens, o tratamento com **LASSBio-1911** induziu aumento nos níveis de expressão de *CDKN1A* em um mecanismo dependente da concentração utilizada.

Figura 17 - Análise da abundância de RNAm de *CDKN1A* em culturas de HepG2 e Hep3B após tratamento com **LASSBio-1911**.



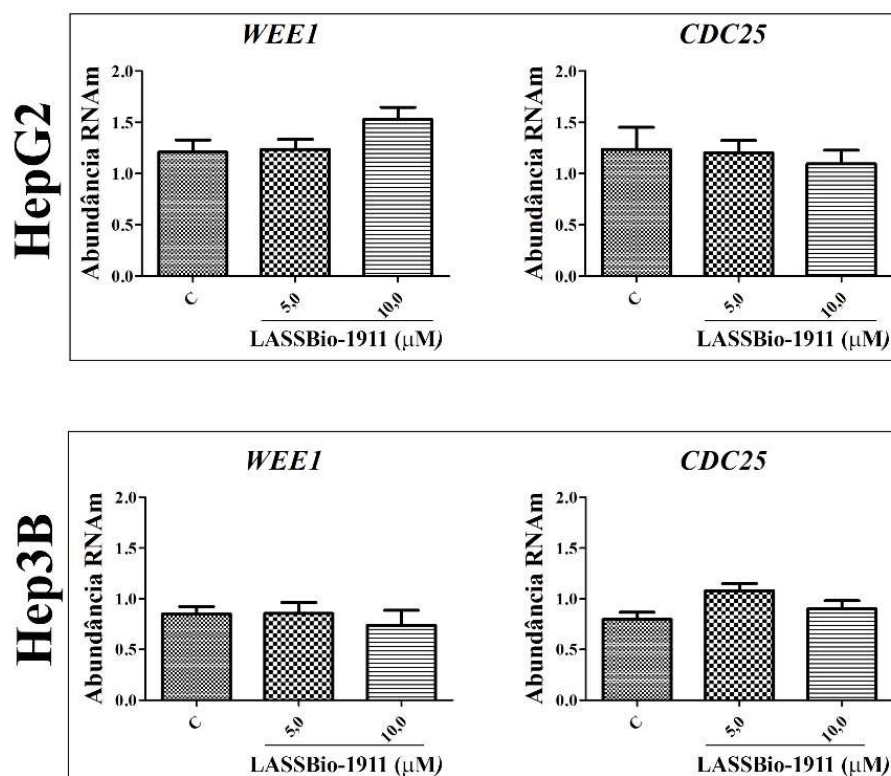
Fonte: Do autor.

Notas: As culturas de HepG2 e Hep3B foram tratadas com **LASSBio-1911** nas concentrações de 1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 µM e os níveis de expressão de RNAm de *CDKN1A* (p21) foram avaliados após 24 horas de exposição ao tratamento por qPCR. Os resultados referem-se a média de 4 experimentos independentes realizados em triplicata. ***p<0,001 e **p<0,01.

Os níveis de expressão dos genes *WEE1* e *CDC25* foram avaliados nas linhagens HepG2 e Hep3B após 24 horas de tratamento com **LASSBio-1911**. De acordo com os dados obtidos, não houve alterações significativas na expressão relativa dos referido genes nas condições experimentais avaliadas (Figura 18).

Posteriormente, os níveis de expressão dos genes *PLK1*, *AURKA* e *AURKB* foram investigados, os quais codificam para as cinases PLK1 e as auroras A e B. A atividade dessas proteínas cinases é extremamente importante para orquestrar os eventos da fase M. As culturas HepG2 e Hep3B foram tratadas com **LASSBio-1911** nas concentrações de 5,0 e 10,0 µM por 24 horas. Os dados de qPCR são mostrados na figura 19. Na linhagem HepG2, o tratamento não alterou a abundância de RNAm de *PLK1*, *AURKA* e *AURKB*. No entanto, na linhagem Hep3B, **LASSBio-1911** induziu aumento nos níveis de expressão de *AURKA* e *AURKB*.

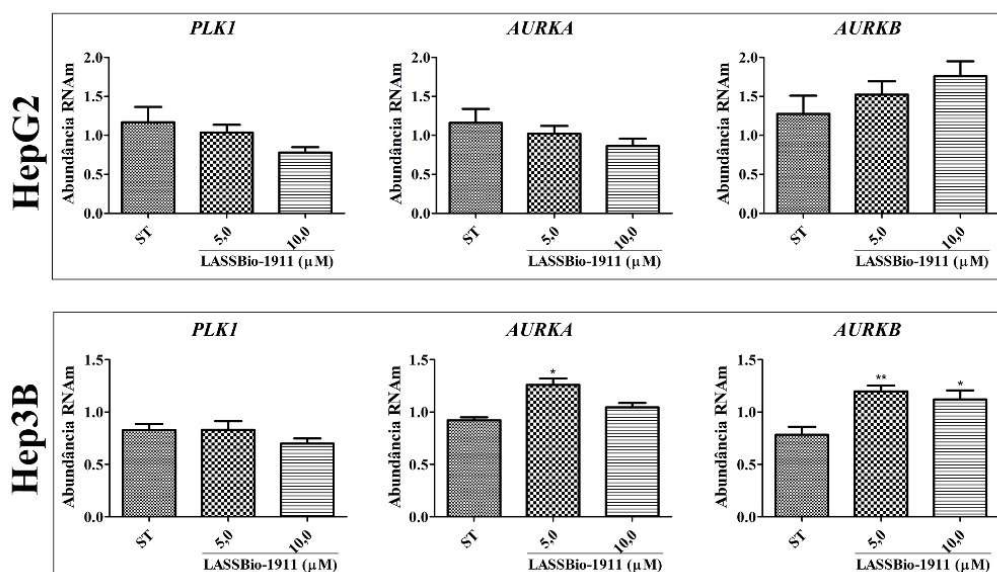
Figura 18 - Análise da abundância de RNAm de *WEE1* e *CDC25* em culturas de HepG2 e Hep3B após tratamento com **LASSBio-1911**.



Fonte: Do autor.

Notas: As culturas de HepG2 e Hep3B foram tratadas com **LASSBio-1911** nas concentrações de 5,0 e 10,0 μM e os níveis de expressão de RNAm dos genes *WEE1* e *CDC25* foram avaliados após 24 horas de exposição ao tratamento por qPCR. Os resultados referem-se a média de 4 experimentos independentes realizados em triplicata.

Figura 19 - Análise da abundância de RNAm de *PLK1*, *AURKA* e *AURKB* em culturas de HepG2 e Hep3B após tratamento com **LASSBio-1911**.



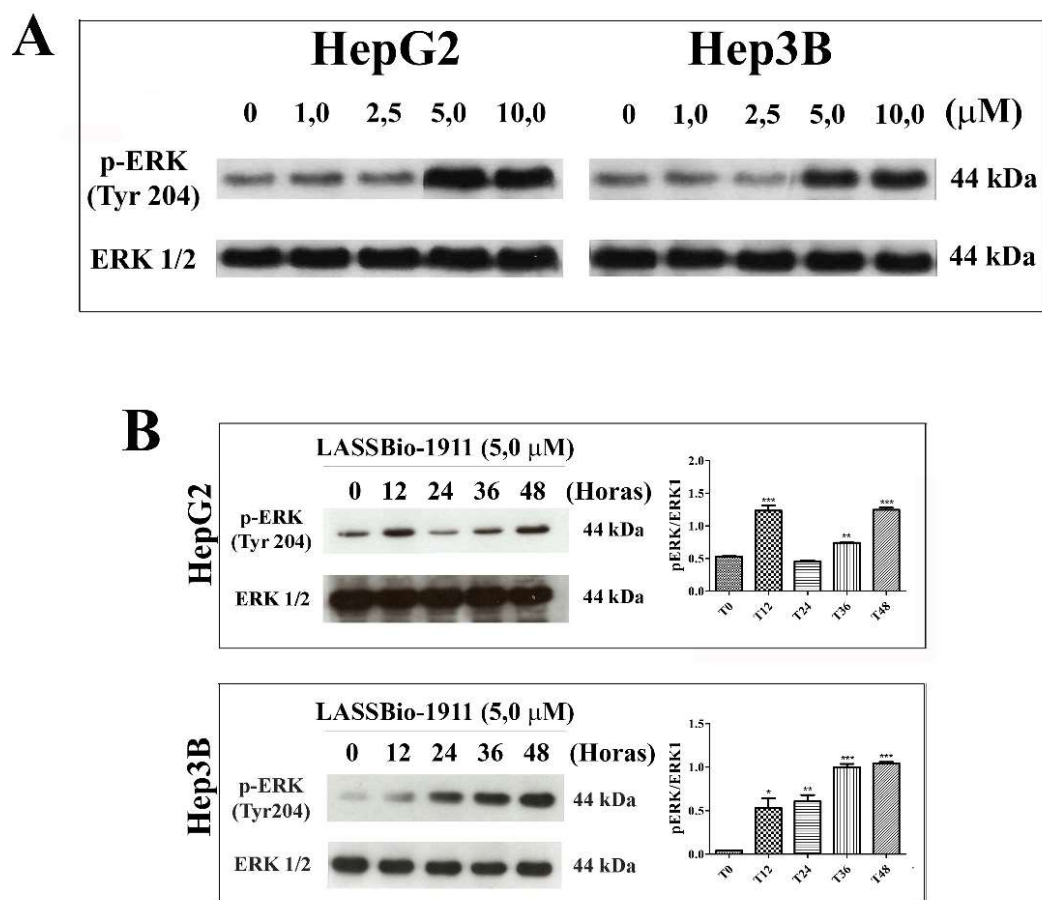
Fonte: Do autor.

Notas: As culturas de HepG2 e Hep3B foram tratadas com **LASSBio-1911** nas concentrações de 5,0 e 10,0 μM e os níveis de expressão de RNAm dos genes *PLK1*, *AURKA* e *AURKB* foram avaliados após 24 horas de exposição ao tratamento por qPCR. Os resultados referem-se a média de 4 experimentos independentes realizados em triplicata. ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

5.3 O TRATAMENTO COM **LASSBIO-1911** ALTEROU OS NÍVEIS DE ATIVAÇÃO DE ERK1/2 EM LINHAGENS DERIVADAS DE CHC

A via RAS/RAF/MEK/ERK, comumente alterada no CHC, exerce papel importante na regulação de processos celulares que afetam a proliferação, diferenciação e morte celular. Para determinar se a via das MAP cinases está envolvida na redução da proliferação e indução de apoptose em resposta ao tratamento com **LASSBio-1911** nas linhagens provenientes de CHC, nós avaliamos o perfil de expressão de ERK fosforilada e de ERK total por *immunoblot*. Nós tratamos as linhagens HepG2 e Hep3B, inicialmente, com **LASSBio-1911** em diferentes concentrações (1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 μM) por 48 horas e observamos que os níveis de fosforilação aumentaram quando as linhagens foram tratadas com **LASSBio-1911** na concentração de 5,0 μM (Figura 20A). Posteriormente, nós tratamos ambas as linhagens com **LASSBio-1911** a 5,0 μM e avaliamos o perfil de ativação de ERK por 12, 24, 36 e 48 horas e observamos que os níveis de fosforilação aumentaram após 24 horas de tratamento em ambas as linhagens (Figura 20B). Os resultados mostraram que **LASSBio-1911** foi capaz de induzir a ativação de ERK em um mecanismo dependente da concentração usada e do tempo de exposição.

Figura 20 - Análise dos níveis de fosforilação de ERK em culturas de HepG2 e Hep3B após tratamento com LASSBio-1911.



Fonte: Do autor.

Notas: As culturas de HepG2 e Hep3B foram tratadas com **LASSBio-1911** e os níveis de fosforilação de ERK foram avaliados por *immunoblot*. (A) As culturas foram tratadas com LASSBio-1911 em diferentes concentrações (1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 μ M) e os resultados evidenciaram aumento das bandas imunorreativas para fosfo-ERK (tyr204), em ambas as linhagens. (B) Os resultados evidenciaram aumento das bandas imunorreativas para fosfo-ERK em um mecanismo dependente do tempo de tratamento avaliado, em ambas as linhagens. Os resultados referem-se a média de 3 experimentos independentes. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

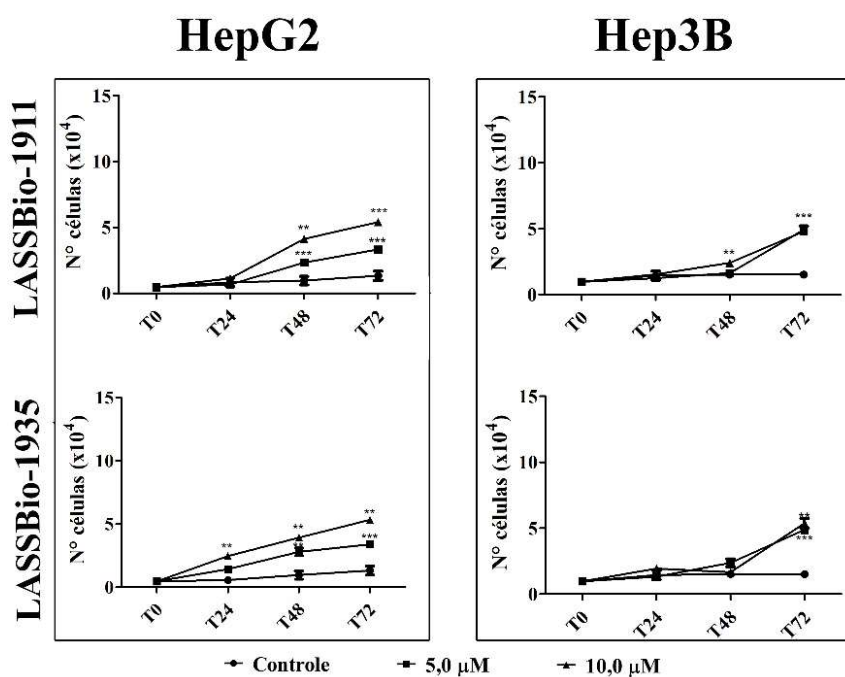
5.4 O TRATAMENTO COM LASSBIO-1911 INDUZIU APOPTOSE EM LINHAGENS DERIVADAS DE CHC

A capacidade das substâncias **LASSBIO-1911** e **LASSBIO-1935** induzir morte celular foi melhor investigada. Nós já havíamos observado, pelos ensaios de citometria de fluxo, aumento significativo da população Sub-G1 em culturas de HepG2 tratadas com **LASSBIO-1911** e **LASSBIO-1935** por 48 horas, e nas culturas Hep3B tratadas com **LASSBIO-1935** por 48 horas quando comparadas aos controles

(Figuras 10 e 11). Os ensaios de exclusão por azul de Trypan também mostraram atividade citotóxica dessas substâncias. Na linhagem HepG2, nós observamos aumento células inviáveis em culturas tratadas com **LASSBio-1911** (após 48 e 72 horas de tratamento) e **LASSBio-1935** (após 24, 48 e 72 horas). Na linhagem Hep3B, o perfil de atividade de **LASSBio-1911** e **1935** foi semelhante e nós observamos aumento da frequência de células inviáveis após 48 e 72 horas de tratamento (Figura 21).

A análise de preparações citológicas fluorescentes marcadas com DAPI e anti- α -tubulina permitiu detectar a presença de células com aspecto morfológico compatível com catástrofe mitótica (Figura 22A) e apoptose (Figuras 22B e C) em culturas de HepG2 tratadas com **LASSBio-1911** por 48 horas (5,0 e 10,0 μ M). A figura 22A exibe células com material genético altamente condensado, semelhante ao nível compactação alcançado na prometáfase e metáfase, contudo sem a distribuição cromossômica característica dessas fases de divisão. Esses eventos foram quantificados e os resultados mostraram que houve aumento na população de células em catástrofe mitótica em culturas tratadas comparadas ao grupo controle. As figuras 22B e C mostram células com blebs e com DNA fragmentado, respectivamente.

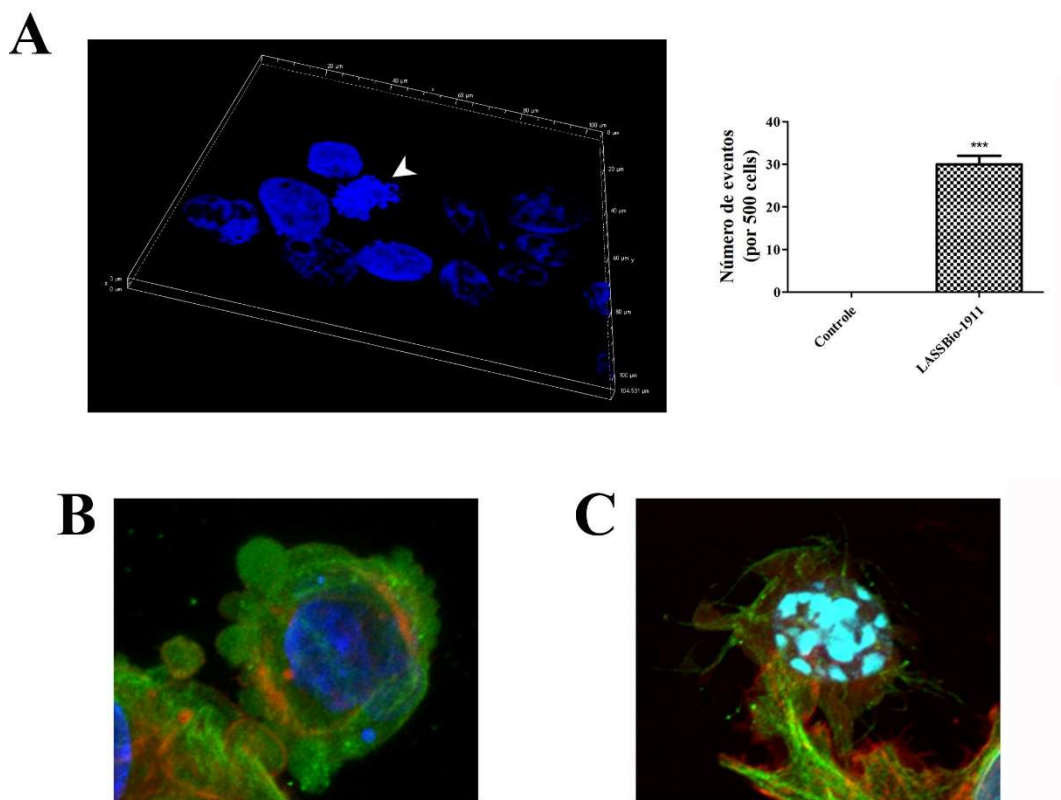
Figura 21 - Populações de células inviáveis em culturas de HepG2 e Hep3B, determinadas por meio do ensaio de exclusão com azul de Trypan.



Fonte: Do autor.

Notas: As culturas foram tratadas por 24, 48 e 72 horas com **LASSBio-1911** e **LASSBio-1935** utilizados nas concentrações de 5,0 e 10,0 μM . Decorrido o tempo de tratamento as células foram quantificadas com o auxílio do corante azul de Trypan. Os resultados referem-se a média de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$.

Figura 22 - Imagens obtidas por microscopia confocal evidenciando células em catástrofe mitótica e apoptose em culturas de HepG2 após tratamento com **LASSBio-1911**.



Fonte: Do autor.

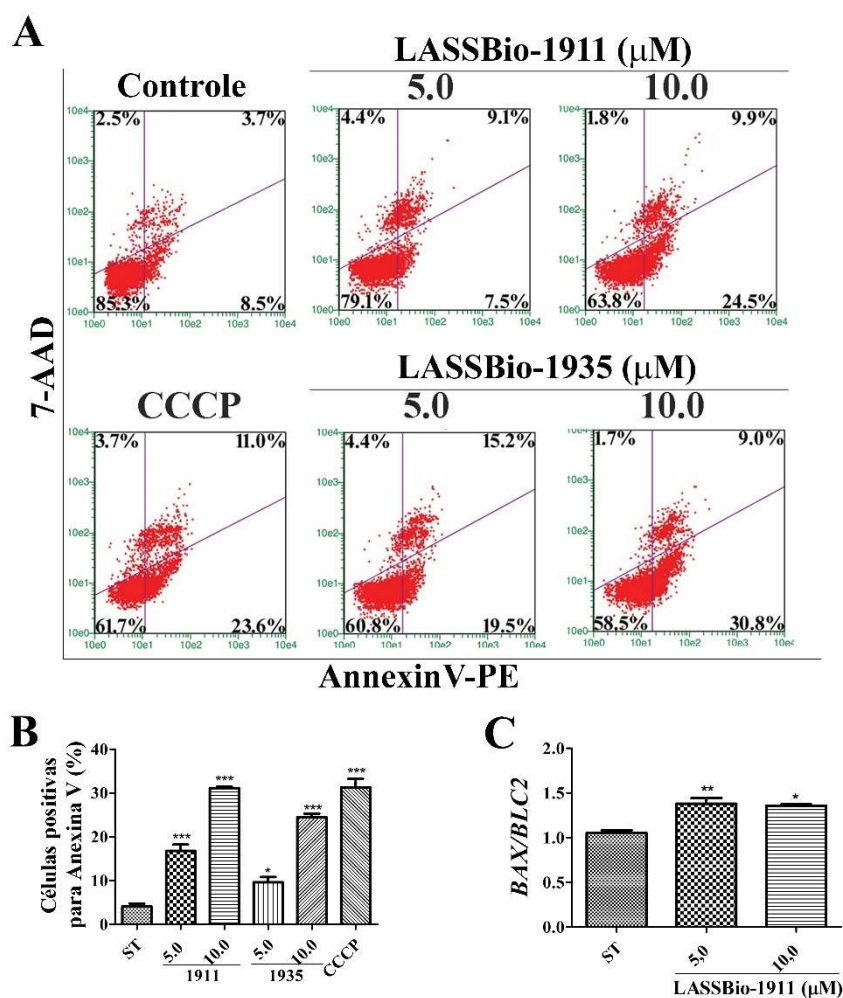
Notas: As preparações citológicas foram realizadas após 48 horas de tratamento das culturas de HepG2 com **LASSBio-1911**. (A) Aumento da frequência de células com aspecto morfológico de catástrofe mitótica (seta branca) e (B) e (C) Células com blebs e DNA fragmentado, respectivamente, eventos associados à apoptose. Os núcleos estão representados em azul (contra coloração com DAPI) e os elementos do citoesqueleto em verde (Tubulina/FITC) e vermelho (F-actina/Rodamina)

Na sequência, nós investigamos o potencial pró-apoptótico dos derivados NAH frente as linhagens HepG2 e Hep3B. O ensaio de AnexinaV-PE/7AAD foi realizado e as análises realizadas por citometria de fluxo para avaliar o perfil de externalização de fosfatidilserina. Além disso, nós avaliamos os níveis de expressão dos genes *BAX* e *BCL2*, que codificam para membros pró e antiapoptóticos da família Bcl-2, respectivamente, por qPCR.

O ensaio de anexina V permite determinar a frequência de células em apoptose (fase inicial e tardia) e de células em necrose. Para esta abordagem, nós tratamos as linhagens HepG2 e Hep3B com **LASSBio-1911** e **1935** nas concentrações de 5,0 e 10,0 μM por 48 horas. CCCP (despolarizador de membrana mitocondrial) foi empregado como controle positivo. Nós observamos aumento significativo na frequência de células positivas para anexina V em culturas de HepG2 tratadas com **LASSBio-1911** e **1935** por 48 horas em comparação ao grupo controle, em um mecanismo dependente da concentração (Figuras 23A e B). A análise do perfil de expressão dos genes *BAX* e *BCL2* foram determinados em culturas HepG2 tratadas com **LASSBio-1911** nas concentrações de 5,0 e 10,0 μM por 24 horas. Os dados mostraram que houve modulação no perfil de expressão desses genes e que o tratamento induziu aumento da razão *BAX/BCL-2* (figura 23C).

As células da linhagem Hep3B foram, inicialmente, tratadas com **LASSBio-1911** nas concentrações de 5,0 e 10,0 μM . Os resultados mostraram que não houve alteração significativa na frequência de células positivas para anexina V após 48 horas de tratamento. Entretanto, nós observamos modulação no perfil de expressão dos genes *BAX* e *BCL2* após 24 horas de tratamento com **LASSBio-1911** nas concentrações de 5,0 e 10,0 μM . Assim, nós aumentamos o período de tratamento para 72 horas e realizamos um novo ensaio de anexina V em culturas de Hep3B. As figuras 24A e B mostram que houve aumento significativo na frequência de células positivas para anexina V após 72 horas de exposição à **LASSBio-1911** em ambas as concentrações avaliadas. Os resultados indicam que a linhagem Hep3B responde mais lentamente aos estímulos apoptóticos em relação a linhagem HepG2. Estes dados corroboram os resultados obtidos pelo ensaio de exclusão com azul de Trypan, uma vez que aumento da frequência de células inviáveis foram observadas em culturas Hep3B somente após 72 horas de tratamento com **LASSBio-1911** e **LASSBio-1935**, ao passo que, nas culturas de HepG2, diferenças significativas nos percentuais de células inviáveis foram observadas a partir de 48 horas de tratamento (Figura 21).

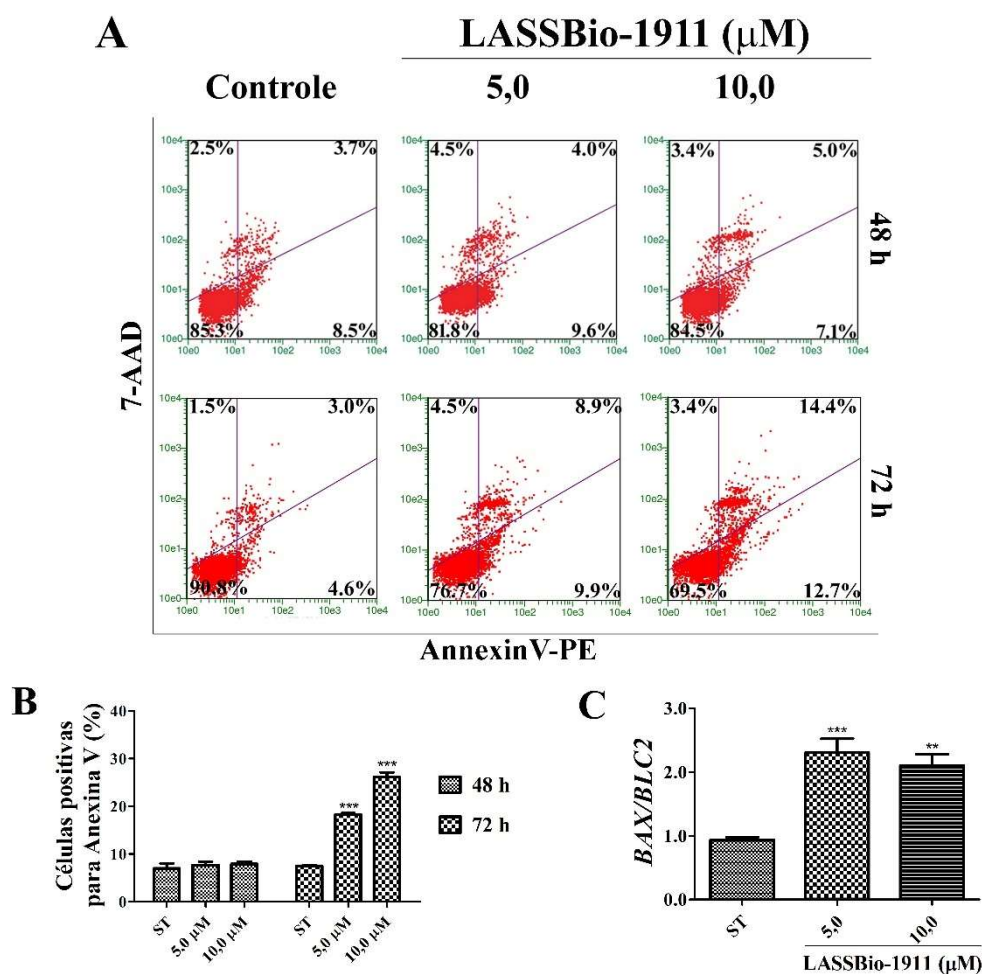
Figura 23 - Potencial pró-apoptótico de LASSBio-1911 e 1935 em culturas de HepG2.



Fonte: Do autor.

Notas: Para a realização do ensaio de anexina V, as culturas de HepG2 foram tratadas com LASSBio-1911 e 1935 (5,0 e 10,0 μM) por 48 horas. (A) Estão representados os *dot plots*, obtidos por citometria de fluxo. Quadrante inferior esquerdo – células viáveis; quadrante inferior direito – células em apoptose inicial; quadrante superior direito – células em apoptose tardia; quadrante superior esquerdo- células em necrose. CCCP foi utilizado com controle positivo. (B) Análise quantitativa. Os resultados referem-se a média de 3 experimentos independentes realizados em duplicata. Para a análise expressão de RNAm de *BAX* e *BCL-2*, as culturas de HepG2 foram tratadas com LASSBio-1911 (5,0 e 10,0 μM) por 24 horas. (C) Análise quantitativa (*BAX/BCL2*). Os resultados referem-se a média de 4 experimentos independentes. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

Figura 24 - Potencial pró-apoptótico de LASSBio-1911 em culturas de Hep3B.



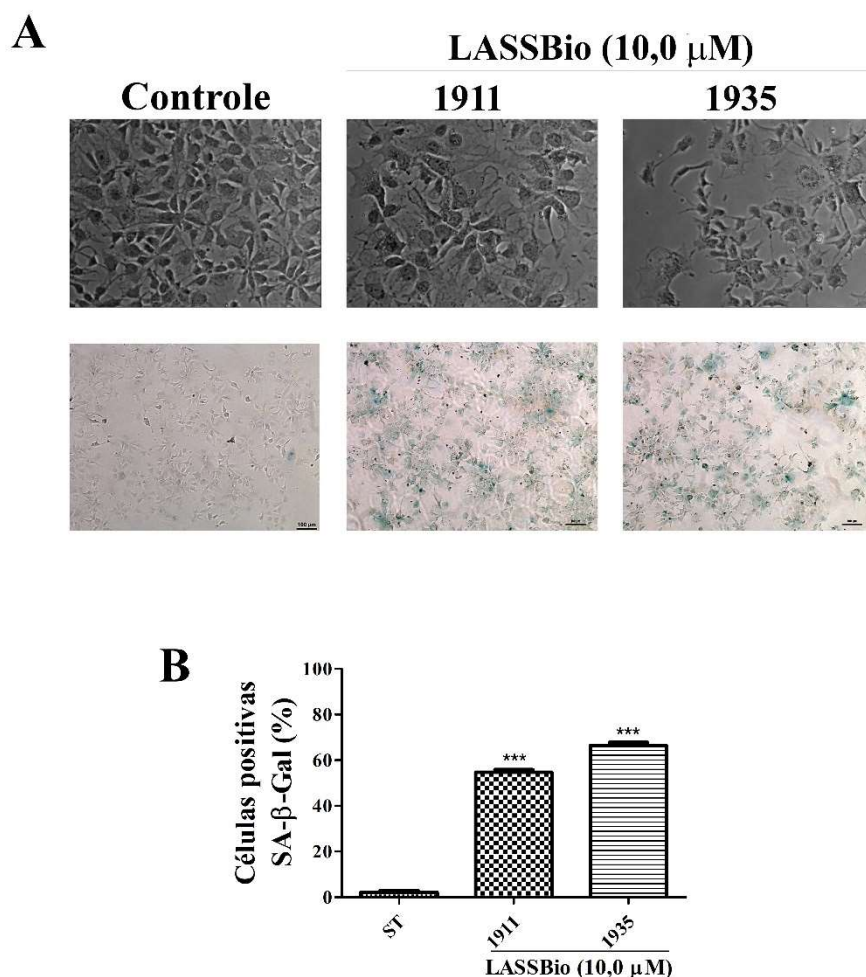
Fonte: Do autor.

Notas: Para a realização do ensaio de anexina V, as culturas de Hep3B foram tratadas com **LASSBio-1911** (5,0 e 10,0 μM) por 48 e 72 horas. (A) Estão representados os *dot plots*, obtidos por citometria de fluxo. Quadrante inferior esquerdo – células viáveis; quadrante inferior direito – células em apoptose inicial; quadrante superior direito – células em apoptose tardia; quadrante superior esquerdo – células em necrose. CCCP foi utilizado com controle positivo. (B) Análise quantitativa. Os resultados referem-se a média de 3 experimentos independentes realizados em duplicata. Para as análises de expressão de RNAm de *BAX* e *BCL-2*, as culturas de Hep3B foram tratadas com **LASSBio-1911** (5,0 e 10,0 μM) por 24 horas. (C) Análise quantitativa (*BAX/BCL2*). Os resultados referem-se a média de 4 experimentos independentes. *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$.

No presente estudo, nós também investigamos se as substâncias testadas induzem senescência na linhagem Hep3G, uma vez que observamos maior resistência dessa linhagem à apoptose e detectamos, nas culturas tratadas, um enriquecimento de células grandes e achatadas, cujas características eram compatíveis com células senescentes. Assim, nós tratamos a linhagem Hep3B com **LASSBio-1911** e **1935** na concentração de 10,0 μM e o ensaio de senescência

associado à atividade de β -galactosidase foi realizado após 48 horas de tratamento. O padrão de marcação para β -galactosidase (células coradas em azul) pode ser observado na figura 25A. Os resultados mostraram aumento significativo de células positivas para β -galactosidase em culturas de Hep3B tratadas com **LASSBio-1911** e **1935** (figura 25B). Nós também avaliamos a capacidade dessas substâncias em induzir senescência na linhagem HepG2, entretanto, não foi possível realizar a quantificação dos eventos, considerando o padrão de crescimento das células HepG2. Estas células crescem formando ilhas, as quais exibem células sobrepostas, o que inviabilizou a análise.

Figura 25 - Ensaio de detecção de β -Galactosidase associada à senescência em culturas de Hep3B tratadas com **LASSBio-1911** e **1935**.



Fonte: Do autor.

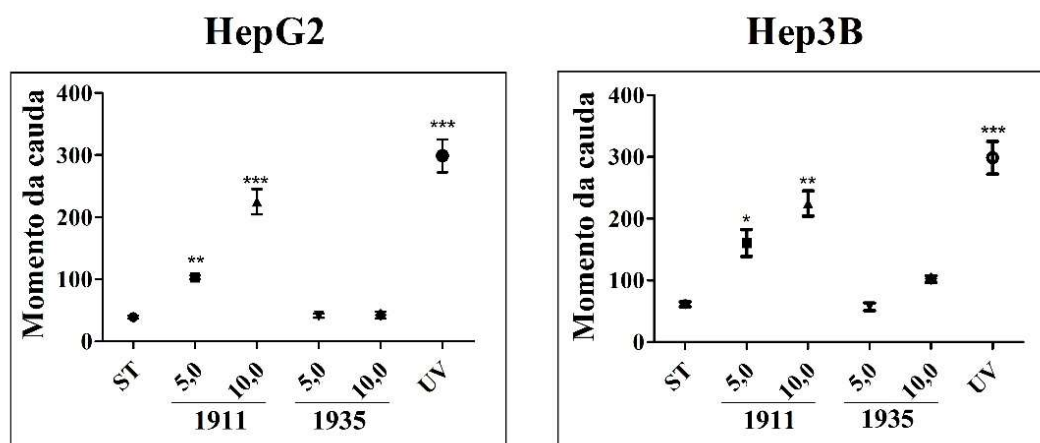
Notas: Para a realização do ensaio de SA- β -Gal, as culturas de Hep3B foram tratadas com **LASSBio-1911** e **1935** (10,0 μ M). Após 48 horas de tratamento as células foram fixadas e incubadas com solução contendo o β -galactosídeo (X-gal). (A) Imagens ilustrativas do ensaio. Acima podem ser visualizadas as imagens de microscopia de contraste de fase evidenciando alterações morfológicas e abaixo, o enriquecimento de células com

marcação positiva para β -galactosidase (azul). (B) Análise quantitativa. Os resultados referem-se a média de 3 experimentos independentes. *** $p < 0,001$.

Para investigar se o bloqueio no ciclo celular e a indução de apoptose estão associados à capacidade de **LASSBio-1911** e **1935** induzir direta ou indiretamente danos ao DNA em linhagens derivadas de CHC, nós realizamos o ensaio de COMETA sob condições alcalinas que permite avaliar o potencial genotóxico de um agente químico em células individualizadas.

Para esta abordagem, nós tratamos as linhagens HepG2 e Hep3B com **LASSBio-1911** e **1935** nas concentrações de 5,0 e 10,0 μM por 24 horas. Amostras irradiadas com luz ultravioleta (UV) por 5 minutos foram utilizadas como controle positivo. A figura 18 mostra que **LASSBio-1911** induziu danos ao DNA nas linhagens HepG2 e Hep3B. Nós observamos aumento na frequência de cometas nas amostras tratadas com **LASSBio-1911**, nas concentrações de 5,0 e 10,0 μM , em relação ao grupo controle. Ao contrário, nas culturas tratadas com **LASSBio-1935** não foram observadas alterações significativas na frequência de cometas em células HepG2 e Hep3B nas condições experimentais avaliadas (Figura 26). A figura 27 mostra imagens fluorescentes das preparações citológicas utilizadas para avaliar os nucleoides em células Hep3B.

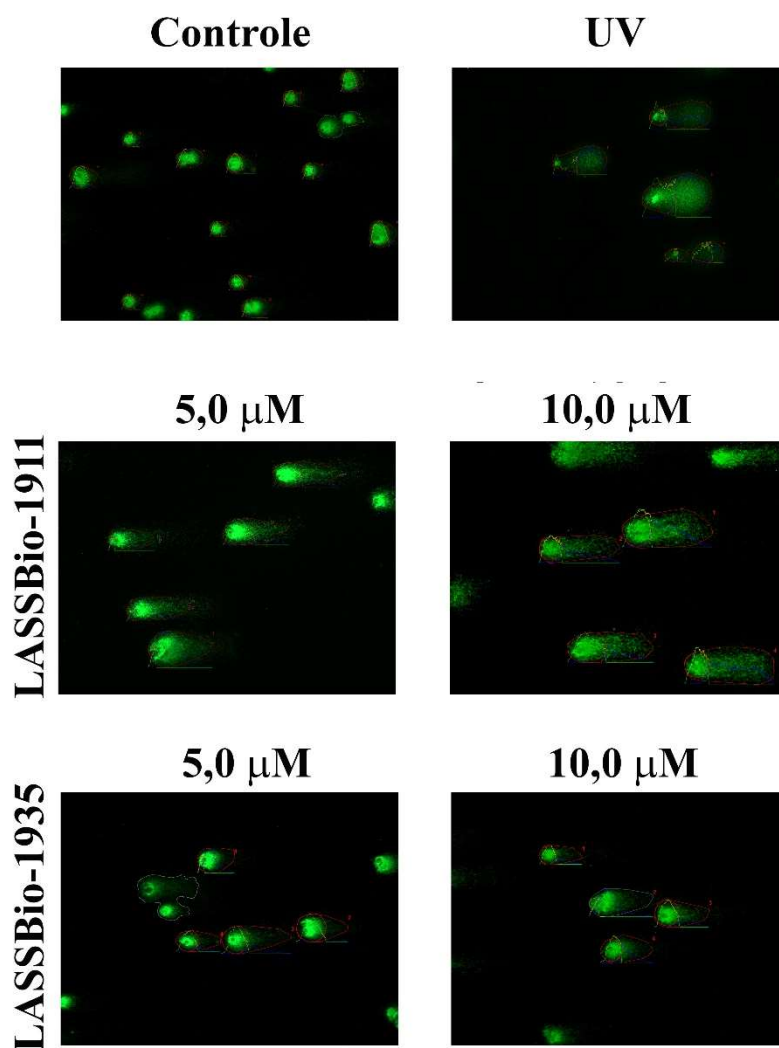
Figura 26 - Ensaio de COMETA em culturas de HepG2 e Hep3B após tratamento com **LASSBio-1911** e **1935**.



Fonte: Do autor.

Notas: As culturas de HepG2 e Hep3B foram tratadas com **LASSBio-1911** e **1935** nas concentrações de 5,0 e 10,0 μM por 24 horas. Amostras irradiadas com UV foram utilizadas como controle positivo. Para a análise foi considerado o momento da cauda que correlaciona a porcentagem de DNA e o comprimento da cauda dos cometas. Foram analisados 50 cometas por lâmina. Os resultados referem-se a média de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

Figura 27 - Imagens fluorescentes evidenciando o perfil de análise dos nucleóides em culturas de Hep3B após tratamento com LASSBio-1911 e 1935.



Fonte: Do autor.

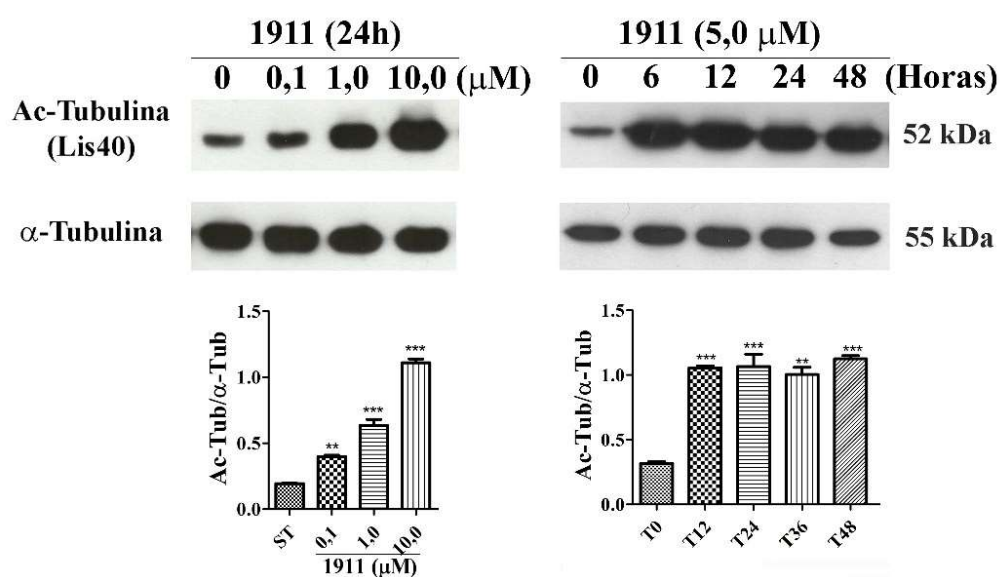
Notas: As culturas de Hep3B foram tratadas com **LASSBio-1911 e 1935** nas concentrações de 5,0 e 10,0 μM por 24 horas. Amostras irradiadas com UV foram utilizadas como controle positivo. As lâminas foram coradas com *Sybr Green* e a análise foi realizado por meio do software *OpenComet/ImageJ*.

Fonte: Do autor.

Notas: As culturas de HepG2 e Hep3B foram tratadas com **LASSBio-1911 e 1935** nas concentrações de 0,1; 1,0 e 10,0 μM e os níveis de acetilação da tubulina foram avaliados após 6 horas de exposição ao tratamento por *immunoblot*. Os resultados referem-se a média de 3 experimentos independentes.

Posteriormente, nós tratamos a linhagem Hep3B com **LASSBio-1911** nas concentrações de 0,1; 1,0 e 10,0 μM por 24 horas e avaliamos o perfil de acetilação da α -tubulina. Os dados mostraram aumento dos níveis de acetilação de α -tubulina em amostras tratadas com 1,0 e 10,0 μM . Diferentemente do que foi observado em amostras tratadas por 6 horas, nós não evidenciamos aumento significativo nos níveis de α -tubulina acetilada em culturas de Hep3B tratadas por 24 horas com **LASSBio-1911** na concentração de 0,1 μM . Os dados indicam que o efeito inibitório de **LASSBio-1911** ocorre por um curto período quando baixas concentrações são utilizadas. Adicionalmente, as culturas de Hep3B foram tratadas com **LASSBio-1911** na concentração de 5,0 μM e os níveis de acetilação da α -tubulina foram avaliados após 6, 12, 24 e 48 horas de tratamento. Nós observamos que os níveis de acetilação permaneceram constantes durante todo o período avaliado, indicando que a inibição da HDAC6 ocasionada por **LASSBio-1911** (5,0 μM) parece não ser revertida (Figura 29).

Figura 29 - Análise do perfil de acetilação da α -Tubulina (lis40) em culturas de Hep3B após tratamento com **LASSBio-1911**.

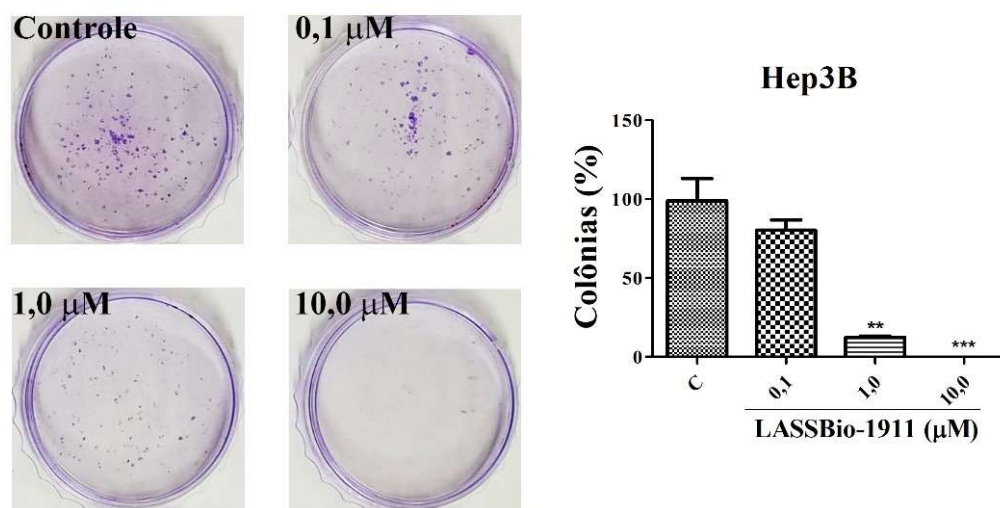


Fonte: Do autor.

Notas: As culturas de Hep3B foram tratadas com **LASSBio-1911** nas concentrações de 0,1; 1,0 e 10,0 μM e os níveis de acetilação da tubulina foram avaliados após 24 horas de exposição ao tratamento por *immunoblot*. Posteriormente, as culturas foram tratadas com 5,0 μM e o perfil de acetilação foi avaliado por 6, 12, 24 e 48 horas. Os resultados referem-se a média de 3 experimentos independentes. *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$.

Com o objetivo de demonstrar que a atividade antiproliferativa de **LASSBio-1911** sobre as linhagens de CHC está associada à inibição de HDAC6, nós realizamos o ensaio clonogênico na linhagem Hep3B. As células foram tratadas por 24 horas com **LASSBio-1911** nas concentrações de 0,1, 1,0 e 10,0 μM e, posteriormente, as culturas foram acompanhadas por 12 dias. Os resultados mostraram que **LASSBio-1911** reduziu eficientemente a capacidade clonogênica na linhagem Hep3B quando as concentrações de 1,0 e 10,0 μM foram utilizadas. Entretanto, **LASSBio-1911** na concentração de 0,1 μM não teve influência sobre a capacidade clonogênica de células Hep3B. A figura 26B mostra que houve redução em cerca de 88% na frequência de colônias formadas em culturas tratadas com **LASSBio-1911** (1,0 μM). Ao passo que nenhuma colônia, com mais de 50 células, foi observada em culturas tratadas com **LASSBio-1911** (10,0 μM) (Figura 30) De forma indireta, os dados indicam que os efeitos dos derivados NAH avaliados sobre o comportamento proliferativo de linhagens de CHC estão associados à inibição de HDAC6.

Figura 30 - Ensaio clonogênico em culturas de Hep3B após tratamento com **LASSBio-1911**.



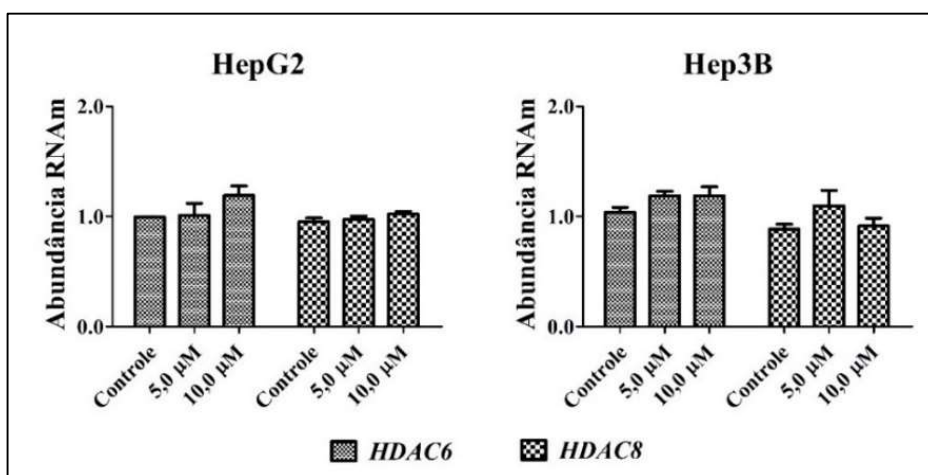
Fonte: Do autor.

Notas: As culturas de Hep3B foram tratadas com **LASSBio-1911** nas concentrações de 0,1; 1,0 e 10,0 μM e após 24 horas, o tratamento foi retirado e as culturas foram mantidas em estufa com meio fresco por 12 dias. À esquerda, podem ser visualizadas imagens ilustrativas das colônias fixadas e coradas com cristal violeta. À direita, análise

quantitativa. Foram consideradas colônias com mais de 50 células. Os resultados referem-se a média de 3 experimentos independentes. *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$.

Em uma etapa subsequente, nós avaliamos os níveis de RNAm das HDACs 6/8 e, como esperado, não houve alterações significativas na abundância de RNAm para as HDACs 6 e 8 em amostras tratadas com **LASSBio-1911** nas concentrações de 5,0 e 10,0 μM (Figura 31). Contudo, considerando que o CT (*cycle threshold*) observado nas amostras controles de HepG2 e Hep3B foi ao redor de 25 e que o CT do gene de referência (*β -actin*) foi ao redor de 15 em ambas as linhagens, nós podemos afirmar que os níveis de expressão de HDACs 6 e 8 são equivalentes nas linhagens HepG2 e Hep3B.

Figura 31 - Análise da abundância de RNAm de *HDAC6* e *HDAC8* em culturas de HepG2 e Hep3B após tratamento com **LASSBio-1911**.



Fonte: Do autor.

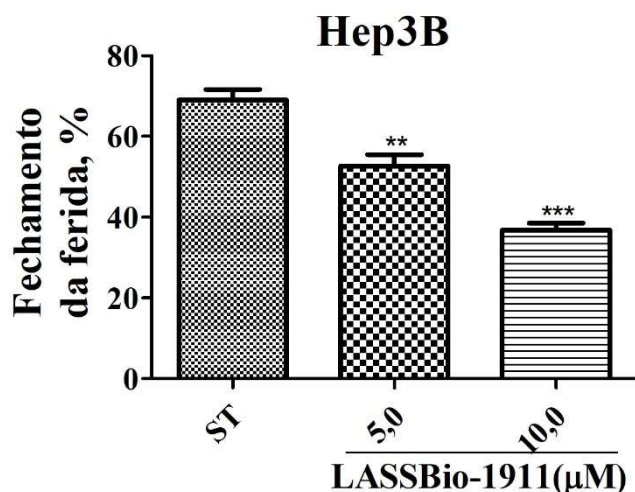
Notas: As culturas de HepG2 e Hep3B foram tratadas com **LASSBio-1911** nas concentrações de 5,0 e 10,0 μM e os níveis de expressão de RNAm dos genes *HDAC6* e *HDAC8* foram avaliados após 24 horas de exposição ao tratamento por qPCR. Os resultados referem-se a média de 4 experimentos independentes realizados em triplicata.

5.6 O TRATAMENTO COM **LASSBIO-1911** INIBIU A MIGRAÇÃO E ALTEROU A DINÂMICA DE POLIMERIZAÇÃO DE MICROTÚBULOS EM CÉLULAS HEP3B

Para avaliar a influência do tratamento com **LASSBio-1911** sobre a migração na linhagem Hep3B, nós realizamos o ensaio de fechamento de ferida. Nesta abordagem experimental, culturas confluentes de Hep3B foram feridas com o auxílio de uma ponteira estéril e, na sequência, foram tratadas com a substância nas

concentrações de 5,0 e 10,0 μM . O processo de migração de células para o local da ferida (%fechamento) foi avaliado por 48 horas. Os resultados mostraram que houve redução da capacidade de migração das células Hep3B após 48 horas de tratamento (Figura 32).

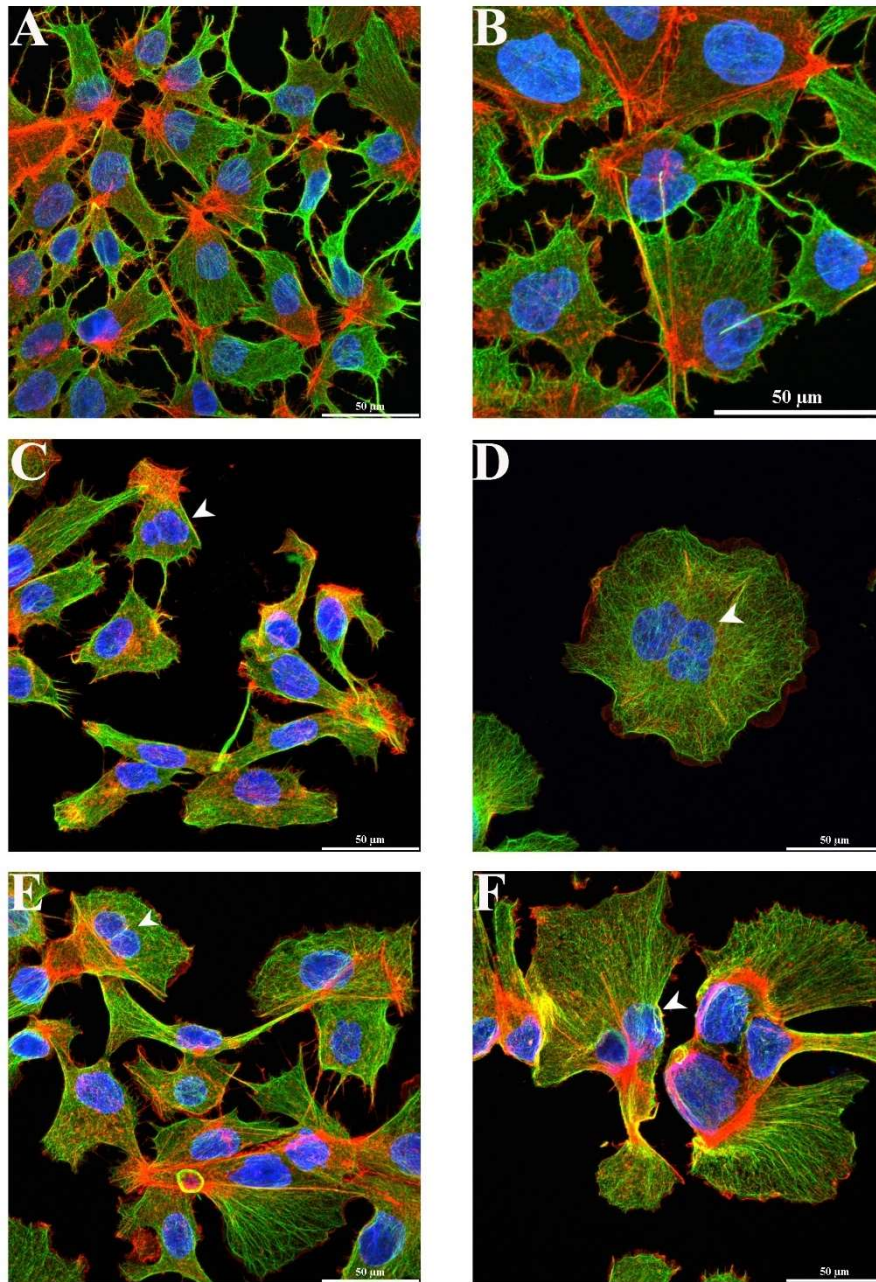
Figura 32 - Ensaio de fechamento da ferida em culturas de Hep3B após tratamento com LASSBio-1911.



Fonte: Do autor.

Para verificar os efeitos de LASSBio-1911 sobre os elementos do citoesqueleto, nós tratamos a linhagem Hep3B por 48 horas com a substância nas concentrações de 5,0 e 10,0 μM e realizamos preparações citológicas que evidenciaram a rede de microtúbulos e de microfilamentos. As figuras 33 e 34 mostram o padrão de distribuição dos filamentos de actina e dos microtúbulos em células do grupo controle (Figuras 33 A e B e 34) e dos grupos tratados (33C-E e 34). A dinâmica de polimerização dos microtúbulos e dos microfilamentos parece ter sido afetada pelo tratamento. A rede formada por esses elementos do citoesqueleto ficou mais evidentes nas culturas tratadas comparado ao grupo controle, sugerindo que o tratamento pode ter contribuído para a estabilização de microtúbulos e microfilamentos. Nós observamos também que o tratamento induziu aumento nas dimensões celulares e o aparecimento de células binucleadas, contudo esses eventos não foram mensurados.

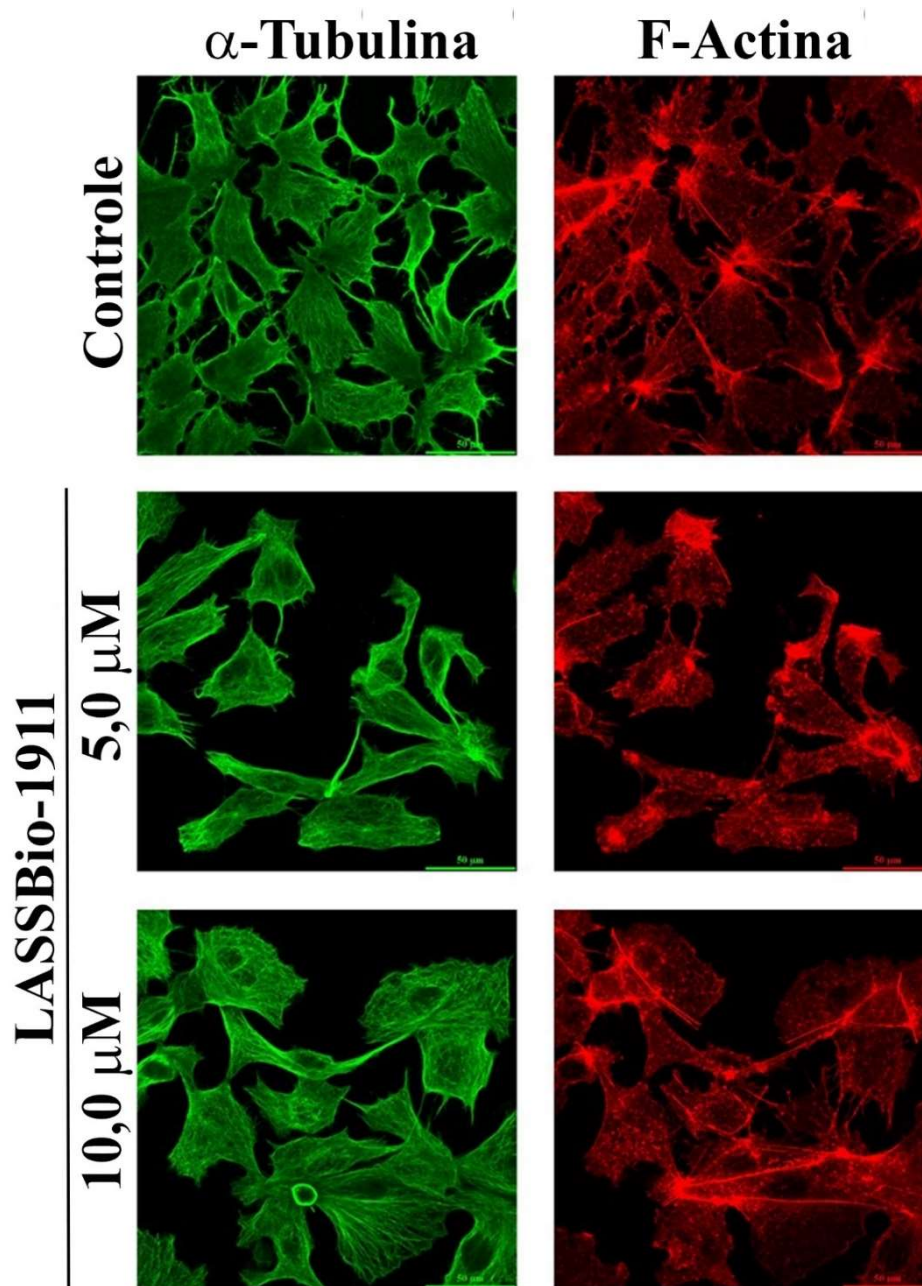
Figura 33 - Imagens obtidas por microscopia confocal evidenciando os elementos do citoesqueleto em células Hep3B tratadas por 48 horas com LASSBio-1911.



Fonte: Do autor.

Notas: Os microtúbulos foram evidenciados pela imunomarcção com anti- α tubulina conjugado a FITC (verde) e os microfilamentos pela marcação com faloidina conjugada à rodamina (vermelho). Os núcleos foram contracordados com DAPI. (A e B) Padrão normal de distribuição de filamentos de actina e dos microtúbulos. (C e D) Culturas tratadas com LASSBio-1911 (5,0 μ M). (E e F) Culturas tratadas com 10,0 μ M. Células binucleadas podem ser visualizadas nas culturas tratadas (seta branca).

Figura 34 - Imagens obtidas por microscopia confocal evidenciando microtúbulos e microfilamentos em culturas de Hep3B tratadas por 48 horas com LASSBio-1911.



Fonte: Do autor.

Notas: Os microtúbulos foram evidenciados pela imunomarcção com anti- α -tubulina/FITC (verde) e os microfilamentos pela marcação com faloidina/Rodamina (vermelho).

6 DISCUSSÃO

Em um estudo prévio, uma série inédita de derivados *N*-acilidrazônicos (NAH) foi obtida. As substâncias foram projetadas com base na estrutura da tricostatina A, um pan-inibidor de HDACs de origem natural (RODRIGUES *et al.*, 2016). A TSA apresenta em sua estrutura o ácido hidroxâmico (grupo farmacofórico) com alta afinidade pelo sítio ativo das histonas desacetilases (BELJANSKI, 2009). A potente inibição de HDACs alavancou os estudos sobre as características químicas da substância. Assim sendo, a caracterização completa da estrutura, bem como, a co-cristalização com a HDAC8, contribuíram para que o TSA se tornasse referência para a síntese de novos e potentes HDACi (RODRIGUEZ *et al.*, 2006; SOMOZA *et al.*, 2004).

Para o planejamento químico-medicinal, o grupo farmacofórico foi mantido e a técnica de bioisosterismo foi utilizada como principal estratégia de modificação para melhor explorar os benefícios da subunidade NAH, os quais incluem melhor solubilidade e biodisponibilidade (DUARTE; BARREIRO; FRAGA, 2007). Além disso, a região insaturada conjugada ao ácido hidroxâmico foi substituída por um anel aromático que conferiu seletividade para a HDAC6 (NEGMELDIN, KNOFF, PFLUM, 2018; OLSON *et al.*, 2013; RODRIGUES, THOTA, FRAGA, 2016; YANG *et al.*, 2020).

O perfil de seletividade da série **LASSBio-1909, 1911, 1935 e 1936** foi confirmado frente a inibição, *in vitro*, das HDACs classe I e IIb que constituem as principais isoformas humanas. A substância **LASSBio-1911** inibiu com alta eficiência a HDAC6 (IC₅₀ de 15,0 nM). As modificações estruturais em **LASSBio-1909, 1935 e 1936** conferiram maior afinidade destas substâncias para HDAC8. Além disso, quando comparados a TSA, os derivados mostraram baixa interação com as HDACs 1 e 2, o que indicou melhora da seletividade.

No presente estudo, nós avaliamos os efeitos dos derivados NAH, seletivos para as HDACs 6/8 sobre linhagens derivadas de CHC. O CHC é um subtipo de câncer de fígado que se caracteriza pela alta agressividade. Além disso, a elevada heterogeneidade molecular do CHC representa um desafio em relação as respostas do tumor frente aos tratamentos disponíveis. As linhagens HepG2 e Hep3B foram utilizadas neste estudo por serem representativas de diferentes subtipos de CHC. A linhagem HepG2 tem sido amplamente usada para identificar substâncias com

potencial antitumoral frente ao CHC. Essas células apresentam morfologia epitelial e não apresentam antígenos virais, contudo apresentam características frequentemente observadas em CHC incluindo a atividade de telomerase e a hiperativação de RAS (CEVIK; YLDIZ; OSTURK, 2015; QIU *et al.* 2015). A Hep3B tem o DNA viral (vírus da hepatite B, HBV) integrado ao genoma, ao contrário da linhagem HepG2. Os tumores que apresentam genoma viral integrado, principalmente HBV, são mais agressivos e tem pior prognóstico (BOYAULT *et al.*, 2007; CGARN, 2017; CHIANG *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2004; LLOVET *et al.*, 2018; LLOVET *et al.*, 2015).

Nós observamos que o tratamento com as substâncias **LASSBio-1909**, **1911**, **1935** e **1936** reduziu eficientemente a viabilidade celular das linhagens derivadas de CHC. O perfil citotóxico das substâncias **LASSBio-1911** e **1935** foi semelhante ao observado para o Sorafenibe (OMAR *et al.*, 2016). Além disso, em comparação com TSA, o tratamento com os derivados **LASSBio-1911** e **1935** foram menos citotóxicos para células normais (FB1 e FPM), indicando que as modificações estruturais realizadas foram efetivas e melhoraram o perfil de seletividade do protótipo de partida.

Os resultados, obtidos por meio de diferentes abordagens metodológicas, mostraram que **LASSBio-1911** e **1935** inibiram o comportamento proliferativo e induziram morte celular em linhagens derivadas de CHC por diferentes mecanismos. Nós demonstramos que essas substâncias reduziram a frequência de células na fase S do ciclo celular, entretanto, o bloqueio do ciclo celular só foi observado em culturas de HepG2 e Hep3B tratadas com **LASSBio-1911**.

As análises de progressão do ciclo celular mostraram que o tratamento com **LASSBio-1911** induziu aumento da população G2/M nas linhagens HepG2 e Hep3B. Além disso, nós observamos redução dos níveis de expressão de Histona H3 fosforilada (Ser10), indicando que o tratamento induziu bloqueio na transição de G2 para M (GOTO *et al.*, 2002; WEI *et al.*, 1999; WEI *et al.*, 1998).

A progressão de G2 para a fase M é impulsionada pela ativação do complexo CDK1/Ciclina B1, cuja atividade deve ser sustentada da prófase até a metáfase (NIGG, 2001; SMITS; MEDEMA, 2001). A ativação dos complexos CDK1/Ciclina B1 na transição G2/M é regulada pela ação de cinases (WEE1 e Myt1) e fosfatases (CDC25B/C) e, portanto, envolve eventos de fosforilação/desfosforilação em sítios

específicos da CDK1 (DUTERTRE *et al.*, 2004; HAMER *et al.*, 2011; MORALLI *et al.*, 2013; VAN VUGT; BRÁS; MEDEMA *et al.*, 2004).

Nós demonstramos que o tratamento com **LASSBio-1911** reduziu os níveis de RNAm do gene *CCNB1*, que codifica para a ciclina B1, em ambas as linhagens avaliadas. Todavia, as análises de expressão proteica mostraram que houve aumento de ciclina B1. Assim, o bloqueio do ciclo na transição G2/M, induzido pelo tratamento, pode estar associado à ativação do *checkpoint* em G2 e envolve os processos que regulam a atividade dos complexos CDK1/CiclinaB1 (LI; ZHANG, 2009; VAN LEUKEN; CLIJSTERS; WOLTHUIS, 2008).

Os complexos CDK1/CiclinaB1 são inibidos até a entrada na mitose em decorrência da fosforilação inibitória mediada pelas cinases Wee1 e Myt1 nos resíduos de treonina 14 e tirosina 15 da CDK1. Na transição de G2 para M, a fosforilação inibitória é eliminada pela fosfatase CDC25C e este evento desencadeia os eventos iniciais da mitose (LAPENA, GIORDANO, 2009; SUR; AGRAWALL, 2016). No presente estudo, nós não observamos alteração na expressão de *WEE1* e *CDC25* após tratamento com **LASSBio-1911**, contudo, aumento dos níveis de RNAm de *CDK1* foram observados principalmente em culturas de Hep3B. Portanto, novos estudos devem ser realizados a fim de se avaliar o perfil de ativação dos complexos CDK1/Ciclina B1 em nível proteico, uma vez que a ativação de CDK1 envolve fosforilação em sítios específicos.

A proteína p21, cujos níveis de expressão são baixos em células tumorais, é um membro da família KipCip e tem um papel crítico na inibição do ciclo celular (CAZALINI *et al.*, 2010; TAYLOR; STARK, 2001). A p21 é capaz de inibir a ativação do complexo CDK1/CiclinaB1, por meio da inibição da atividade da CAK, cinase responsável por fosforilar a CDK1 em resíduos de treonina 161 (PINES, 1993; SMITS *et al.*, 2000). Nós demonstramos aumento dos níveis de RNAm do gene *CDKN1A* após tratamento com **LASSBio-1911** em um mecanismo dependente da concentração, em ambas as linhagens. Curiosamente, os níveis de ativação do gene *CDKN1A* foram aproximadamente 3 vezes maiores na linhagem HepG2 em comparação à linhagem Hep3B após tratamento com **LASSBio-1911**. Vale ressaltar, que a linhagem Hep3B não expressa o gene *TP53* que codifica para a proteína p53, principal regulador da atividade de p21. Os dados sugerem que a ativação de p21 na linhagem Hep3B segue vias independentes de p53 (QUI *et al.*, 2015).

No presente estudo, nós não observamos modulação no perfil de expressão de *PLK1*, *AURKA* e *AURKB*, importantes reguladores de eventos da fase M, frente a linhagem HepG2. Na linhagem Hep3B, houve aumento pouco expressivo, porém significativo, das auroras A e B após 24 horas de exposição à **LASSBio-1911**. Estudos adicionais devem ser realizados para avaliar a capacidade de **LASSBio-1911** em modular o perfil de expressão das auroras A e B em nível proteico, uma vez que a superexpressão de auroras tem sido associada à ativação de vias oncogênicas em vários cânceres humanos incluindo o CHC (LUCENA-ARAUJO *et al.*, 2011; TAKESHITA *et al.*, 2013; ZHANG *et al.* 2010; WANG *et al.*, 2018; WANG *et al.* 2018).

Nós evidenciamos que o tratamento com **LASSBio-1911** aumentou os níveis de fosforilação de ERK em ambas as linhagens em um mecanismo dependente do tempo e da concentração. É amplamente discutido que a ativação de ERK1/2 exibe funções anti-apoptóticas para favorecer a proliferação e diferenciação, no entanto, em certos modelos experimentais a hiperativação de ERK1/2 pode desencadear apoptose e outro tipos de morte como senescência e autofagia, por exemplo (LAVOIE; GAGNON; THERRIEN, 2020). Uma possível explicação para o aumento da ativação de ERK no nosso modelo de estudo é que nas linhagens derivadas de CHC o tratamento com **LASSBio-1911** induziu dano ao DNA. Em resposta aos danos, a hiperativação de ERK pode induzir bloqueio em G2/M e morte celular (PEARSON *et al.*, 2001; TANG *et al.*, 2002).

Os danos ao DNA promovem a ativação do *checkpoint* em G2 e afetam os níveis de ativação dos complexos CDK1/CiclinaB1 (ZHOU; ELLEDEGE, 2000). Este processo é mediado por p53/p21 e pela ativação do eixo ATM-ATR/Chk1-2, em ambos os casos, a dinâmica entre cinases Wee1/Myt1 e fosfatases Cdc25C/Cdc25B é afetada (MANIC *et al.*, 2015; POON *et al.*, 1997; SMITH *et al.*, 2010). Tang *et al.* (2002) demonstraram que PD98059 e U0126 (inibidores de ERK) reduziram os níveis de expressão de p21, o que aboliu o bloqueio do ciclo celular em G2/M ocasionado pelo tratamento com etoposídeo. Além disso, Sewing *et al.* (1997) e Woods *et al.* (1997) propuseram que a ativação sustentada de ERK leva a indução de p21 em um mecanismo independente de p53. Nós observamos aumento dos níveis de expressão de p21 em culturas de HepG2 (que expressa p53) e Hep3B (que não expressa p53) em resposta ao tratamento com **LASSBio-1911**. Assim, é possível que

o aumento de p21, induzido pelo tratamento na linhagem Hep3B, esteja associado à hiperativação de ERK.

Curiosamente, nós não observamos aumento significativo de dano ao DNA em culturas de HepG2 e Hep3B tratadas com **LASSBio-1935** nas condições experimentais avaliadas. **LASSBio-1935** também não foi capaz de induzir bloqueio do ciclo em G2/M como observado após tratamento com **LASSBio-1911**. Em conjunto, estes dados reforçam a hipótese de que os danos ao DNA, induzidos por **LASSBio-1911**, ativam o *checkpoint* em G2 nas linhagens HepG2 e Hep3B. Além disso, os nossos dados indicam que a ativação de ERK e aumento na expressão de p21 constituem importantes fatores na determinação da atividade antiproliferativa e citotóxica de **LASSBio-1911** em culturas derivadas de CHC.

A hiperativação de ERK1/2, decorrente de danos ao DNA, modula a atividade da fosfatase CDC25C. ERK ativa, fosforila CDC25C (Ser216) e a encaminha para degradação via 26S proteossoma. Assim, em determinadas condições, a hiperativação de ERK contribui para inibição dos complexos CDK1/CiclinaB1 e bloqueio do ciclo na transição G2/M (WANG *et al.*, 2007). Os dados deste trabalho indicam que a hiperativação de ERK representa um aspecto importante nos efeitos induzidos por **LASSBio-1911** nas linhagens de carcinoma hepatocelular. Estudos adicionais serão realizados para avaliar se a inibição de ERK pode reverter os efeitos induzidos por **LASSBio-1911**.

Para investigar os possíveis mecanismos relacionados à atividade citotóxica de **LASSBio-1911** frente linhagens derivadas de CHC, nós empregamos diferentes abordagens metodológicas. A atividade pró-apoptótica de **LASSBio-1935** foi descrita por Rodrigues *et al.*, (2016) em culturas de HepG2. De acordo com o estudo, a atividade pró-apoptótica de **LASSBio-1935** foi associada à ativação de caspases efetoras 3/7, contudo, o potencial pró-apoptótico de **LASSBio-1911** em linhagens derivadas de CHC ainda não foi investigado.

Nós demonstramos que o tratamento com **LASSBio-1911** eficientemente induziu apoptose em linhagens derivadas de CHC. Nós observamos aumento da razão *BAX/BCL2* e, portanto, associamos a atividade pró-apoptótica de **LASSBio-1911** à sua capacidade de modular o perfil de expressão de genes da família Bcl-2. Nós verificamos que a linhagem Hep3B foi um pouco mais resistente aos sinais indutores de apoptose em relação à HepG2, uma vez que aumento na frequência de células positivas para anexina V foi observada somente com 72 horas na linhagem

Hep3B, ao passo que na linhagem HepG2 esse evento foi observado após 48 horas de tratamento. Estudos mostram que a linhagem Hep3B superexpressa survivina, uma proteína da família das XIAPs, que atua regulando negativamente a via intrínseca da apoptose (ALTIERI, 2003; O'CONNOR *et al.*, 2002). Os nossos dados são extremamente promissores e mostram que **LASSBio-1911** foi efetivo em induzir apoptose tanto em células da linhagem HepG2 como da linhagem Hep3B.

A atividade pró-apoptótica **LASSBio-1911**, em linhagens derivadas de CHC, pode estar diretamente relacionada à sua capacidade de induzir aumento na expressão de p21. Estudos mostram que p21 inibe as STATs 1 e 3, principalmente, e a ativação da via JAK/STAT está associada à indução da expressão de Bcl-2 e Bcl-xl (KARIMIAN; AHMAD; YOUSEFI, 2010). Apesar de nós não termos avaliado os níveis de fosforilação da STAT3, é possível que o aumento dos níveis de expressão de p21 e a redução dos níveis de Bcl-2, observados em decorrência do tratamento com **LASSBio-1911**, estejam associados à inibição da via JAK/STAT nas linhagens derivadas de CHC estudadas. Recentemente, Guerra *et al.* (2021) demonstraram que **LASSBio-1911** reduziu os níveis de ativação de STAT3 em culturas de PC3 (derivadas de câncer de próstata). Estes dados são relevantes, uma vez que as STATs, especialmente a STAT3, são altamente expressas em tecidos e linhagens tumorais. O aumento da expressão da STAT3 é associado à progressão do câncer de fígado (ILAMATHI *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2016). Além disso, a indução de p21 tem sido associada ao aumento dos níveis de expressão de BAX, que foi um evento observado em resposta ao tratamento das linhagens HepG2 e Hep3B com **LASSBio-1911** (GARTEL, 2005). Assim sendo, é possível que a atividade pró-apoptótica de **LASSBio-1911** frente as linhagens de CHC esteja associada à sua capacidade de ativar a expressão de p21.

Estudos mostram que a indução de morte celular em resposta à danos no DNA podem estar associadas à hiperativação de ERK. Foi demonstrado que danos causados por cisplatina, etoposídeo e radiação ionizante ou ultravioleta induziram hiperativação de ERK e apoptose (ALEXIA *et al.*, 2004; FERNANDEZ *et al.*, 2004; YEH *et al.*, 2004; STEFANELLI *et al.*, 2002; TANG *et al.*, 2002). A ativação de ERK também foi associada a indução de morte após tratamento com resveratrol, quercitina, apigenina, taxol e outros agentes com atividade antitumoral conhecida (BACUS *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2008; SHIH *et al.*, 2002; XIAO; SINGH *et al.*, 2002). A estreita relação entre a ativação de ERK e p53 também tem sido

demonstrada em muitos modelos. A fosforilação dos resíduos de Ser15 da p53, impulsionada pela ativação de ERK, podem estabilizar p53. Este processo favorece a apoptose por induzir aumento na expressão de membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 como Bax, PUMA e Bak (BROWN; BENCHIMOL, 2006; KIM *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2000; LIU *et al.* 2008; PANARETAKIS *et al.* 2008; PEARSONS *et al.*, 2000; WOESSMANN *et al.* 2002; WU *et al.* 2005). Em conjunto, estes dados suportam a hipótese de que os danos ao DNA induzidos pelo tratamento com **LASSBio-1911** podem estar associados à hiperativação de ERK e indução de apoptose em linhagens derivadas de CHC.

A indução de apoptose parece não ser o único evento envolvido com a atividade antitumoral de **LASSBio-1911** sobre células de CHC. Nós também observamos aumento na frequência de células, cujas características morfológicas assemelham-se a células em catástrofe mitótica, principalmente em culturas de HepG2. A catástrofe mitótica representa um mecanismo oncosupressor que elimina da população células que entram prematuramente na mitose, contudo, devida a presença de anormalidades essas células não concluem o processo de divisão. Assim, a catástrofe mitótica previne a propagação de cariótipos anormais, uma vez que interrompe permanentemente a continuidade do ciclo. As células bloqueadas na mitose podem ser eliminadas ainda durante o processo de divisão ou sair desta fase prematuramente, em um processo conhecido por *slippage*, e entrar em apoptose ou senescência (BRITO; YANG; RIEDER, 2008; BRITO; RIEDER, 2006; HUANG *et al.* 2010; HUANG *et al.* 2009; LEE *et al.*, 2010).

As células que entram em catástrofe mitótica ficam em mitose por um tempo maior que o normal. Esse evento pode estar associado à ativação remanescente de CDK1. Nós observamos acúmulo de ciclina B1 em amostras tratadas com **LASSBio-1911**, um indicativo de que a progressão pela fase M não ocorreu na maioria das células, uma vez que a degradação de ciclina B ocorre na transição metáfase-anáfase devido a ativação do complexo APC (JIN; HARDY; MORGAN, 1997; MULLERS *et al.* 2017; PORTER; SINGH; LEE, 2000; YUAN *et al.* 2004). A ativação residual de CDK1 parece promover a condensação prematura da cromatina o que favorece a catástrofe mitótica (HUANG *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2005). Além disso, a catástrofe mitótica leva a formação de células binucleadas e multinucleadas e com micronucleações (BUNZ *et al.*, 1998; ANDREASSEN *et al.*, 2001; RONINSON *et al.*, 2001). Apesar de não terem sido quantificadas, nós observamos aumento da

frequência de células binucleadas em culturas de HepG2 e Hep3B. Estes achados indicam que o tratamento com **LASSBio-1911** pode ter induzido catástrofe mitótica em culturas derivadas de CHC.

A catástrofe mitótica por ter ocorrido em células que escaparam do checkpoint G2/M. Células tumorais geralmente apresentam falhas nos sensores (ATM/ATR), adaptadores (BRCA1) ou efetores (Chk1/Chk2) que são requeridos para o bloqueio do ciclo celular (MELO; TOCZYSKI, 2002). Além disso, considerando que a ativação residual do complexo CDK1/CiclinaB1 deflagra os eventos necessários para a entrada em mitose (condensação da cromatina, desorganização do envoltório nuclear, reorganização de microtúbulos e microfilamentos) é possível que a estabilização do citoesqueleto, ocasionado pela inibição da HDAC6 em culturas tratadas com **LASSBio-1911**, comprometa diretamente o processo de divisão das células que escaparam do *checkpoint* em G2, o que contribui para a ocorrência de catástrofe mitótica (NIGG, 2001; SMITS; MEDEMA, 2001).

No modelo proposto por Müllers *et al.* (2017), danos ao DNA promovem a ativação residual da CDK1/2. Por meio do uso de inibidores sintéticos, os pesquisadores demonstraram que a inibição da CDK1/2 induziu aumento dos níveis de expressão de p53; enquanto a expressão de p21 foi reduzida nestas condições. Os dados sugerem que a atividade remanescente de CDK1/2 induziu ativação de p21 em um mecanismo independente de p53. Curiosamente, no nosso estudo, parece que a indução de p21 por mecanismos independentes de p53 constitui um importante mediador do potencial antitumoral de **LASSBio-1911** em culturas de CHC.

Song; Lim; Cho (2018) demonstraram que o tratamento com 2,4-di-terc-butilfenol (DTBP), um produto natural com atividade antitumoral, induziu senescência e catástrofe mitótica em células AGS, as quais são derivadas de carcinoma gástrico. A senescência foi associada ao aumento dos níveis de expressão de p21 e RB. Posteriormente os autores demonstraram, por estudos de *docking*, que o DTBP tem alta afinidade pelo sítio ativo da HDAC6 e, conseqüentemente, contribui para o aumento dos níveis de acetilação da α -tubulina. Assim sendo, a estabilização do citoesqueleto, ocasionada pela inibição da HDAC6, foi associado a indução de catástrofe mitótica e enriquecimento de células multinucleadas. Em conjunto, estes dados, assim como os dados obtidos no com o nosso estudo, suportam a hipótese de

que a inibição da HDAC6 pode induzir senescência e catástrofe mitótica em linhagens tumorais.

O estudo realizado por Freeze *et al.* (2019) demonstrou que todas as classes de HDAC são superexpressas nas linhagens de CHC (Hep3B, HepG2, PLC e HuH7) em comparação aos hepatócitos primários humanos. Além disso, tecidos de pacientes com CHC, principalmente aqueles que estavam com CHC em estágios mais avançados, apresentaram alta expressão de HDACs. Os autores demonstraram também que concentrações subtóxicas de SAHA são efetivas na indução de senescência em células de CHC, o que não foi observado após tratamento com TSA. Todavia, a inibição de HDACs e os mecanismos moleculares relacionadas à senescência celular ainda não tenham sido demonstrados em células de CHC.

A senescência celular é um estado de bloqueio irreversível do ciclo celular (LOZANO-TORRES *et al.* 2019; SARETZKI, 2010). Nós observamos, principalmente em culturas de Hep3B, o enriquecimento da cultura com células, cujas características eram compatíveis com células senescentes (células grandes e achatadas) em culturas tratadas com **LASSBio-1911**. Assim, nós investigamos se **LASSBio-1911** foi capaz de induzir senescência em células de CHC. Os dados mostraram aumento significativo na frequência em células positivas para β -galactosidase em relação às culturas controles, indicando que **LASSBio-1911** induz senescência nas linhagens HepG2 e Hep3B. Nós já havíamos demonstrado que o tratamento com **LASSBio-1911** induziu aumento dos níveis de expressão de p21, um dos marcadores de senescência (BORLON *et al.*, 2008; SCHMITT *et al.*, 2002).

Considerando os dados publicados por Pinheiro *et al.* (2018) e Rodrigues *et al.* (2016) que mostraram, por estudos de *docking molecular*, a alta afinidade da **LASSBio-1911** para o sítio catalítico da HDAC6, nós avaliamos se os efeitos dessa substância sobre células de CHC estavam associados à sua capacidade de inibir HDAC6. Nossos resultados mostraram que os efeitos de **LASSBio-1911** foram decorrentes da inibição de HDAC6, uma vez que a atividade dessa isoforma foi efetivamente inibida nas condições experimentais testadas.

A função de HDAC6 no processo de hepatocarcinogênese é bastante controverso. Alguns estudos mostram que HDAC6 atua como supressor de tumor (BAE *et al.*, 2015; JUNG *et al.*, 2012; LV *et al.*, 2016), enquanto outros mostram que HDAC6 atua como fator pró-oncogênico (DING *et al.*, 2013; KALUZA *et al.*, 2011; KONG *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2018). Os dados obtidos no presente estudo,

claramente demonstram que a inibição de HDAC6 está envolvida com todos os efeitos biológicos observados (inibição de proliferação e indução de morte celular por diferentes mecanismos). Assim sendo, considerando as características genéticas e epigenéticas das linhagens celulares estudadas, a HDAC6 tem atividade pró-oncogênica em CHC.

Nós demonstramos que o tratamento com **LASSBio-1911** inibiu a capacidade clonogênica na linhagem Hep3B, mesmo quando utilizado em concentrações subtóxicas. Assim, a inibição de HDAC6 em células de CHC inibe o comportamento proliferativo. Considerando que intensa atividade proliferativa está relacionada à progressão tumoral e o estabelecimento de metástase, **LASSBio-1911** tem promissora atividade antitumoral e deve ser considerado como protótipo candidato à fármaco antineoplásico para o tratamento de CHC (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Nós investigamos também a capacidade de **LASSBio-1911** em influenciar a instabilidade dinâmica dos microtúbulos e dos microfilamentos, bem como na capacidade de migração de células Hep3B, uma vez que a inibição de HDAC6 afeta o comportamento de elementos do citoesqueleto. Os principais alvos de HDAC6 são α -tubulina, cortactina e Hsp90 (DING *et al.*, 2013; HUBBERT *et al.*, 2002; KONG *et al.*, 2006; KOVACS *et al.*, 2005;). Nós mostramos que **LASSBio-1911** reduz significativamente a capacidade de migração na linhagem Hep3B e estabiliza microtúbulos e microfilamentos. A instabilidade dinâmica dos microtúbulos é essencial para a separação das cromátides irmãs durante a anáfase, enquanto a instabilidade dinâmica dos microfilamentos está intimamente relacionada aos processos de citocinese, migração e invasão (NURNBERG; KITZING; GROSSE, 2011).

Os processos de proliferação, migração, angiogênese e morte celular podem ser regulados pela inibição da HDAC 6 em diferentes modelos experimentais (DING *et al.*, 2013; HUBBERT *et al.*, 2002; KALUZA *et al.*, 2011; KONG *et al.*, 2006; KOVACS *et al.*, 2005; PALAZZO; ACKERMAN; GUNDERSEN, 2002; ZHANG *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2018). Alguns estudos conduzidos em linhagens provenientes de CHC indicam que a inibição seletiva da HDAC6 parece ser uma estratégia promissora para o tratamento do CHC (DING *et al.*, 2013; KALUZA *et al.*, 2011; KONG *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2018). Em conjunto, os dados obtidos com o nosso trabalho reforçam a hipótese de que a inibição da HDAC6 tem impacto

negativo sobre a proliferação e pode induzir morte celular em culturas derivadas de CHC. Estes resultados abrem a perspectiva para o delineamento de novas abordagens experimentais *in vivo* que validem o potencial antitumoral de **LASSBio-1911**.

7 CONCLUSÃO

- ✓ **LASSBio-1911** e **1935** inibem a proliferação e induzem morte em células de CHC com diferentes características genéticas;
- ✓ **LASSBio-1911** e **1935** são seletivas para as células tumorais em relação às células normais;
- ✓ A atividade antiproliferativa de **LASSBio-1911** sobre as linhagens de CHC está associada à sua capacidade de inibir HDAC6, induzir danos ao DNA e ativar o *checkpoint* de G2/M, ao contrário de **LASSBio-1935** que efetivamente inibe a proliferação, porém não exerce influência sobre a dinâmica de progressão do ciclo celular;
- ✓ A ativação do *checkpoint* em G2/M, induzido por **LASSBio-1911**, induz aumento de p21 e ativação sustentada de ERK em ambas as linhagens avaliadas;
- ✓ A atividade pró-apoptótica de **LASSBio-1911** parece estar relacionada a modulação dos membros Bax e Bcl-2 (aumento do raio *BAX/BCL2*);
- ✓ **LASSBio-1911** parece induzir catástrofe mitótica na linhagem HepG2 e senescência na linhagem Hep3B;
- ✓ A inibição do comportamento proliferativo e migratório, induzido por **LASSBio-1911** em linhagens de CHC, está associada à inibição de HDAC6, indicando que HDAC6 ativa vias oncogênicas em CHC.

REFERÊNCIAS

- ABOU-ALFA, G. K. *et al.* Cabozantinib in patients with advanced and progressing hepatocellular carcinoma. **N. Engl. J. Med.**, Massachusetts, v. 379, p. 54–63, 2018.
- ADHIKARI, N. *et al.* Selective and nonselective HDAC8 inhibitors: a therapeutic patent review. **Pharm Pat Anal.**, v. 7, n. 6, p. 259-276, 2019.
- AHN, S.-M. *et al.* Genomic portrait of resectable hepatocellular carcinomas: implications of RB1 and FGF19 aberrations for patient stratification. **Hepatology**, v. 60, p. 1972–1982, 2014.
- ALEXIA C. *et al.* An evaluation of the role of insulin-like growth factors (IGF) and of type-I IGF receptor signalling in hepatocarcinogenesis and in the resistance of hepatocarcinoma cells against drug-induced apoptosis. **Biochem. Pharmacol.**, v. 68, p. 1003–1015, 2004.
- ALTIERI, D. C. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. **Oncogene**, v. 22, p. 8581–8589, 2003.
- ANDREASSEN, P.R. *et al.* Tetraploid state induces p53-dependent arrest of nontransformed mammalian cells in G1. **Mol. Biol. Cell.**, v. 12, p. 1315–1328, 2001.
- BACUS, S. S. *et al.* Taxol-induced apoptosis depends on MAP kinase pathways (ERK and p38) and is independent of p53. **Oncogene**, v. 20, p. 147–155, 2001.
- BAE, H. J. MicroRNA-221 governs tumor suppressor HDAC6 to potentiate malignant progression of liver cancer. **J Hepatol.**, v. 63, n. 2, p. 408-419, 2015.
- BALASUBRAMANIAN, S.; VERNER, E.; BUGGY, J.J. Isoform-specific histone deacetylase inhibitors: the next step? **Cancer Lett.** v. 280, n. 2, p. 211-221, 2009.
- BELJANSKI, V. Trichostatin A. **The Comprehensive Pharmacology Reference**, p. 1-4, 2009.
- BERTINO, G. *et al.* Hepatocellular carcinoma: novel molecular targets in carcinogenesis for future therapies. **BioMed Research International**, p. 1-45, 2014.
- BITZER, M. *et al.* Resminostat plus sorafenib as second-line therapy of advanced hepatocellular carcinoma – The SHELTER study. **Journal of Hepatology**, v. 65, n. 2, p. 280-288, 2016.
- BORLON, C. *et al.* Identification of p53-dependent genes potentially involved in UVB-mediated premature senescence of human skin fibroblasts using siRNA technology. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 129, n. 3, p. 109-19. 2008.
- BOYAULT S. *et al.* Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. **Hepatology**, v. 45, p. 42–52, 2007.

- BRITO, D. A.; RIEDER, C. L. Mitotic checkpoint slippage in humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint. **Curr Biol.**, v. 16, p. 1194–1200, 2006.
- BRITO, D. A.; YANG, Z.; RIEDER, C. L. Microtubules do not promote mitotic slippage when the spindle assembly checkpoint cannot be satisfied. **J Cell Biol.**, v. 182, p. 623–629, 2008.
- BROWN, L.; BENCHIMOL, S. The involvement of MAPK signaling pathways in determining the cellular response to p53 activation: cell cycle arrest or apoptosis. **J Biol Chem** 281, 3832–3840, 2006.
- BRUIX J. *et al.* Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, Phase III trial. **Lancet**, v. 389, p. 56–66, 2017.
- BUNZ, F. *et al.* Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. **Science**, v. 282, p. 1497–1501, 1998.
- CALDERARO, J. *et al.* Molecular and histological correlations in liver cancer. **Journal of Hepatology**, v. 71, p. 616–630, 2019.
- Cancer Genome Atlas Research Network, Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive and integrative genomic characterization of hepatocellular carcinoma. **Cell**, v. 169, p. 1327–1341, 2017.
- CAZZALINI, O. *et al.* Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21CDKN1A in the DNA damage response. **Mutation Research/reviews In Mutation Research**, v. 704, n. 1-3, p.12-20, 2010.
- CEVIK, D.; YILDIZ, G.; OZTURK, M. Common telomerase reverse transcriptase promoter mutations in hepatocellular carcinomas from different geographical locations. **World J Gastroenterol.**, v. 21, n. 1, p. 311-7, 2015.
- CHENG, A. L. *et al.* Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a Phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Lancet Oncol.**, v. 10, n. 1, p. 25–34, 2009.
- CHIANG, D. Y. *et al.* Focal gains of VEGFA and molecular classification of hepatocellular carcinoma. **Cancer Res.**, v. 68, p. 6779–6788, 2008.
- CRAIG, A. J. *et al.* Tumour evolution in hepatocellular carcinoma. **Nature Reviews**, 2019.
- DAOUDAKI, M.; FOUZAS, I. Hepatocellular carcinoma. **Wien Med Wochensch**, v. 164, n. 21-22, p. 450-455, 2014.
- DEARDORFF, M. A. *et al.* HDAC8 mutations in Cornelia de Lange syndrome affect the cohesin acetylation cycle. **Nature**, v. 489, p. 313–317, 2012.
- DEEKS, E. D. Cabozantinib: A Review in Advanced Hepatocellular Carcinoma. **Target Oncol.**, v. 14, n. 1, p. 107-113, 2019.

- DING, G. *et al.* HDAC6 promotes hepatocellular carcinoma progression by inhibiting P53 transcriptional activity. **FEBS Letters**, v. 587, p. 880-886, 2013.
- DUARTE, C. D.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A.M. Privileged Structures: A Useful Concept for the Rational Design of New Lead Drug Candidates. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 11, p. 1108 – 1119, 2007.
- DUTERTRE, S. *et al.* On the role of aurora-A in centrosome function. **Oncogene**, v. 21, n. 40, p.6175-6183, 2002.
- DUVIC, M. *et al.* Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). **Blood**, v. 109, p. 31-39. 2007.
- EL-SERAG, H. B.; RUDOLPH, K. L. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. **Gastroenterology**, v. 132, p. 2557-2576, 2007.
- FENG, G. *et al.* Conflicting roles of molecules in hepatocarcinogenesis: paradigm or paradox. **Cancer cell**, v. 21, n. 2, p. 150-154, 2012.
- FORNER, A.; REIG, M.; BRUIX, J. Hepatocellular carcinoma. **Lancet**, v. 391, p. 1301-1314, 2018.
- FREESE, K. *et al.* Histone Deacetylase Expressions in Hepatocellular Carcinoma and Functional Effects of Histone Deacetylase Inhibitors on Liver Cancer Cells In Vitro. **Cancers (Basel)**. v. 11, n. 10, p. 1587, 2019.
- GARTEL, A. L. The conflicting roles of the cdk inhibitor p21(CIP1/WAF1) in apoptosis. **Leukemia Research**, v. 29, n. 11, p.1237-1238, 2005.
- GLOZAK, M. A.; SETO, E. Histone deacetylases and cancer. **Oncogene**. v. 26, p. 5420-5432, 2007.
- GOMES, M. A. *et al.* Carcinoma hepatocelular: epidemiologia, biologia, diagnóstico e terapias. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 59, n. 5, p. 514-524, 2013.
- GOTO, H. *et al.* Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation. **Genes To Cells**, v. 7, n. 1, p.11-17, 2002
- GUERRA, F. S. *et al.* Novel Single Inhibitor of HDAC6/8 and Dual Inhibitor of PI3K/HDAC6 as Potential Alternative Treatments for Prostate Cancer
- HABERLAND, M. *et al.* The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. **Nat. Rev. Genet.**, v. 10, p. 32–42, 2009.
- HAMER, P. C. *et al.* WEE1 Kinase Targeting Combined with DNA-Damaging Cancer Therapy Catalyzes Mitotic Catastrophe. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 13, p.4200-4207, 2011.

- HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.
- HOSHIDA, Y. *et al.* Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma. **Cancer Res.**, v. 67, p. 7385–7392, 2009.
- HU, T. *et al.* Expression and prognostic role of tumor suppressor gene PTEN/MMAC1/TEP1 in hepatocellular carcinoma. **Cancer**, v. 97, n. 8, p. 1929-1940, 2003.
- HUANG, H. C. *et al.* Evidence that mitotic exit is a better cancer therapeutic target than spindle assembly. **Cancer Cell**, v. 16, p. 347–358, 2009.
- HUANG, H-C. *et al.* Stochastic competition between mechanistically independent slippage and death pathways determines cell fate during mitotic arrest. **PLoS One.**, v. 5, n. 12, p. e15724, 2010.
- HUBBERT, C. *et al.* HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. **Nature**, v. 417, p. 455-458, 2002.
- ILAMATHI M. *et al.* Artesunate obliterates experimental hepatocellular carcinoma in rats through suppression of IL-6-JAK-STAT signalling. **Biomed Pharmacother**, v. 82, p.72-9, 2016.
- JEANNOT, V. *et al.* Synergistic activity of vorinostat combined with gefitinib but not with sorafenib in mutant KRAS human non-small cell lung cancers and hepatocarcinoma. **Onco Targets Ther.** v. 9, p. 6843-6855, 2016.
- JIN; HARDY, S.; MORGAN, D. O. Nuclear localization of cyclin B1 controls mitotic entry after DNA damage. **J. Cell. Biol.**, v. 141, p. 875–885, 1998.
- JOHNSTONE, R.W. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. **Nat. Rev. Drug Discov.** v. 1, p. 287–299, 2002.
- JUNG, K. H. *et al.* Histone Deacetylase 6 Functions as a Tumor Suppressor by Activating c-Jun NH2-Terminal Kinase-Mediated Beclin 1-Dependent Autophagic Cell Death in Liver Cancer. **Hepatology.**, v. 56, n. 2, 2012.
- KALUZA, D. *et al.* Class IIb HDAC6 regulates endothelial cell migration and angiogenesis by deacetylation of cortactin. **The EMBO Journal.**, v. 30, n. 20, p. 4142-56, 2011.
- KANNO, K. *et al.* Overexpression of histone deacetylase 6 contributes to accelerated migration and invasion activity of hepatocellular carcinoma cells. **Oncol. Rep.** v. 28, p. 867-873, 2012.
- KARIMIAN, A.; AHMADI, Y.; YOUSEFI, B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. **Dna Repair**, v. 42, p.63-71, jun. 2016.

KAWAI-KITAHATA, F. *et al.* Comprehensive analyses of mutations and hepatitis B virus integration in hepatocellular carcinoma with clinicopathological features. **Journal of Gastroenterology**, v. 51, p. 473-486, 2016.

KIM, Y. H. *et al.* Quercetin augments TRAIL-induced apoptotic death: involvement of the ERK signal transduction pathway. **Biochem Pharmacol.**, v. 75, p. 1946-58, 2008.

KIM, Y. K. *et al.* Role of ERK activation in cisplatin-induced apoptosis in OK renal epithelial cells. **J Appl Toxicol.**, v. 25, n. 374–382, 2005.

KONG, X. *et al.* Histone deacetylase inhibitors induce VHL and ubiquitin-independent proteasomal degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. **Mol Cell Biol.**, v. 26, p. 2019–2028, 2006.

KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**. v. 128, p. 693- 705, 2007.

KOVACS, J. J. *et al.* HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. **Mol. Cell**, v. 18, p. 601–607, 2005.

KUDA, M. *et al.* Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised Phase III non-inferiority trial. **Lancet**, v. 391, p. 1163–1173, 2018.

KUMAGAI T. *et al.* Histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid (Vorinostat, SAHA) profoundly inhibits the growth of human pancreatic cancer cells. **Int. J. Cancer**. v. 121, p. 656–665, 2007.

KUNNIMALAIYAAN, S. *et al.* Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, alters multiple signaling pathways in hepatocellular carcinoma cell lines. **The American Journal of Surgery**, p. 1-7, 2016.

LAPENNA, S.; GIORDANO, A. Cell Cycle Kinases as Therapeutic Targets for Cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, p. 547-566, 2009.

LAVOIE, H.; GAGNON, J., THERRIEN, M. ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 21, n. 10, p. 607-632, 2020.

LEE, J. *et al.* Substrate degradation by the anaphase promoting complex occurs during mitotic slippage. **Cell Cycle**, v. 9, p. 1792–1801, 2010.

LEE, J. S. *et al.* Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling. **Hepatology**, v. 40, p. 667–676, 2004.

LI, J. *et al.* Histone deacetylase 8 regulates cortactin deacetylation and contraction in smooth muscle tissues. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 307, p. C288–C295, 2014.

LI, M.; ZHANG, P. The function of APC/CCdh1 in cell cycle and beyond. **Cell Div.** v. 4, n. 2, p. 1-21, 2009.

- LIU, J. *et al.* ERKs/p53 signal transduction pathway is involved in doxorubicin-induced apoptosis in H9c2 cells and cardiomyocytes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v. 295, p. H1956–H1965, 2008.
- LLOVET, J. M. *et al.* A molecular signature to discriminate dysplastic nodules from early hepatocellular carcinoma in HCV cirrhosis. **Gastroenterology**, v. 131, p. 1758–1767, 2006.
- LLOVET, J. M. *et al.* Advances in targeted therapies for hepatocellular carcinoma in the genomic era. **Nat Rev Clin Oncol.**, v. 12, p. 436, 2015.
- LLOVET, J. M. *et al.* Hepatocellular carcinoma. **Disease primers – Nature Reviews**, v. 2, p. 1-23, 2016.
- LLOVET, J. M. *et al.* Molecular therapies and precision medicine for hepatocellular carcinoma. **Nat Rev Clin Oncol.**, v. 15, p. 599-616, 2018.
- LLOVET, J. M. *et al.* Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. **N. Engl. J. Med.**, v. 359, n. 4, p. 378–390, 2008.
- LOZANO-TORRES, B. *et al.* The chemistry of senescence. **Nature reviews**, v. 3, p. 426-441, 2019.
- LUCENA-ARAUJO, A. R. *et al.* High expression of AURKA and AURKB is associated with unfavorable cytogenetic abnormalities and high white blood cell count in patients with acute myeloid leukemia. **Leuk Res.** v. 35, p. 260–4, 2011.
- LUPBERGER, J.; HILDT, E. Hepatitis B virus-induced oncogenesis. **World J Gastroenterol.**, v. 13, n. 1, p. 74-81, 2007.
- LV, Z. *et al.* Downregulation of HDAC6 Promotes Angiogenesis in Hepatocellular Carcinoma Cells and Predicts Poor Prognosis in Liver Transplantation Patients. **Molecular Carcinogenesis**, v. 55, p. 1024–1033, 2016.
- MANIC, G. *et al.* Trial Watch: targeting ATM-CHK2 and ATR-CHK1 pathways for anticancer therapy. **Mol Cell Oncol.**, v. 2, n. 4, p. e1012976, 2015.
- MARKS, P. A.; BRESLOW, R. Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drugs. **Nat. Biotechnol.** v. 25, p. 84-90, 2007.
- MARKS, P.; XU, W.S. Histone deacetylase inhibitors: potential in cancer therapy. **J. Cell. Biochem.** v. 107, p. 600–608, 2009.
- MARTIN, M.; HERCEG, Z. From hepatitis to hepatocellular carcinoma: a proposed model for cross-talk between inflammation and epigenetic mechanisms. **Genome Med**, v. 4, n. 8, 2012.
- MELO, J.; TOCZYSKI, D. A unified view of the DNA-damage checkpoint. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 14, p. 237–245, 2002.

- MONTGOMERY, R. L. *et al.* Maintenance of cardiac energy metabolism by histone deacetylase 3 in mice. **J. Clin. Invest.** v. 118, p. 3588–3597, 2008.
- MORALLI, S. D. *et al.* Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 138, n. 2, p. 255-271, 2013.
- MULLERS, E. *et al.* Residual Cdk1/2 activity after DNA damage promotes senescence. **Aging Cell**, p. 1-10, 2017.
- NARITA, T.; WEINERT, B. T.; CHOUDHARY, C. Functions and mechanisms of non-histone protein acetylation. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 20, p. 156–174, 2018.
- NAULT, J. C. *et al.* High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. **Nat. Commun.**, v. 4, p. 2218-35, 2013.
- NAULT, J. C. *et al.* Telomerase reverse transcriptase promoter mutation is an early somatic genetic alteration in the transformation of premalignant nodules in hepatocellular carcinoma on cirrhosis. **Hepatology**, v. 60, p. 1983–1992, 2014.
- NEGMELDIN, A. T.; KNOFF, J. R.; PFLUM, M. K. H. The structural requirements of histone deacetylase inhibitors: C4-modified SAHA analogs display dual HDAC6/HDAC8 selectivity. **Eur J Med Chem.**, v. 143, p. 1790-1806, 2018.
- NICOLAS, G. *et al.* Management of hepatocellular carcinoma: SASL expert opinion statement. **Swiss Med Wkly**, v. 150, p. 1-7, 2020.
- NIGG, E. A. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 2, p. 21–32, 2001.
- NIU, Z. S.; NIU, X. J.; WANG, W. H. Genetic alterations in hepatocellular carcinoma: An update. **World J Gastroenterol.**, v. 22, n. 41, p. 9069-9095, 2016.
- NURNBERG, A.; KITZING, T.; GROSSE, R. Nucleating Actin for Invasion. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, p. 177-187, 2011.
- O'CONNOR, D. S. *et al.* **Cancer Cell**, v. 2, p. 43–54, 2002.
- OLSON, D. E. *et al.* An unbiased approach to identify endogenous substrates of 'histone' deacetylase 8. **ACS Chem. Biol.**, v. 9, p. 2210–2216, 2014.
- OLSON, D. E. *et al.* Discovery of the first histone deacetylase 6/8 dual inhibitors. **J Med Chem.**, v. 56, n. 11, p. 4816-20, 2013.
- OMAR, H. A. *et al.* OSU-2S/Sorafenib Synergistic Antitumor Combination against Hepatocellular Carcinoma: The Role of PKC δ /p53. **Front. Pharmacol.**, 2016.
- OODS, D. *et al.* Raf-Induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip. **Mol. Cell Biol.**, v. 17, p. 5598-5611, 1997.

- PANARETAKIS T. *et al.* Interferon alpha induces nucleus-independent apoptosis by activating extracellular signal-regulated kinase 1/2 and c-Jun NH2-terminal kinase downstream of phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin. **Mol Biol Cell.**, v. 19, p. 41–50, 2008.
- PARADIS, V. *et al.* Molecular profiling of hepatocellular carcinomas (HCC) using a large-scale real-time RT-PCR approach: determination of a molecular diagnostic index. **Am. J. Pathol.**, v. 163, p. 733–741, 2003.
- PASCUAL, S. *et al.* New advances in hepatocellular carcinoma. **World journal of hepatology** v. 8, p. 421-438, 2016.
- PEARSON, G. *et al.* Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. 2, p. 153-183, 2001.
- PERSONS, D. L. *et al.* Effect of extracellular signal-regulated kinase on p53 accumulation in response to cisplatin. **J Biol Chem.**, v. 275, p. 35778–35785, 2000.
- PERZ, J. F. *et al.* The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. **J. Hepatol.**, v. 45, n. 4, p. 529-38, 2006.
- PILATI, C. *et al.* Genomic profiling of hepatocellular adenomas reveals recurrent FRK-activating mutations and the mechanisms of malignant transformation. **Cancer Cell**, v. 25, p. 428–441, 2014.
- PINES, J. Cyclins and cyclin-dependent kinases - take your partners. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 18, n. 195, 1993.
- PINHEIRO, P. S. M. *et al.* **Int. J. Quantum Chem.**, v. 118, p. e25720, 2018.
- POOLE, R. M. Belinostat: first global approval. **Drugs**, v. 74, p. 1543-1554, 2014.
- POON, R.Y.C. *et al.* The role of Cdc2 feedback loop control in the DNA damage checkpoint in mammalian cells. **Cancer Res.**, v. 57, p. 5168–5178, 1997.
- PORTER, L. A; SINGH, G.; LEE, J. M. Abundance of cyclin B1 regulates gamma-radiation-induced apoptosis. **Blood**, v. 95, p. 2645–2650, 2000.
- PRINCE, H. M.; DICKINSON, M. Romidepsin for cutaneous T-cell lymphoma. **Clin Cancer Res.** v. 18, p. 3509-3515, 2012.
- QIU, G-H. *et al.* Distinctive pharmacological differences between liver cancer cell lines HepG2 and Hep3B. **Cytotechnology.**, v. 67, n. 1, p. 1-12, 2015.
- RAOUL, J-L. *et al.* Systemic therapy for intermediate and advanced hepatocellular carcinoma: Sorafenib and beyond. **Cancer Treat Rev.**, v. 68, p. 16-24, 2018.
- RIBEIRO DE SOUZA, A.; REIG, M.; BRUIX, J. Systemic treatment for advanced hepatocellular carcinoma: the search of new agents to join sorafenib in the effective therapeutic armamentarium. **Expert Opin Pharmacother.** v. 17, n. 14, p. 1923-1936, 2016.

- RODRIGUES, D. A. *et al.* Design, synthesis, and pharmacological evaluation of novel n- acylhydrazones derivatives as potent histone deacetylase 6/8 dual inhibitors. **Journal of medicinal Chemistry**. v. xxx, p. xxx-xxx, 2016.
- RODRIGUES, D.A.; THOTA, S.; FRAGA, C. A. Beyond the Selective Inhibition of Histone Deacetylase 6. **Mini Rev Med Chem.**, v. 16, n 14, p. 1175-84, 2016.
- RODRIGUEZ, M. *et al.* Chemistry and biology of chromatin remodeling agents: state of art and future perspectives of HDAC inhibitors. **Curr. Med. Chem.**, v. 13, p. 1119-1139, 2006.
- RONINSON, I. B. *et al.* **Drug Resist. Updat.**, v. 4, p. 303–313, 2001.
- SCHMITT, C. A. *et al.* A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. **Cell**, v. 109, n. 3, p. 335-46, 2002.
- SCHULZE, K. *et al.* Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. **Nat. Genet.**, v. 44, p. 505–511, 2015.
- SCHULZE, K.; NAULT, J-C.; VILLANUEVA, A. Genetic profiling of hepatocellular carcinoma using next-generation sequencing. **J Hepatol.**, v. 65, p. 1031-42, 2016.
- SEWING, A. *et al.* High intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1. **Mol. Cell Biol.**, v. 17, p. 5588-5597, 1997.
- SHIH A. *et al.* Resveratrol induces apoptosis in thyroid cancer cell lines via a MAPK- and p53-dependent mechanism. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 87, p.1223–1232, 2002.
- SHIRAHARA, H.; YAMAMOTO, K.; NAMBA, M. Human hepatocyte carcinogenesis (review). **International Journal of Oncology**, v. 42, n. 4, p. 1133-1138, 2013.
- SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2018. **CA Cancer J Clin.**, v. 68, n. 1, p. 7-30, 2018.
- SINGH, S. *et al.* Chemopreventive strategies in hepatocellular carcinoma. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol.**, v. 11, n. 1, p. 45-54, 2014.
- SMITH J. *et al.* The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. **Adv Cancer Res.**, v. 108, p. 73-112, 2010.
- SMITS, V. A. J. *et al.* P21 Inhibits Thr161Phosphorylation of Cdc2 to Enforce the G2 DNA Damage Checkpoint. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 275, n. 39, p.30638-30643, 2000.
- SMITS, V.A., MEDEMA, R. H. Checking out the G2/M transition **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1519, p. 1–12, 2001.

SOMOZA, J. R. *et al.* Structural snapshots of human HDAC8 provide insights into the class I histone deacetylases. **Structure**, v. 12, p. 1325-1334, 2004.

SONG, Y. W.; LIM, Y.; CHO, S. K. 2,4-Di-tert-butylphenol, a potential HDAC6 inhibitor, induces senescence and mitotic catastrophe in human gastric adenocarcinoma AGS cells. **Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.**, v. 1865, n. 5, p. 675-683, 2018.

SPANGENBERG, H. C. *et al.* Targeted therapy for hepatocellular carcinoma. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol.**, v. 6, n. 7, p. 423-32, 2009.

STEFANELLI, C. *et al.* Caspase activation in etoposide-treated fibroblasts is correlated to ERK phosphorylation and both events are blocked by polyamine depletion. **FEBS Letters**, v. 527, n. 1-3, p. 223-28, 2002.

SUNG, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA CANCER J CLIN.**, v. 71, p. 209-249, 2021.

SUR, S.; AGRAWAL, D. K. Phosphatases and kinases regulating CDC25 activity in the cell cycle: clinical implications of CDC25 overexpression and potential treatment strategies. **Molecular and Cellular Biochemistry.**, v. 416, p. 36-46, 2016.

TAKESHITA, M. *et al.* Aurora-B overexpression is correlated with aneuploidy and poor prognosis in non-small cell lung cancer. **Lung Cancer**. v. 80, p. 85–90, 2013.

TANG, D. *et al.* ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. **J Biol Chem.**, v. 277, p. 12710–12717, 2002.

TAYLOR, W. R.; STARK, G. R. Regulation of the G2/M transition by p53. **Oncogene**, v. 20, p.1803–1815, 2001.

TIAN, Y. *et al.* Histone Deacetylase HDAC8 Promotes Insulin Resistance and b-Catenin Activation in NAFLD-Associated Hepatocellular Carcinoma. **Molecular and Cellular Pathobiology.**, v. 75, n. 22, p. 4803-4816, 2015.

TOTOKI, Y. *et al.* Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. **Nat. Genet.**, v. 46, p. 1267–1273, 2014.

TROJAN, J.; ZANGOS, S.; SCHNITZBAUER, A. A. Diagnostics and Treatment of Hepatocellular Carcinoma in 2016: Standards and Developments. **Visceral Medicine**, v. 32, p. 116-120, 2016.

TSUJI, N. *et al.* A new antifungal antibiotic, trichostatin. **Antibiot.**, v. 29, p. 1-6, 1976.

VAN LEUKEN R, CLIJSTERS L, WOLTHUIS R. To cell cycle, swing the APC/C. **Biochim Biophys Acta**. v. 1786, n. 1, p. 49-59, 2008.

- VAN VUGT, M. A.T. M.; BRÁS, A.; MEDEMA, R. H. Polo-like Kinase-1 Controls Recovery from a G2 DNA Damage-Induced Arrest in Mammalian Cells. **Molecular Cell**, v. 15, n. 5, p.799-811, 2004.
- VANAJA, G. R. *et al.* Overexpressed HDAC8 in cervical cancer cells shows functional redundancy of tubulin deacetylation with HDAC6. **Cell Communication and Signaling.**, v. 16, p. 20, 2018.
- VANNINI, A. *et al.* Substrate binding to histone deacetylases as shown by the crystal structure of the HDAC8-substrate complex. **EMBO Rep.**, v. 8, p. 879–884, 2007.
- VIGUSHIN, D. M. *et al.* Trichostatin A is a histone deacetylase inhibitor with potent antitumor activity against breast cancer in vivo. **Clin. Cancer Res.**, v. 7, p. 971-78. 2001
- VILLANUEVA, A. Hepatocellular carcinoma. **N. Engl. J. Med.**, v. 380, n. 15, p. 1450-1462, 2019.
- WANG, B. *et al.* Variations in the AURKA Gene: Biomarkers for the Development and Progression of Hepatocellular Carcinoma. **Int J Med Sci.** v. 15, p. 170–5, 2018.
- WANG, L. L. *et al.* AGL2 promotes cancer cell growth through IRGM-regulated autophagy and enhanced Aurora A activity in hepatocellular carcinoma. **Cancer Lett.** v. 414, p. 71–80, 2018.
- WANG, R. *et al.* Regulation of Cdc25C by ERK-MAP Kinases during the G2/M Transition. **Cell**, v. 128, p. 1119–1132, 2007.
- WANG, Y. *et al.* Developing selective histone deacetylases (HDACs) inhibitors through ebsele and analogs. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 11, p. 1369–1382, 2017.
- WEI, Y. *et al.* Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in Tetrahymena. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 95, p. 7480–7484, 1998.
- WEI, Y. *et al.* Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. **Cell**, v. 97, p. 99-109, 1999.
- WITT, O. *et al.* HDAC family: What are the cancer relevant targets? **Cancer Letters.** v.277, p. 8-21, 2009.
- WOESSMANN, W. *et al.* Ras-mediated activation of ERK by cisplatin induces cell death independently of p53 in osteosarcoma and neuroblastoma cell lines. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 50, p. 397–404, 2002.
- WORMS, M. A.; GALLE, P. R. Future perspectives in hepatocellular carcinoma. **Dig Liver Dis.**, v. 42, p. S302-9, 2010.

- WU, J. *et al.* The Up-Regulation of Histone Deacetylase 8 Promotes Proliferation and Inhibits Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma. **Digestive Diseases and Sciences.**, v. 58, n. 12, 2013.
- WU, Z. *et al.* Phosphorylated extracellular signal-regulated kinase up-regulated p53 expression in shikonin-induced HeLa cell apoptosis. *Chin Med J (Engl).*, v. 118, p. 671–677, 2005.
- WURMBACH, E. *et al.* Genome-wide molecular profiles of HCV-induced dysplasia and hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 45, p. 938–947, 2007.
- XU, R. *et al.* Association of human APOBEC3 cytidine deaminases with the generation of hepatitis virus B x antigen mutants and hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 46, p. 1810–1820, 2007.
- YANG, F. *et al.* The Development Process: from SAHA to Hydroxamate HDAC Inhibitors with Branched CAP Region and Linear Linker. **Chem Biodivers.**, v. 17, n. 1, 2020.
- YANG, Y. *et al.* MicroRNA-221 induces autophagy through suppressing HDAC6 expression and promoting apoptosis in pancreatic cancer. **Oncol. Lett.**, v. 16, p. 7295–7301, 2018.
- YOSHIDA, M. *et al.* Effects of trichostatins on differentiation of murine erythroleukemia cells. **Cancer Res.**, v. 47, p. 3688-3691, 1987.
- YUAN, J. *et al.* Cyclin B1 depletion inhibits proliferation and induces apoptosis in human tumor cells. **Oncogene**, v. 23, p. 5843–5852, 2004.
- ZHANG, J-M. *et al.* High replicative full-length lamivudine-resistant hepatitis B virus isolated during acute exacerbations. **Journal of Medical Virology**, v. 77, n. 2, p. 203-208, 2005.
- ZHANG, T. *et al.* Survivin-induced Aurora-B kinase activation: A mechanism by which APC mutations contribute to increased mitoses during colon cancer development. **Am J Pathol.** v. 177, p. 2816–26, 2010.
- ZHAO, Y. *et al.* Genomic alterations across six hepatocellular carcinoma cell lines by panel-based sequencing. **Transl Cancer Res**, v. 7, n. 2, p. 231-239, 2018.
- ZHOU, B-B. S.; ELLEDEGE, S. J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. **Nature**, v. 408, p. 433–439, 2000.
- ZHOU, G. *et al.* The protective effect of juglanin on fructose-induced hepatitis by inhibiting inflammation and apoptosis through TLR4 and JAK2/STAT3 signaling pathways in fructose-fed rats. **Biomed Pharmacother**, v. 81, p. 318-28, 2016.
- ZHU, A. X. *et al.* REACH-2: A randomized, double-blind, placebo-controlled Phase III study of ramucirumab versus placebo as second-line treatment in patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC) and elevated baseline alpha-fetoprotein (AFP) following first-line sorafenib. **J. Clin. Oncol.**, v. 36, p. 4003–4003, 2018.

ZUCMAN-ROSSI, J. *et al.* Genetic landscape and biomarkers of hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**, v. 149, p. 1226–1239, 2015.