



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas



Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Saúde
Gabriel Monteiro da Silva. 700. Centro. Alfenas. MG. 37130-000. F:3299-1300

AMANDA APARECIDA RIBEIRO ANDRADE

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DE DERIVADOS DO AAL-993 EM
MODELOS REPRESENTATIVOS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR**

ALFENAS/MG

2023

AMANDA APARECIDA RIBEIRO ANDRADE

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DE DERIVADOS DO AAL-993 EM
MODELOS REPRESENTATIVOS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR**

Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela
Universidade Federal de Alfenas.
Área de concentração: Fisiopatologia.
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Marisa Ionta

ALFENAS/MG

2023

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Andrade, Amanda Aparecida Ribeiro .

Avaliação do potencial antitumoral de derivados do AAL-993 em modelos representativos de carcinoma hepatocelular / Amanda Aparecida Ribeiro Andrade. - Alfenas, MG, 2023.

51 f. : il. -

Orientador(a): Marisa Ionta.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2023.

Bibliografia.

1. Carcinoma hepatocelular. 2. Hepatoma. 3. Bloqueio do ciclo celular. 4. Derivados N-acilidrazônicos. 5. Apoptose. I. Ionta, Marisa , orient. II. Título.

AMANDA APARECIDA RIBEIRO ANDRADE

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DE DERIVADOS DO AAL-993 EM MODELOS REPRESENTATIVOS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR

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

Aprovada em: 30 de de 2023

Profa. Dra. Marisa Ionta
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Prof. Dr. Evandro Luis de Oliveira Niero
Instituição: Universidade de Santo Amaro
UNIVA

Prof. Dr. Alexandre Ferro Aissa
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Marisa Ionta, Professor do Magistério Superior**, em 30/01/2023, às 16:34, 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 **Alexandre Ferro Aissa, Professor do Magistério Superior**, em 30/01/2023, às 16:51, 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 **Evandro Luís de Oliveira Niero, Usuário Externo**, em 02/02/2023, às 17:18, 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 **0908879** e o código CRC **15567040**.



Documento assinado digitalmente
AMANDA APARECIDA RIBEIRO ANDRADE
Data: 02/03/2023 13:45:25-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pelo dom da vida, por ter preparado meus pais para que me recebessem em uma família que me ama.

Aos meus pais, Sandra e Carlinhos, por seu amor incondicional e a dedicação dia e noite para que eu sempre pudesse realizar todos os meus sonhos e desejos. A minha irmã, Larissa, que foi o motivo inicial de eu querer me formar, de buscar a faculdade e me dedicar aos estudos.

A toda minha família, pelo suporte apesar da distância, a minha amada avó Luzia, pelos conselhos, risadas e por estar sempre presente.

Aos meus amigos, Ana Paula, Carla, Luziane, Izabella, Mayara, Bruno, Rebeka (estrela no céu), Priscila por estarem ao meu lado desde o início da faculdade de biomedicina e até hoje são meu ombro amigo e meu amparo.

Aos amigos que chegaram durante o mestrado que são essenciais na minha vida, Carolina, Asafe, Paula, Ingliith, Hellen, Fernanda, Camila, Luiza e todos os outros que sabem que são especiais para mim.

Aos professores que sempre me deram oportunidades na pesquisa e que despertaram este amor em mim. Pelo conhecimento que adquiri durante estes anos de estudos e profissão.

À professora Marisa, pela oportunidade de trabalhar com ela, por todo apoio e empenho em me orientar.

Aos meus colegas de laboratório, Carol, Julia, Bruno, Rafael e Luiza, vocês foram indispensáveis no meu processo de crescimento profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas a Saúde, por me receber tão bem e estar sempre preparado para auxiliar os alunos.

À UNIFAL por ter feito parte da minha vida profissional.

Sou muito grata pela oportunidade de ter conhecido e aprendido com cada um de vocês.

À FAPEMIG pela concessão da bolsa e ao CNPq pelo apoio financeiro.

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

RESUMO

O câncer de fígado representa a segunda causa de morte por câncer no sexo masculino e estima-se que, aproximadamente, um milhão de mortes ocorrerão até 2030 em decorrência desse tipo de câncer. O carcinoma hepatocelular (CHC) é o subtipo de tumor primário de fígado mais prevalente e, em geral, o diagnóstico é realizado em estágio avançado. As terapias são pouco efetivas e o arsenal terapêutico é extremamente limitado. O sorafenibe (Nexavar®), um inibidor de proteínas cinases, foi a única opção de tratamento para CHC em estágio avançado até 2018 quando o lenvatinibe foi aprovado. Contudo, a eficácia terapêutica de ambos os fármacos é modesta. Assim sendo, existe uma busca constante por novas substâncias potencialmente ativas contra o CHC. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de derivados *N*-acilidrazônicos (**LASSBio-2027**, **LASSBio-2029** e **LASSBio-2052**) obtidos a partir do arcabouço estrutural do AAL-993, um potente inibidor do receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2 (VEGFR2), sobre o comportamento proliferativo de células HepG2 e Hep3B, as quais são utilizadas como modelo para carcinoma hepatocelular (CHC). Os resultados mostraram que todos os derivados avaliados reduzem a viabilidade de células HepG2 e Hep3B, sendo o efeito dependente da concentração. Considerando os valores de IC₅₀, a atividade citotóxica de **LASSBio-2052** foi mais expressiva em relação a **LASSBio-2027** e **LASSBio-2029**. Foi demonstrado que **LASSBio-2052** inibe a proliferação de células HepG2 e Hep3B por modular a expressão de reguladores da transição G2/M. Houve redução na abundância de RNA mensageiro que codificam cinases importantes para a entrada na mitose, incluindo *AURKA* (*Aurora A*), *AURKB* (*Aurora B*), *PLK1* e *CDK1*. A expressão relativa de *FOXM1* também foi reduzida em resposta ao tratamento, o que compromete a ativação transcricional de genes necessários à transição G2/M. A atividade antiproliferativa de **LASSBio-2052** foi reforçada pela redução significativa nos níveis proteicos de ciclinas B e D, e pela redução de ERK fosforilada. Os dados obtidos mostram que **LASSBio-2052** tem promissora atividade antitumoral, contudo estudos adicionais devem ser realizados para identificar o alvo molecular associado à sua capacidade de reprimir concomitantemente a expressão de genes que regulam a transição G2/M.

Palavras-chave: carcinoma hepatocelular; hepatoma; bloqueio do ciclo celular; derivados *N*-acilidrazônicos; apoptose.

ABSTRACT

Liver cancer represents the second leading cause of cancer-related death in males, and it is estimated that approximately one million deaths will occur by 2030 due to this type of cancer. Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most prevalent primary liver cancer subtype and, in general, it is diagnosed in an advanced stage. The therapies are few effective and the therapeutic arsenal is very limited. Sorafenib (Nexavar®), a multikinase inhibitor, has been used since 2007 as the first-line drug for the treatment of advanced-stage HCC. In 2018, the lenvatinib was also approved for HCC treatment, however with modest therapeutic efficiency. In this scenario, there is a constant search for new substances potentially active against HCC. The present study aimed to evaluate the effects of *N*-acylhydrazone derivatives (**LASSBio-2027**, **LASSBio-2029** e **LASSBio-2052**) obtained from ALL-993 chemical scaffold, a potent inhibitor of vascular endothelial growth factor 2 (VEGFR2), on proliferative behavior of HepG2 and Hep3B cells, which have been widely used as study model for HCC. The results showed that all evaluated derivatives were effective in reducing cell viability in HepG2 and Hep3B cultures in a dose-dependent manner. Based on IC₅₀ values, the cytotoxic activity of **LASSBio-2052** was more prominent than **LASSBio-2027** and **LASSBio-2029**. It was demonstrated that **LASSBio-2052** inhibits the proliferation of HepG2 and Hep3B cells by modulating the expression of regulators of G2/M transition. There was a reduction in mRNA abundance for genes that encode important kinase proteins for mitosis entering, including *AURKA* (*Aurora A*), *AURKB* (*Aurora B*), *PLK1*, and *CDK1*. The relative expression of *FOXM1* was also reduced in response to treatment, which compromises the transcriptional activation of genes required for G2/M transition. The antiproliferative activity of **LASSBio-2052** was reinforced by significant reduction in cyclin D and cyclin B at protein levels, and pERK downregulation. Taken together, the data indicate that has promising antitumor activity, however, additional studies should be performed to identify the molecular target underlying its ability to suppress concomitantly the expression of regulatory genes of G2/M transition.

Keywords: hepatocellular carcinoma; hepatoma; cell cycle arrest; *N*-acylhydrazone derivatives; apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Taxas de mortalidade por câncer de fígado.....	13
Figura 2 –	Fatores de risco para o CHC e hepatocarginogênese....	14
Figura 3 –	Estadiamento e tratamento para CHC.....	17
Figura 4 –	Estrutura química dos derivados <i>N</i> -acilidrazônicos.....	23
Figura 5 –	Curvas dose-resposta (Hep3B).....	30
Figura 6 –	Curvas dose-resposta (HepG2).....	30
Figura 7 –	Análise morfológica.....	32
Figura 8 –	Curva de crescimento.....	33
Figura 9 –	Capacidade clonogênica.....	34
Figura 10 –	Análise de progressão do ciclo celular (HepG2).....	36
Figura 11 –	Análise de progressão do ciclo celular (Hep3B).....	37
Figura 12 –	Expressão gênica (RNA mensageiro) HepG2.....	39
Figura 13 –	Expressão gênica (RNA mensageiro) Hep3B.....	40
Figura 14 –	Expressão proteica HepG2.....	41
Figura 15 –	Expressão proteica Hep3B.....	41
Figura 16 –	Ensaio de Anexina V.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência de bases dos <i>primers</i> utilizados na PCR em tempo real..	26
Tabela 2 – Valores de IC ₅₀ (μM) de LASSBio-2027, 2029 e 2052	31

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1	CÂNCER DE FÍGADO.....	13
2.2	CARCINOMA HEPATOCELULAR.....	14
2.3	ESTADIAMENTO DO CARCINOMA HEPATOCELULAR.....	17
2.4	TRATAMENTO SISTÊMICO.....	18
3	OBJETIVOS.....	21
3.1	OBJETIVO GERAL.....	21
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1	LINHAGEM CELULAR E CONDIÇÕES DE CULTIV.....	22
4.2	OBTENÇÃO DOS DERIVADOS NAH.....	22
4.3	VIABILIDADE CELULAR.....	23
4.4	ENSAIO DE CAPACIDADE CLONOGÊNICA.....	24
4.5	ANÁLISE DO CICLO CELULAR.....	24
4.6	ANÁLISE DE ANEXINA V.....	25
4.7	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA.....	25
4.8	ANÁLISE DE EXPRESSÃO PROTEICA.....	26
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
6	CONCLUSÃO.....	44
	REFERÊNCIAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

O câncer representa um problema de saúde pública mundial e representa a segunda causa de morte. O câncer de fígado é altamente letal, sendo a terceira causa de morte por câncer, ao considerar indivíduos de ambos os sexos, e a segunda causa de morte entre indivíduos do sexo masculino (SUNG *et al.*, 2021; WHO, 2020). Dentre os tumores primários de fígado, o carcinoma hepatocelular (CHC) é prevalente e corresponde a cerca de 75-85% dos casos diagnosticados (VILLANUEVA *et al.*, 2019).

Os fatores de risco para o CHC são bem estabelecidos e envolvem consumo excessivo de álcool, infecção pelos vírus da hepatite B e C, ingestão de aflatoxina B1 e esteatose hepática, que está associada à resistência insulínica e à síndrome metabólica (MCGLYNN; PETRICK; EL-SERAG, 2021; TURKES; CHAU, 2019). O conhecimento acerca dos fatores envolvidos nos processos de hepatocarcinogênese e progressão tumoral é importante para a implementação de estratégias de prevenção e identificação de alvos terapêuticos para o CHC (SHIMADA *et al.*, 2019).

As terapias potencialmente curativas são aplicadas somente quando a doença é diagnóstica em fase inicial, o que não ocorre na maioria dos casos. Os pacientes que apresentam a doença em estágio intermediário são tratados com terapias locoregional, ao passo que os pacientes com CHC em estágio avançado podem se beneficiar de terapias sistêmicas (LLOVET *et al.*, 2016).

O arsenal terapêutico para CHC é extremamente restrito. O sorafenibe, um inibidor de proteínas cinases, foi aprovado para tratamento de CHC em estágio avançado em 2007 e permaneceu como fármaco de primeira escolha por mais de dez anos (RODERBURG *et al.*, 2020). Muitos estudos foram realizados para avaliar a eficácia terapêutica de outras substâncias, contudo, os resultados foram desanimadores. Em 2018, o lenvatinibe (inibidor de receptores tirosina) foi aprovado para ser utilizado no tratamento de CHC, embora a eficácia terapêutica seja modesta em reação ao sorafenibe (FORNER, REIG, BRUIX, 2018). Atualmente, a imunoterapia tem sido usada isoladamente ou em esquema de combinação com outras substâncias como uma alternativa para o tratamento de CHC. Dados preliminares de ensaios clínicos mostram que essas substâncias têm melhor tolerabilidade, mas não melhoram a sobrevida global dos pacientes. Neste cenário, é

muito importante identificar novas substâncias que possam melhorar as propostas terapêuticas para o CHC.

Estudos realizados previamente pelo nosso grupo de pesquisa, identificou substâncias (**LASSBio-2027**, **2028**, **2029**, **2052**) capazes de inibir a atividade catalítica do receptor para o fator de crescimento endotelial vascular 2 (VEGFR2) e, por consequência, a neovascularização em membrana corio-alantóica de embriões de *Gallus domesticus* (PAULI *et al.*, 2020). Dados da literatura mostram que substâncias capazes de inibir VEGFR2 podem inibir também a proliferação de células tumorais. Assim sendo, é interessante avaliar os efeitos dessas substâncias sobre o comportamento proliferativo de células derivadas de CHC.

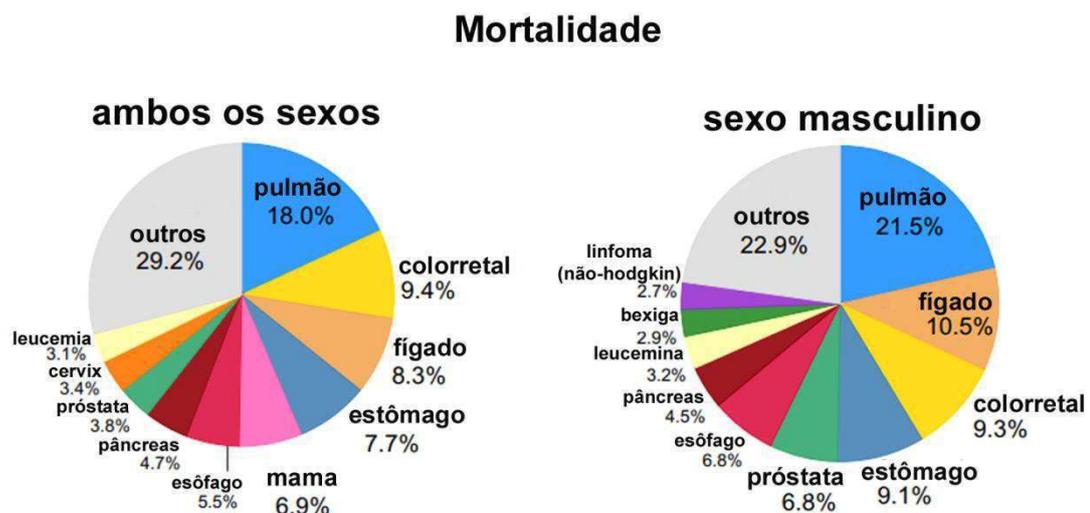
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CÂNCER DE FÍGADO

De acordo com dados do GLOBOCAN, o câncer de fígado representa a segunda causa de morte por câncer no sexo masculino e a terceira causa de morte considerando ambos os sexos (SUNG *et al.*, 2021) (Figura 1). De acordo com projeções feitas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que aproximadamente 1 milhão de pessoas morrerão em consequência do câncer hepático até 2030. A taxa de sobrevivência de 5 anos é extremamente baixa (cerca de 10%), indicando alta letalidade desse tipo de câncer (SARVEAZAD *et al.*, 2019).

Dentre os cânceres primários de fígado, o carcinoma hepatocelular (CHC) é prevalente e compreende cerca de 85% dos casos diagnosticados. As taxas de incidência de CHC variam de acordo com a região geográfica considerada. Em geral, a incidência é maior em países em desenvolvimento, bem como em regiões endêmicas para o vírus da hepatite B (VILLANUEVA; LONGO, 2019). No Brasil, a exemplo do que acontece no mundo, os homens são mais acometidos pela doença em relação as mulheres, e cerca de 90% dos casos apresentam associação com quadro cirrótico (VIANNA *et al.*, 2014).

Figura 1 - Taxas de mortalidade por câncer.



Fonte: Modificada de SUNG *et al.*, 2021.

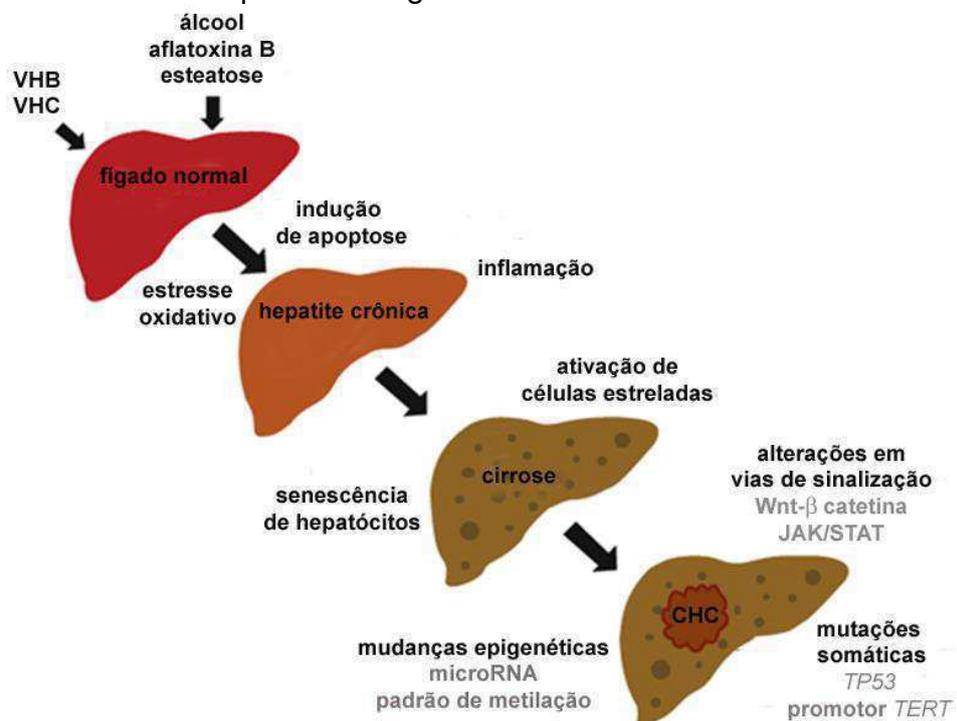
Nota: Taxas de mortalidade por câncer em ambos os sexos e no sexo masculino.

2.2 CARCINOMA HEPATOCELULAR (CHC)

O fígado normal é constituído pelas células parenquimatosas, os hepatócitos, que representam 60% da população celular no fígado, e células não parenquimatosas (células de Kupffer e células estreladas). Além disso, estão as células que revestem os canalículos biliares e as células endoteliais que revestem os capilares sinusóides. O carcinoma hepatocelular e o colangiocarcinoma intra-hepático representam, aproximadamente, 85% e 15% dos tumores primários de fígado, respectivamente (LLOVET *et al.*, 2016)

O processo de hepatocarcinogênese é complexo e envolve múltiplos estágios que são acompanhados de alterações genéticas e epigenéticas (Figura 2). A inflamação crônica, ativação de proliferação celular, resistência a apoptose e o estabelecimento de células-tronco tumorais são os principais eventos associados ao desenvolvimento do CHC.

Figura 2 - Principais fatores de risco associados ao carcinoma hepatocelular e eventos relacionados ao processo de hepatocarcinogênese.



Fonte: Modificado de Hoshikawa; Ueno, 2019.

Nota: VHB, vírus da hepatite B; VHC, vírus da hepatite C; CHC, carcinoma hepatocelular.

Dentre as alterações genéticas observadas em CHC, as mais comuns envolvem mutações nos genes *TERT*, *TP53*, *CTNNB1* e *AXIN1*. O gene *TERT* codifica a subunidade catalítica da enzima telomerase (TERT), responsável pela manutenção das sequências teloméricas a cada ciclo de divisão. *TP53* codifica a proteína supressora de tumor p53 que, em condições fisiológicas normais, está associada a eventos biológicos que mantêm a integridade genômica e elimina células que apresentam danos irreparáveis no DNA. Os genes *CTNNB1* e *AXIN1* codificam, respectivamente, as proteínas β -catenina e axina que participam da via de sinalização Wnt/ β -catenina, a qual está associada à modulação de vários processos biológicos, incluindo proliferação e diferenciação. Em média, 26% dos casos de CHC possuem mutações no gene *TP53*, contribuindo para instabilidade genômica, frequentemente observada em células tumorais, e resistência aos sinais supressores de crescimento (LONG *et al.*, 2019). Em cerca de 60 % dos casos é observado mutações na região promotora do gene *TERT*. Além disso, a reativação da atividade da telomerase em CHC está associada a eventos de amplificação (5%) e translocação (2-3%). Mutações nos genes *CTNNB1* e *AXIN1* são observadas em, aproximadamente, 30% e 10% dos casos de CHC, respectivamente (VILLANUEVA, 2019).

Com relação às alterações epigenéticas, a hipermetilação representa o principal evento relacionado ao desenvolvimento de CHC. Tem sido descrito que a inativação das vias de sinalização que regulam negativamente a proliferação celular (RB/p16^{INK4} e p53/p14^{ARF}) está associada à hipermetilação na região promotora do gene *CDKN2A* que codifica, por *splicing* alternativo, as proteínas p14^{ARF} e p16^{INK4} (LEE *et al.*, 2016).

Os fatores de risco para o CHC são bem estabelecidos (Figura 2) e incluem infecções pelos vírus das hepatites B (VHB) e C (VHC), consumo excessivo de álcool, ingestão de aflatoxina B1 e síndrome metabólica associada ao diabetes e obesidade (LLOVET *et al.*, 2016; MARTIN; HERCEG, 2012). Cerca de 80-90% dos CHC evoluem a partir de cirrose, uma condição decorrente de danos crônicos ao fígado e fibrose (MARQUARDT; ANDERSEN; THORGEIRSSON, 2015; SANYAL; YOON; LENCIONI, 2010). Ao passo que 10% dos CHC se desenvolvem em pacientes não cirróticos, cujos fatores de risco incluem infecções pelo adenovírus tipo 2 (VAA2) ou VHB, consumo de aflatoxina B1 e obesidade (NAULT *et al.*, 2015;

REBOUISSOU; NAULT; 2020). Uma porcentagem dos CHCs que se desenvolvem na ausência de cirrose apresenta ativação dos genes *CCNE1* (ciclina E1) e *CCNA2* (ciclina A2). Esse evento tem sido associado à inserção viral (VAA2 ou CHB) e rearranjos cromossômicos (LLOVET *et al.*, 2016).

A infecção pelo vírus da hepatite B ou C representa um importante fator de risco para o desenvolvimento do CHC. Frequentemente o genoma do vírus da hepatite B integra-se ao genoma causando alterações no fenótipo da célula hospedeira. Além disso, a expressão da proteína viral HBx interfere com uma variedade de substratos e vias oncogênicas de sinalização que são críticas no processo de hepatocarcinogênese e progressão tumoral. Estudos mostram que a proteína HBx inibe a atividade da proteína supressora de tumor p53 levando a resistência das células infectadas aos sinais indutores de apoptose (LLOVET *et al.*, 2016).

Os CHCs são agrupados em 2 classes (proliferativa e não proliferativa) considerando de forma integrada as características moleculares, clínico-histopatológicas e etiológicas. Os CHCs classificados como “proliferativo” são tumores agressivos, pouco diferenciados, que apresentam instabilidade genética e ativação de vias oncogênicas como RAS/RAF/MEK/ERK e PI3K/AKT/mTOR. Tumores com essas características são comumente encontrados em pacientes que apresentam infecção viral (hepatite B). Os tumores classificados como “não proliferativo” são tumores mais diferenciados que apresentam mutações em *CTNNB1*, contudo o perfil de expressão gênica é semelhante ao observado para hepatócitos. Esses tumores têm sido associados à infecção por VHC e consumo excessivo de álcool (REBOUISSOU; NAULT; 2020; ZUCMAN-ROSSI *et al.*, 2015).

Estudos mostram que o CHC é altamente heterogêneo, o que dificulta o diagnóstico preciso e limita a eficiência terapêutica (DAGOGO-JACK; SHAW, 2018). A heterogeneidade intratumoral envolve a presença de vários subclones celulares com características genéticas distintas no mesmo nódulo tumoral, ao passo que a heterogeneidade intertumoral se caracteriza pela presença de vários nódulos com diferenças genéticas e moleculares. O último caso pode ser decorrente da formação de novas lesões malignas (carcinogênese *de novo*) ou devido à formação de metástase intrahepática a partir do tumor primário (BARCENA-VARELA; LUJAMBIO, 2021; DING *et al.*, 2019; NAULT; VILLANUEVA, 2015). A heterogeneidade tumoral e

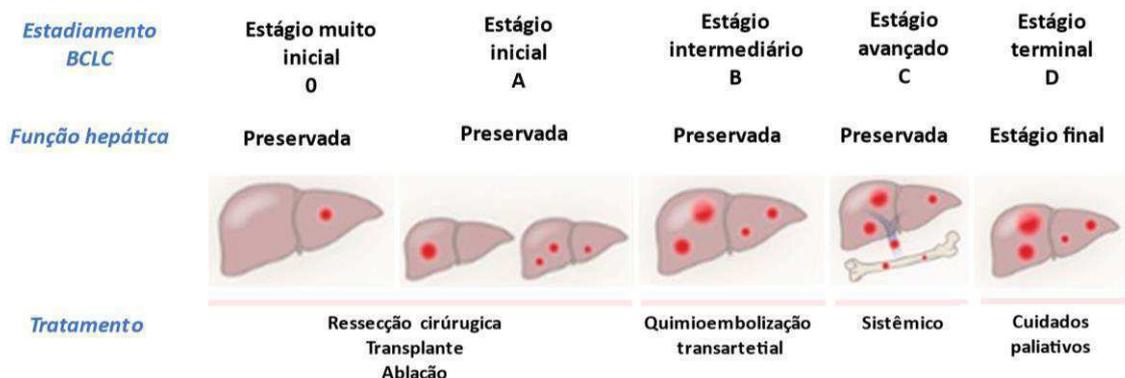
a complexidade do microambiente tumoral representam fatores importantes para à resistência aos diferentes fármacos utilizados no tratamento sistêmico de CHC.

2.3 ESTADIAMENTO DO CARCINOMA HEPATOCELULAR

Um estadiamento feito corretamente é fundamental para o delineamento apropriado do protocolo de tratamento. As diretrizes de estadiamento estabelecidas pelo grupo de Barcelona (*Barcelone Clinic Liver Cancer - BCLC*) são amplamente utilizadas para estadiamento do CHC (Figura 3).

Os parâmetros utilizados pelo *BCLC* incluem o tamanho e quantidade de tumores no fígado, a funcionalidade do órgão, a presença de trombos e ascites e o estado geral do paciente. Dessa forma, o estadiamento é feito em 5 níveis principais 0 (estágio muito inicial), A (estágio inicial), B (estágio intermediário), C (estágio avançado) ou D (estágio terminal) (LLOVET *et al.*, 2016). Recentemente, essas diretrizes foram revisadas para realizar um refinamento no estadiamento do estágio intermediário (TSILIMIGRAS *et al.*, 2022).

Figura 3 - Estadiamento e propostas terapêuticas para o carcinoma hepatocelular de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo grupo *BCLC* (*Barcelone clinic liver cancer*).



Fonte: Modificado de Villanueva, 2019.

Cerca de 40 a 50% dos pacientes com CHC são diagnosticados em estágios iniciais (*BCLC-0* ou *BCLC-A*) e são direcionados para ressecção cirúrgica, transplante hepático e ablação percutânea por radiofrequência. Contudo,

aproximadamente 70% deles tem recidiva em até cinco anos e não existem terapias adjuvantes disponíveis para prevenir a recorrência da doença.

Os pacientes diagnosticados em estágio intermediário (*BCLC-B*) são elegíveis para terapia loco regional (TACE, *transarterial chemoembolization*), com média de sobrevivência de 2 anos (Villanueva *et al.*, 2019). Com a revisão das diretrizes de estadiamento feito pelo *BCLC* em 2022, esses pacientes podem ser direcionados para o transplante ou tratamento sistêmico como alternativas terapêuticas à quimioembolização (TSILIMIGRAS *et al.*, 2022).

Os pacientes, cujo diagnóstico é realizado em fase avançada da doença (*BCLC-C*), o que corresponde a 40% dos casos diagnosticados, podem ser beneficiados pela terapia sistêmica (MONTIRONI *et al.*, 2019; VILLANUEVA, 2019).

2.4 TRATAMENTO SISTÊMICO

Como mencionado anteriormente, o estadiamento do tumor é essencial para a definição das propostas terapêuticas para o CHC e o tratamento sistêmico é indicado para os casos em que a doença é diagnosticada em fase avançada (VILLANUEVA *et al.*, 2019; TSILIMIGRAS *et al.*, 2022).

O tratamento sistêmico para o CHC inclui o uso de inibidores de proteínas cinases e anticorpos monoclonais. O sorafenibe (Nevaxar®) foi aprovado em 2007 devido a sua capacidade de aumentar a sobrevida dos pacientes em 3 meses. Entre 2007 e 2018, o sorafenibe foi usado como única opção para tratamento sistêmico. Em 2018, o lenvatinibe foi aprovado como fármaco de primeira escolha (EASL, 2018), pois os estudos clínicos mostraram que sua eficiência terapêutica não foi inferior à observada para o sorafenibe. Ambos os fármacos são inibidores de múltiplas proteínas cinases. O sorafenibe inibe os receptores dos fatores de crescimento endotelial vascular 2 (VEGFR2) e derivado de plaquetas β (PDGF β), o receptor MET e a serina-treonina cinase RAF, um membro da via das MAPKs (*mitogen activated protein kinases*). O lenvatinibe atua sobre VEGFR 1-3, receptores dos fatores de crescimento de fibroblastos 1, 2, 3 e 4 (FGFR 1-4) e os receptores KIT e MET (LLOVET, 2014; KUDO *et al.*, 2018; MONTIRONI *et al.*, 2019).

A partir de 2018, outros inibidores de proteínas cinases e anticorpos monoclonais foram aprovados como fármacos de segunda escolha para tratar

pacientes resistentes ao sorafenibe, os quais incluem regorafenibe (Stivarga®), cabozantinibe (Cabometyx®), ramucirumab (Cyramza®) e nivolumab (Opdivo®). O regorafenibe e o cabozatinibe são inibidores de proteínas cinases, enquanto ramucirumab e o nivolumab são anticorpos monoclonais que atuam sobre VEGFR2 e PD-1, respectivamente (MONTIRONI *et al.*, 2019; VILLANUEVA, 2019). A resistência tumoral representa um grande obstáculo para o sucesso das propostas terapêuticas. Nesse sentido, é necessário ampliar o arsenal terapêutico e avaliar a eficácia de protocolos que empregam a combinação de diferentes fármacos. Recentemente, foi aprovado o uso combinado de atezolizumab (Telentriq®) (anti-VEGFR2) e bevacizumab (Avastin®) (anti-PD-1) para tratamento de CHC (FINN *et al.*, 2020).

Apesar da introdução de novos fármacos para o tratamento do CHC, a taxa de sobrevida em 5 anos ainda é muito baixa, correspondendo a 10% para os tumores locais e 3% para os tumores metastáticos (CONNELL *et al.*, 2016; FINN *et al.*, 2020), o que motiva a busca constante por novos agentes capazes de melhorar as propostas terapêuticas para o CHC.

Em estudo prévio realizado pelo nosso grupo de pesquisa, derivados *N*-acilidrazônicos (NAH) foram sintetizados com o objetivo de identificar substâncias com atividade antiangiogênica (**LASSBio-2026, 2027, 2028, 2029, 2051, 2052, 2053 e 2054**). Esses derivados foram planejados usando o AAL-993 como protótipo, um potente inibidor de VEGFR2. No planejamento desses derivados, o grupo pirimidina e o espaçador amídico do AAL-933 foram substituídos, respectivamente, pela isovanilina e o fragmento *N*-acilidrazônico, e diferentes substituintes foram inseridos no grupo aril.

Dentre os derivados obtidos, **LASSBio-2027, 2028, 2029 e 2052** inibiram significativamente a atividade catalítica de VEGFR2 e reduziram a neovascularização, induzida por VEGFA, em membrana corio-alantoica de embriões *Gallus domesticus* (PAULI *et al.*, 2020). De acordo com alguns estudos, agentes capazes de inibir VEGFR2 podem inibir a proliferação de células tumorais (EL-DASH *et al.*, 2021; LU *et al.*, 2016; MOHAMED *et al.*, 2019; NIU *et al.*, 2021), de modo que o potencial farmacológico dessas substâncias pode ser mais amplo e não restrito à atividade antiangiogênica. Dessa forma, seria interessante avaliar a influência de

LASSBio-2027, 2028, 2029 e 2052 sobre o comportamento proliferativo de modelos representativos de CHC.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antitumoral de derivados *N*-acilidrazônicos (NAH) usando como modelo de estudo linhagens celulares que são representativas de carcinoma hepatocelular.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) avaliar a influência das substâncias sobre o comportamento proliferativo de células HepG2 e Hep3B e selecionar a substância mais ativa;
- b) investigar possível influência sobre a progressão do ciclo celular e caracterizar os mecanismos moleculares associados;
- c) avaliar a atividade pró-apoptótica da substância selecionada;
- d) investigar modulação das vias de sinalização que regulam proliferação e sobrevivência celular.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LINHAGEM CELULAR E CONDIÇÕES DE CULTIVO

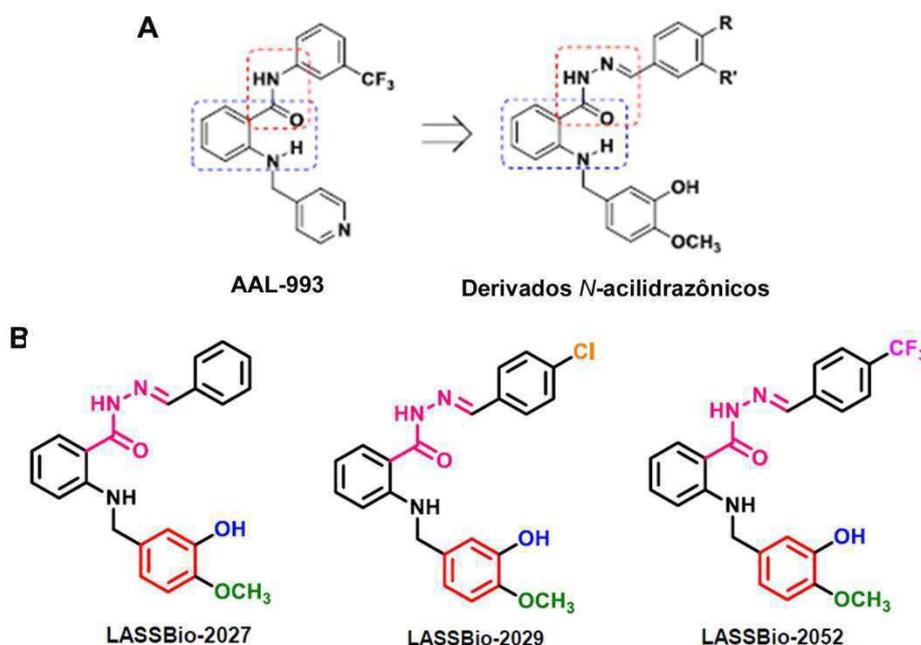
Foram utilizadas as linhagens Hep3B e HepG2, as quais foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). A linhagem Hep3B é derivada de um indivíduo negro (sexo masculino, 9 anos de idade) com carcinoma hepatocelular. A linhagem HepG2 é derivada de um indivíduo caucasiano (sexo masculino, 15 anos de idade) com carcinoma hepatocelular. Fibroblastos primários derivados de fragmentos de pele humana normal foram incluídos no estudo como referência de células não-transformadas. As culturas primárias foram gentilmente cedidas pelo prof. Dr. Angel Mauricio Castro Gamero do Instituto de Ciências da Natureza (ICN) da UNIFAL-MG (aprovação do comitê de ética consta no processo 2.082.524).

As culturas foram mantidas em Meio Mínimo de *Eagle* modificado por Dulbecco (DMEM/F12, Sigma, CA, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Cultilab, SP, Brasil) em atmosfera controlada (37°C, 95% de ar e 5% de CO₂). As subculturas foram feitas regularmente a cada 2 ou 3 dias. Os estoques foram mantidos em nitrogênio líquido.

4.2 SÍNTESE DOS DERIVADOS *N*-acilidrazônicos (NAH)

Os derivados NAH (**LASSBio-2027**, **2029** e **2052**) foram sintetizados no Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio) da Universidade Federal do Rio de Janeiro e cedidas, gentilmente, pelo Prof. Dr. Eliezer Jesus de Lacerda Barreiro (Figura 4). As substâncias foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) para obtenção de soluções-estoque (20,0 mM). Subseqüentes diluições foram feitas em meio de cultura imediatamente antes do uso. A quantidade de DMSO não excedeu 0,5% (v/v) nas abordagens experimentais realizadas para avaliar as atividades antiproliferativa e pró-apoptótica da substância-líder.

Figura 4 – Estrutura química dos derivados *N*-acilidrazônicos, os quais foram obtidos a partir de modificações estruturais do AAL-993.



Fonte: Modificado de Pauli *et al.*, 2020.

Nota: O AAL-993 foi usado como protótipo para a obtenção dos derivados *N*-acilidrazônicos (A). As modificações estruturais envolvem: i) substituição da pirimidina pelo núcleo de isovanilina; ii) substituição do grupamento amídico pelo grupamento *N*-acilidrazônico (vermelho); e iii) modificações sequenciais nos substituintes ligados ao grupo aril. No presente estudo, a atividade antiproliferativa de **LASSBio-2027**, **LASSBio-2029** e **LASSBio-2052** (B) foi avaliada frente a linhagens derivadas de carcinoma hepatocelular

4.3 VIABILIDADE CELULAR

A taxa de viabilidade celular foi determinada por ensaio colorimétrico usando a sulforrodamina B (SRB). As células foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de $1,0 \times 10^4$ células/poço. As culturas foram tratadas com os derivados NAH (0 - 200,0 μ M) por 48 horas. Ao final do tempo de tratamento, as células foram fixadas com ácido tricloroacético (10%) e coradas por com SRB (0,4%) por uma hora. O excesso da SRB foi removido por lavagens com ácido acético (1%). A SRB estavelmente ligada às proteínas foi solubilizada em solução de Tris (10 mM) e as amostras foram analisadas em espectrofotômetro a 540 nm com referência de 690.

Os valores apresentados correspondem a média \pm desvio padrão (DP) de três experimentos independentes realizados em quadruplicata. Os valores de IC₅₀ (concentração necessária para inibir 50% do crescimento) foram determinados

utilizando o software GraphPad Prism® 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

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 24 horas, as culturas foram tratadas com a substância de interesse por 48 horas. Decorrido o período de tratamento, o meio foi substituído por meio fresco e as amostras permaneceram em cultura 12 ou 13 dias dependendo da linhagem celular. As amostras foram fixadas (metanol PA, Sigma por 30 minutos) e, após secagem, foram coradas com cristal violeta (5 minutos).

A quantificação das colônias foi realizada com auxílio de estereomicroscópico (aumento 20x). Na análise, somente as colônias contendo mais de 50 células foram consideradas e os dados apresentados correspondem a média \pm desvio padrão (DP) de três experimentos independentes, os quais foram realizados em duplicata.

4.5 ANÁLISE DE PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR

A dinâmica de progressão do ciclo celular foi avaliada por citometria de fluxo. As células foram semeadas em placa com 35 mm com densidade de $1,0 \times 10^5$ células/poço. Após adesão (24 horas), as células foram tratadas por 48 horas e coletadas por digestão enzimática (solução de tripsina-EDTA, Sigma). Após centrifugação (5 minutos a $200 \times g$), o precipitado de células foi homogeneizado em PBS e as amostras foram fixadas com etanol (75% em PBS) a 4° C por 24 horas. Após nova centrifugação, as células foram coradas por 1 hora em uma solução contendo PBS (*phosphate-buffered saline*), RNase (1,5 mg/mL) e iodeto de propídio (90 μ g/mL) (Guava Technologies-Merck Millipore). A análise foi realizada em citômetro de fluxo (Guava Mini EasyCyte, 8HT) usando o software GuavaSoft 2.7. Os dados apresentados representam a média \pm desvio padrão (DP) de três experimentos independentes realizados em duplicata.

4.6 ENSAIO DE ANEXINA V – DETERMINAÇÃO DE APOPTOSE

A determinação na frequência de células apoptóticas foi realizada pelo ensaio de Anexina V usando o kit anexina V-FITC/7-AAD (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, EUA) de acordo com instruções do fabricante. As células Hep3B e HepG2 foram tratadas com as substâncias **LASSBio-2026** e **LASSBio-2052** por 48 horas. As concentrações utilizadas foram correspondentes ao IC₅₀ e IC₅₀/2. Ao término do tratamento, as células foram coletadas por digestão enzimática e as amostras foram centrifugadas (200 x *g* por 5 minutos), lavadas em PBS e homogeneizadas em solução contendo anexina V-FITC e iodeto de propídeo (IP). Após 20 minutos, as amostras foram analisadas no citômetro fluxo. Os dados apresentados representam a média ± desvio padrão (DP) de três experimentos independentes realizados em duplicata.

4.7 EXPRESSÃO GÊNICA – QUANTIFICAÇÃO DE RNA MENSAGEIRO

A abundância relativa de RNAm para *CCNB1*, *CDKN1A*, *CDK1*, *PLK1*, *BAX*, *BCL-2*, *AURKA* e *AURKB* (Tabela 1) foi avaliada por qPCR. As células foram semeadas em placas de 35 mm de diâmetro a uma densidade de 2,0 x 10⁵ células por placa. Após 24 horas de tratamento, as células foram coletadas por digestão enzimática e a suspensão celular foi centrifugada (200 x *g*, 5 minutos a 4 °C). O precipitado de células foi homogeneizado em 350 µL de tampão de lise e 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 µL 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), e 1 µg de RNA total foi usado na reação de transcrição reversa (RT) usando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription*® (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante (25 °C por 10 min, 37 °C por 120 min e 85 °C por 5 min para a inativação da enzima).

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

Gene	Sequência do primer
<i>AURKA</i>	F 5'- TCTTCACAGGAGGCAAATCCA-3' R 5'-AATAAGTTACACACTCACTCAGGTA-3'
<i>AURKB</i>	F 5'-AAAGAGCCTGTCACCCCATC-3' R 5'-CGCCCAATCTCAAAGTCATC-3'
<i>PLK1</i>	F 5'-CCTGCACCGAAACCGAGTTAT-3' R 5'-CCGTCATATTCGACTTTGGTTGC-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 R5'- CCTATACTCCAAATGTCAACTG
<i>FOXM1</i>	F: 5'-TGCCCAGCAGTCTCTTACCT-3' R: 5'-CTACCCACCTTCTGGCAGTC-3'
<i>ACTB</i>	F 5'- AGAGCTACGAGCTGCCTGAC-3' R 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG – 3'

Fonte: Do autor

A abundância de RNAm dos genes alvos foi investigada através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, utilizando o termociclador ABI Prism7500® (Applied Biosystems) e o kit de amplificação *Power Syber Green Master Mix*® (Applied Biosystems). Os níveis de expressão dos genes alvos foram normalizados usando β -actina. A abundância relativa de RNAm de cada gene foi calculada utilizando o método $\Delta\Delta C_t$ com correção de eficiência usando uma amostra controle como referência (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). Os dados apresentados representam a média \pm erro da média a partir de 4 experimentos independentes.

4.8 EXPRESSÃO PROTEICA

A expressão proteica foi avaliada por *imunoblot*. 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

desoxicolato de sódio 1% em Tris-HCL 50 mM, pH= 7,5) contendo inibidores de protease e fosfatase (Sigma). Após centrifugação (12000 g) por 10 minutos, o sobrenadante foi coletado e a quantificação de proteínas realizada pelo método BCA (GE Healthcare). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (562 nm).

As amostras foram diluídas em tampão de amostra 4x (Tris 0,5 M – pH 6,8, 4 ml de glicerol, SDS 10%, azul de bromofenol 1% e betamercaptoetanol 1% em água deionizada) e desnaturadas por 5 minutos (100 °C). O fracionamento das proteínas foi realizado em minigel de poliacrilamida 12% com SDS (2,5 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 5 minutos para verificar a eficiência da transferência. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes em água destilada. 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 temperatura ambiente, sob agitação.

As membranas foram incubadas com os anticorpos de interesse (ciclina B; α -tubulina, ERK e fosfo-ERK) por 12 horas a 4 °C. Após sucessivas lavagens com TBS e TTBS (tampão tris-salina acrescido de 0,1% de tween 20), as membranas foram incubadas com anticorpos secundários anti-IgG de camundongo ou de coelho (1:1000) conjugado com peroxidase (Amersham Pharmacia) por 2 horas a 27 °C, sob agitação. Então as membranas foram lavadas novamente e revelada por quimioluminescência (ECL®, Amersham Pharmacia) conforme especificações do fabricante. Um protocolo de marcação foi seguido para detectar bandas imunorreativas para diferentes anticorpos. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes. A quantificação das bandas imunorreativas foi realizada por meio de um programa público (Bio-Rad Software Image Lab). Os dados apresentados representarão a média \pm desvio padrão (DP) de três experimentos independentes.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

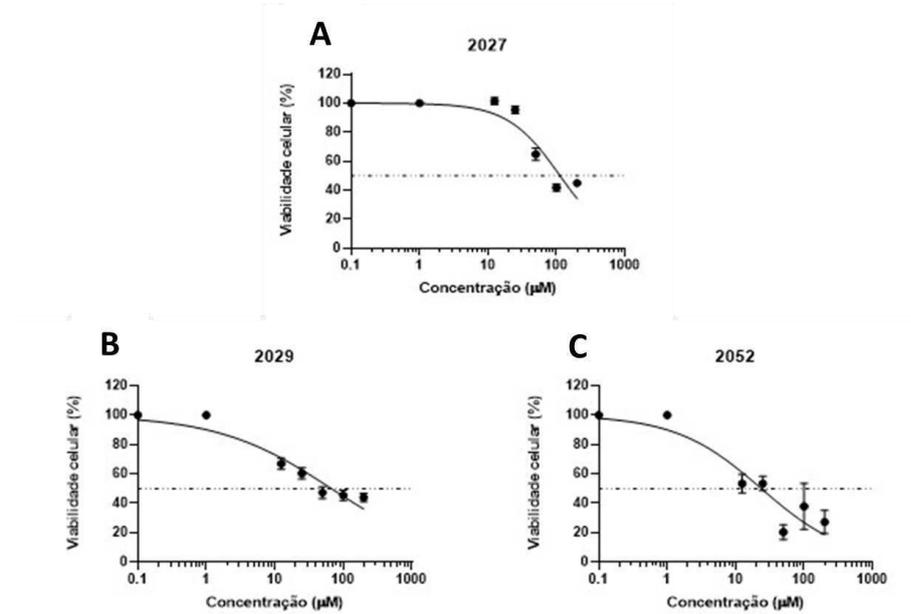
As diferenças significativas foram avaliadas de acordo com ANOVA e pós-teste de Dunnet ou Tukey dependendo da abordagem utilizada. Os dados apresentados representam a média \pm desvio padrão ou a média \pm erro da média de, pelo menos, 3 experimentos independentes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, derivados *N*-acilidrazônicos foram avaliados quanto sua capacidade de inibir proliferação de células derivadas de carcinoma hepatocelular (Hep3B) e de hepatoma (HepG2), as quais são amplamente utilizados como modelo de estudo (ARZUMANIAN *et al.*, 2021). Ambas as linhagens apresentam mutações frequentemente observadas em carcinoma hepatocelular, incluindo mutações no exon 3 do gene *CNNB1* (codifica a β -catenina) e mutações no promotor do gene *TERT* (codifica a subunidade catalítica da enzima telomerase) (ARZUMANIAN *et al.*, 2021). Contudo, a linhagem HepG2 carrega a forma selvagem do gene *TP53* (que codifica a proteína supressora de p53), ao passo que a linhagem Hep3B não expressa esse gene devido à deleção de ambos os alelos (Lee; KWON, 2019; MITRY *et al.*, 1997). A linhagem Hep3B apresenta o genoma do vírus da hepatite B integrado em seu genoma (LEE *et al.*, 1999; LIAN *et al.*, 2006), sendo representativa de tumores agressivos e de difícil tratamento (LEVRERO; ZUCMAN-ROSSI, 2016).

Os ensaios de viabilidade mostraram que os derivados NAH reduzem a taxa de viabilidade em culturas Hep3B e HepG2 após 48 horas de tratamento (Figuras 5 e 6). O efeito foi dependente da concentração utilizada e os valores de IC₅₀ (concentração necessária para inibir 50% do crescimento) foram determinados a partir das curvas dose-resposta (Tabela 2). A substância **LASSBio-2052** reduziu a viabilidade com maior eficiência em relação aos demais derivados NAH avaliados. Os valores de IC₅₀ de **LASSBio-2052** foram, aproximadamente, 20 μ M e 40 μ M para as linhagens HepG2 e Hep3B, respectivamente. A atividade citotóxica dos derivados NAH também foi avaliada frente a fibroblastos derivados de pele humana normal, contudo os resultados mostraram que essas substâncias são muito menos citotóxicas para as células normais em relação às células tumorais (Tabela 2). Os dados preliminares indicam que as substâncias estudadas são seletivas para as células tumorais e que **LASSBio-2052** representa um protótipo promissor para futuras investigações.

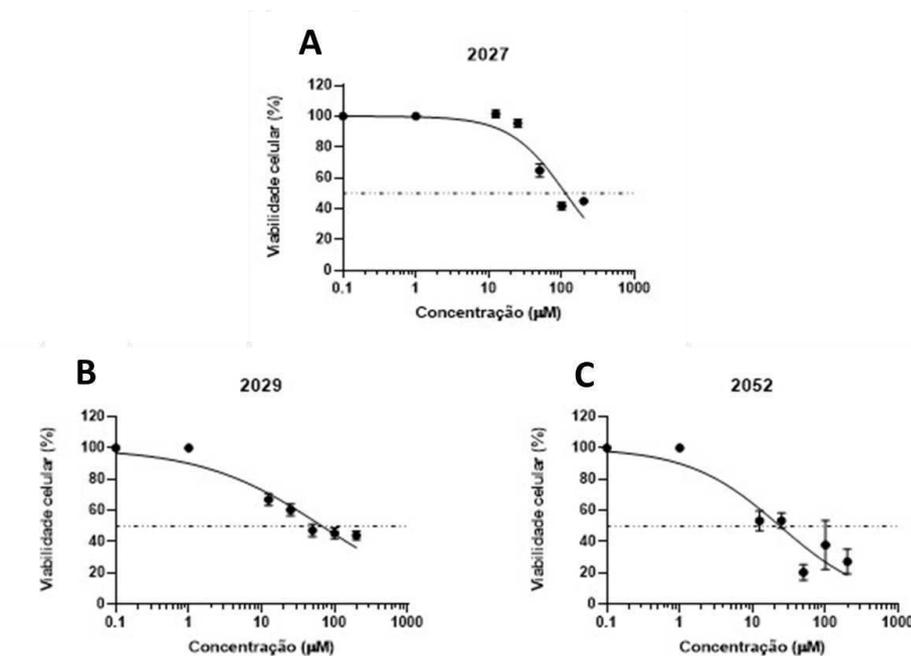
Figura 5 - (A-C) Curvas dose-resposta obtidas pelo ensaio de viabilidade (sulfordamina B) na linhagem Hep3B.



Fonte: Do autor

Nota: As culturas foram tratadas por 48 horas com as substâncias **LASSBio-2027**, **2029** e **2052** em diferentes concentrações.

Figura 6 - (A-C) Curvas dose-resposta obtidas pelo ensaio de viabilidade (sulfordamina B) na linhagem HepG2.



Fonte: Do autor

Nota: As culturas foram tratadas por 48 horas com as substâncias **LASSBio-2027**, **2029** e **2052** em diferentes concentrações.

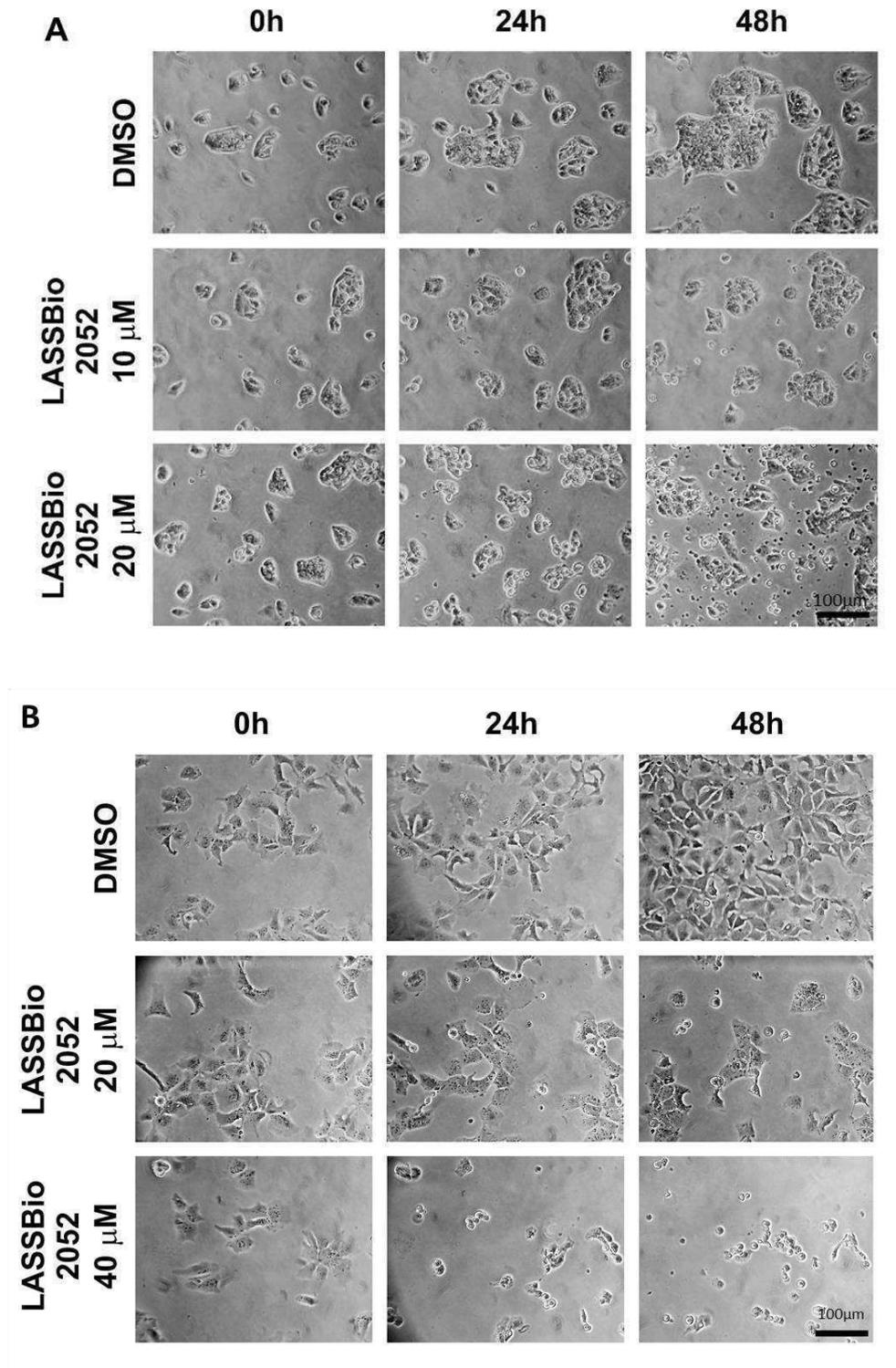
Tabela 2 - Valores de IC₅₀ (μM) determinados após 48 horas de tratamento com os derivados *N*-acilidrazônicos

	HepG2	Hep3B	Fibroblasto
2027	80,26 ± 3,43	148,20 ± 15,96	---
2029	55,63 ± 5,38	67,11 ± 7,10	---
2052	18,21 ± 2,52	41,48 ± 2,42	> 100

Fonte: Do autor

A Figura 7 mostra o aspecto morfológico de culturas HepG2 (Figura 7A) e Hep3B (Figura 7B) tratadas com **LASSBio-2052** por 48 horas. Foi possível observar menor densidade celular nas amostras tratadas com **LASSBio-2052** em concentrações equivalentes a metade do valor de IC₅₀. Ao passo que as culturas tratadas com **LASSBio-2052**, em concentrações equivalentes ao IC₅₀, exibiram células arredondadas e parcialmente aderidas ao substrato, um indicativo de citotoxicidade.

Figura 7 - Imagens ilustrativas mostrando o aspecto morfológicos de células HepG2 e Hep3B.

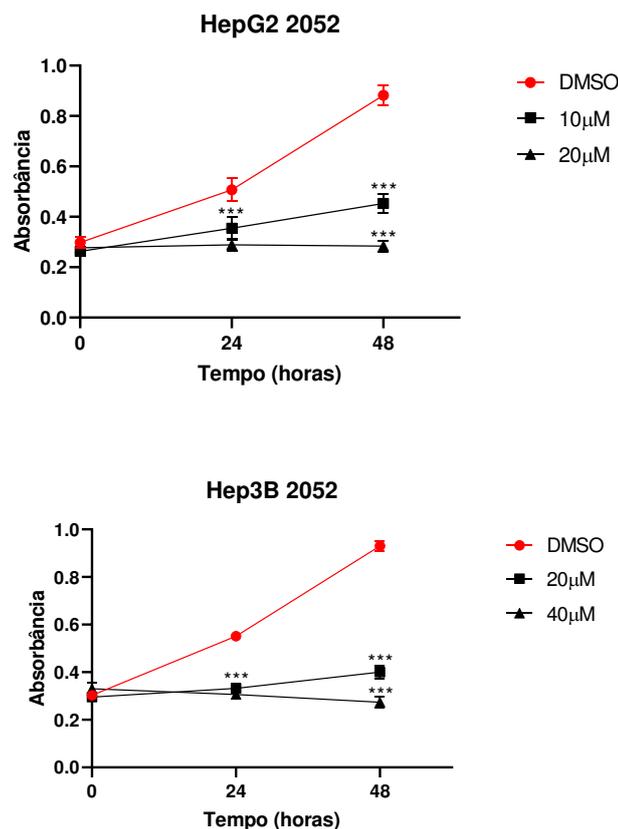


Fonte: Do autor

Nota: As linhagens HepG2 (A) e Hep3B (B) foram tratadas por 48 horas com LASSBio-2052.

Ensaio adicionais de viabilidade foram realizados, de modo que as taxas de viabilidade foram determinadas com 0, 24 e 48 horas de tratamento objetivando avaliar a cinética de crescimento das células HepG2 e Hep3B submetidas ao tratamento com **LASSBio-2052**. Nesse ensaio, concentrações equivalentes ao IC_{50} e $IC_{50}/2$ foram utilizadas. Foi possível observar que a taxa de viabilidade foi menor após 24 e 48 horas de tratamento em ambas as linhagens, sugerindo que **LASSBio-2052** inibiu a proliferação de células HepG2 e Hep3B (Figura 8). Além disso, foi possível notar que, após 48 horas de tratamento, as culturas tratadas com **LASSBio-2052** na maior concentração (IC_{50}) apresentaram taxa de viabilidade menor em relação ao tempo 0, indicando a ocorrência de morte celular (Figura 8).

Figura 8 - Viabilidade celular determinada pelo ensaio de sulforrodamina B.

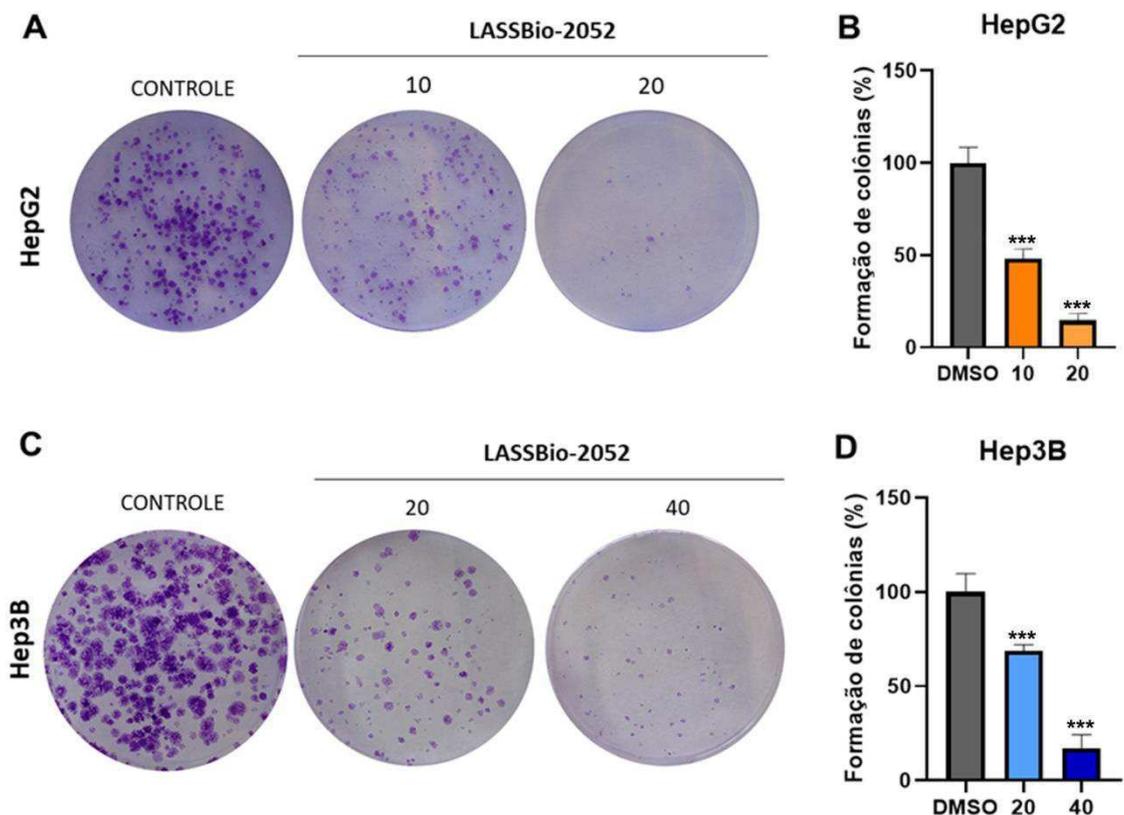


Fonte: Do autor

Nota: As culturas HepG2 e Hep3B foram tratadas com **LASSBio-2052** por 48 horas e viabilidade foi determinada com 0, 24 e 48 horas. *** $p < 0.001$ de acordo com ANOVA e pós-teste de Tukey ao comparar amostras tratadas com o grupo controle (DMSO).

Na sequência, ensaios de capacidade clonogênica foram realizados para melhor caracterizar a atividade antiproliferativa de LASSBio-2052. Os dados mostraram que houve significativa redução na frequência de colônias formadas em ambas as linhagens (Figura 9), o que corrobora os dados anteriores referentes a cinética de proliferação (Figura 8).

Figura 9 - Ensaio de capacidade clonogênica



Fonte: Do autor

Nota: As culturas foram tratadas com **LASSBio-2052** por 48 horas com concentrações equivalentes ao IC_{50} e $IC_{50}/2$. O período de recuperação em meio fresco foi de 12 dias para a HepG2 e 13 dias para a Hep3B. (A e C) Imagens ilustrativas (aumento 20x) e (B e D) análise da capacidade clonogênica. Apenas as colônias com mais de 50 células foram consideradas na análise. *** $p < 0,001$ de acordo com ANOVA e pós-teste de Dunnet.

A atividade antiproliferativa e/ou citotóxica de derivados NAH tem sido relatada em outros estudos (PRESSETE *et al.*, 2023; RODRIGUES *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2018). Rodrigues *et al.*, (2016) usaram a tricostatina A, um pan inibidor de histona desacetilases (HDACs), como protótipo para obter derivados NAH que

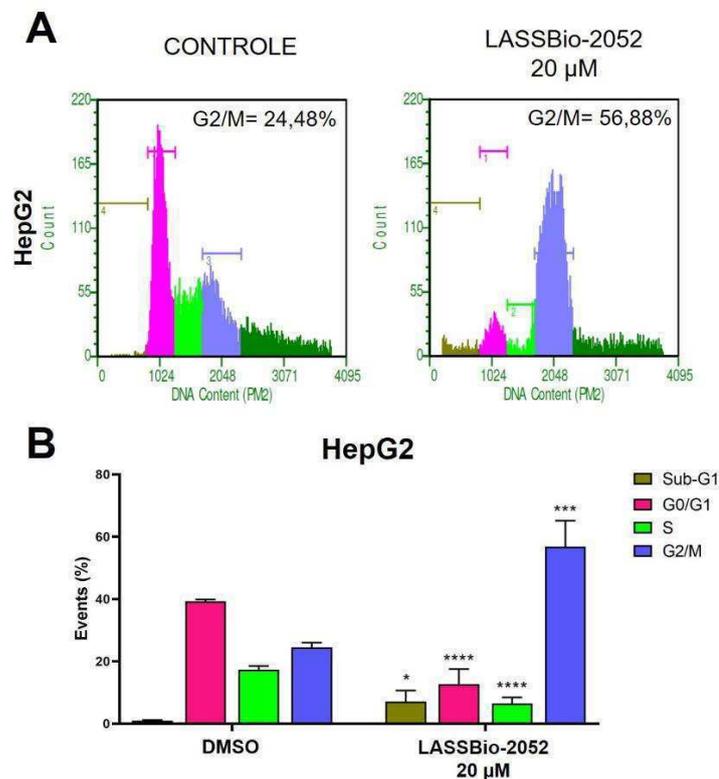
seletivamente inibem as HDACs 6/8. Essas substâncias inibiram a proliferação e induziram apoptose em células HepG2 e HT-144 (melanoma). Silva e colaboradores (2018) usaram um espaçador *N*-acilidrazônico para conectar o grupo farmacofórico da curcumina a um anel aromático contendo diferentes substituintes. Esses compostos híbridos inibiram a proliferação de células MCF-7 (câncer de mama). Recentemente, Pressete e colaboradores (2023) demonstraram que substância híbrida contendo o grupo piperonil da piperina ligado a anel aromático do ácido clorogênico por um fragmento *N*-acilidrazônico inibe a proliferação de células derivadas de melanoma (SK-MEL-14). A atividade antiproliferativa do composto híbrido piperina-ácido clorogênico foi associada à sua capacidade de modular o perfil de expressão de proteínas cinases que regulam a transição G2/M. Vale ressaltar que a substância **LASSBio-2052** foi obtida a partir do arcabouço estrutural do AAL-993, um potente inibidor do receptor para fator de crescimento endotelial vascular 2 (VEGFR2). Estudos mostram que substâncias capazes de inibir VEGFR2 são capazes de inibir a proliferação de células derivadas de tumores humanos, incluindo HeLa (colo uterino), MCF-7, SNB-75 (neuroblastoma) e HepG2 (EL-DASH *et al.*, 2021; LU *et al.*, 2016; MOHAMED *et al.*, 2019; Ni *et al.*, 2021; SUN *et al.*, 2018).

Dando continuidade à investigação, a dinâmica de progressão do ciclo celular foi avaliada em culturas de HepG2 e Hep3B tratadas com **LASSBio-2052** na concentração equivalente ao IC₅₀. Os resultados mostraram que houve aumento significativo da população G2/M com redução das populações G1 e S em culturas em ambas as linhagens celulares (Figuras 10 e 11), indicando que a atividade antiproliferativa de **LASSBio-2052** está associada à sua capacidade de inibir a progressão do ciclo celular. Aumento da população G2/M também foi observado em culturas de MCF-7 e SBN-75 tratadas com derivado triazólico de cumarina (MOHAMED *et al.*, 2019) e substância híbrida contendo aminotiazol e tienopirimidina (EL-DASH *et al.*, 2021), as quais inibem a atividade catalítica de VEGFR2.

A transição G2/M é altamente regulada e requer a presença de complexos ciclina B-CDK1 ativos. Na fase G2 do ciclo celular, a expressão de ciclina B aumenta e complexos ciclina B-CDK1 se formam, contudo, esses complexos permanecem inativos devido a fosforilação inibitória de CDK1 (treonina 14 ou tirosina 15) mediada por Myt1 e Wee1, respectivamente (MALUMBRES; BARBACID, 2009; MATTHEWS

et al., 2022; SMITH *et al.*, 2010). A reversão da fosforilação inibitória para a entrada na mitose requer a ativação da fosfatase CDC25 (CDC25C preferencialmente) (SUR; AGRAWAL, 2016). Além disso, é necessário que a CDK1 seja fosforilada no resíduo de treonina 161 para ativação total dos complexos ciclina B-CDK1, evento mediado pela CDK7, uma subunidade do complexo proteico CAK (*CDK-activating kinase*) (LOLLI; JOHNSON, 2005; OTTO; SICINSKI, 2017). A interação das proteínas p21 e p27 com complexos ciclina B-CDK1 altera a conformação da CDK1, o que previne a fosforilação ativadora (HARPER; ELLEDGE, 1996; MATTHEWS *et al.*, 2021).

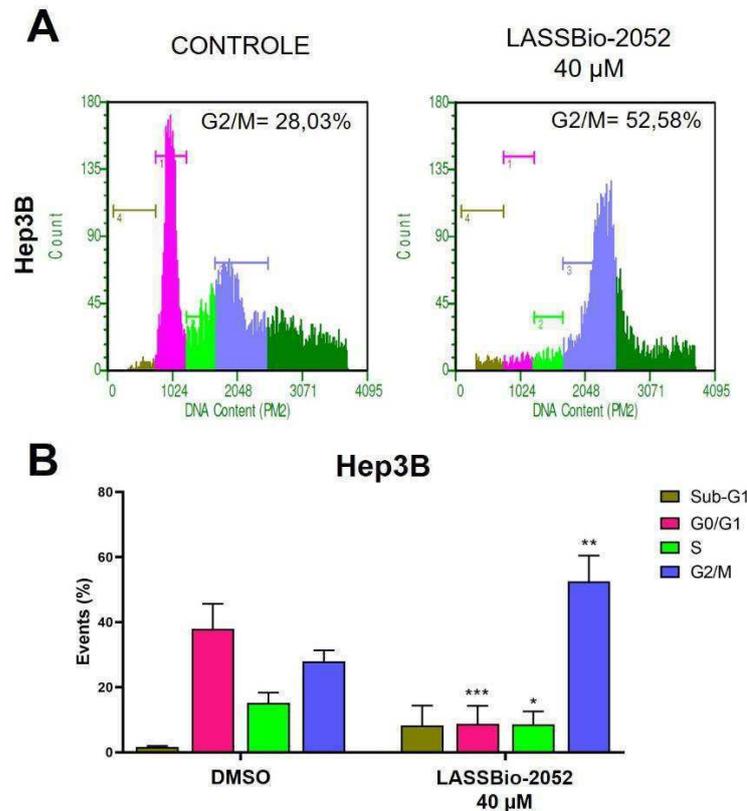
Figura 10 - Análise de progressão do ciclo celular na linhagem HepG2



Fonte: Do autor

Nota: As culturas foram tratadas com 48 horas com **LASSBio-2052**. (A) Histogramas ilustrativos obtidos por citometria de fluxo mostrando a distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular (Sub-G1, marrom claro; G0/G1, rosa; S, verde claro; G2/M, azul). A população com conteúdo de DNA maior de 4C (verde escuro) não foi considerada na análise. (B) Análise das populações celulares. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ de acordo com ANOVA e pós-teste de Dunnet.

Figura 11 - Análise de progressão do ciclo celular na linhagem Hep3B.



Fonte: Do autor

Nota: As culturas foram tratadas por 48 horas **LASSBio-2052**. (A) Histogramas ilustrativos obtidos por citometria de fluxo mostrando a distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular (Sub-G1, marrom claro; G0/G1, rosa; S, verde claro; G2/M, azul). A população com conteúdo de DNA maior de 4C (verde escuro) não foi considerada na análise. (B) Análise das populações celulares, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ de acordo com ANOVA e pós-teste de Dunnet.

A expressão e ativação das cinases aurora A/B e PLK-1 é crucial para a transição G2/M, progressão pelas subfases da mitose e citocinese. Aurora A atua na maturação/separação dos centrossomos e organização do fuso bipolar (DIAZ-MORALLI *et al.*, 2013; LIN *et al.*, 2020; MARUMOTO; ZHANG; SAYA, 2005). A Aurora B integra o complexo passageiro de cromossomos (CPC) e está envolvida com o empacotamento do material genético, monitoramento da ligação das fibras do mitótico às regiões cinetocóricas dos cromossomos e citocinese (KRENN; MUSACCHIO, 2015; MANZIONE *et al.*, 2020). A PLK1 atua de forma cooperativa com as auroras A e B para orquestrar os eventos necessários à dinâmica de

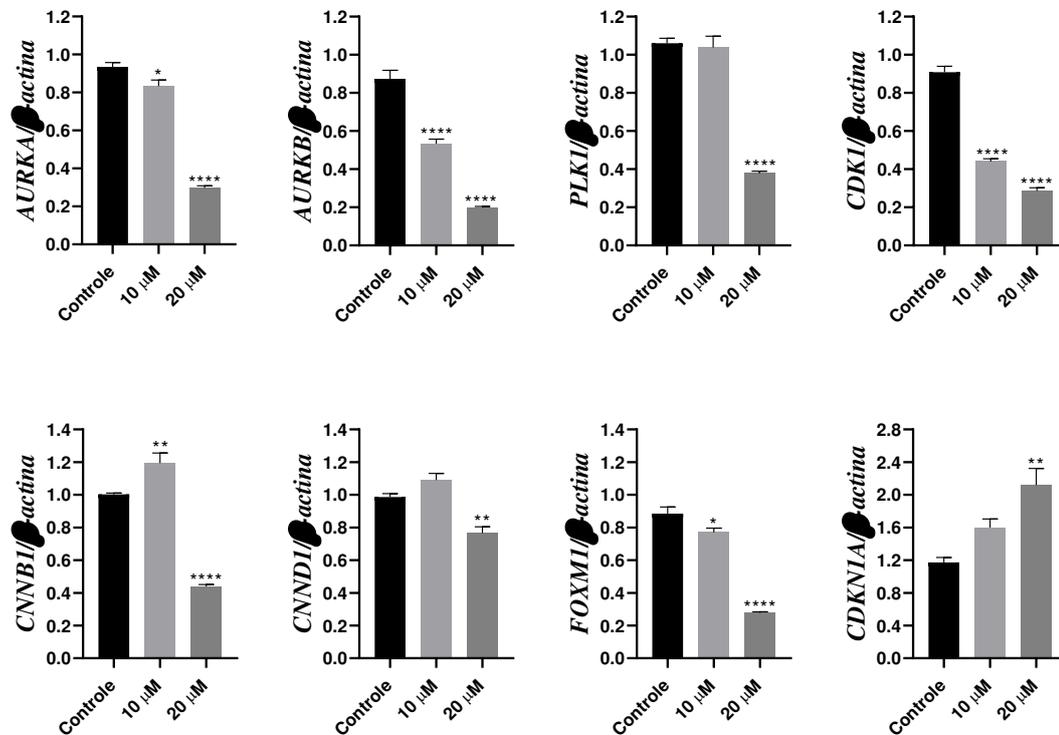
segregação cromossômica e formação das células filhas (CHOU *et al.*, 2015; COLICINO; HEHNLY, 2018; KETTENBACH *et al.*, 2018; WONG *et al.*, 2022).

Considerando que **LASSBio-2052** alterou a progressão do ciclo e que houve aumento da população G2/M em resposta ao tratamento, o perfil de expressão de expressão de reguladores da transição G2/M foi avaliado em nível de RNA mensageiro após 24 horas de tratamento (Figuras 12 e 13). A expressão relativa de *AURKA* (Aurora A), *AURKB* (Aurora B), *PLK1*, *CDK1*, *CNNB1* (ciclina B1) e *CCND1* (ciclina D1) foi significativamente reduzida em culturas tratadas com **LASSBio-2052** na concentração de 20 μ M. Enquanto a abundância de RNA mensageiro para *CDKN1A* (p21) foi, aproximadamente, o dobro nas amostras tratadas com 20 μ M em relação ao grupo controle (Figura 12).

Na linhagem Hep3B, a expressão relativa de *AURKA*, *CDK1*, *CNNB1*, *AURKB* e *PLK-1* foi significativamente menor nas amostras com **LASSBio-2052** na concentração de 40 μ M (Figura 13). Embora significativa, a redução dos níveis de RNA mensageiro para *AURKB* e *PLK1* foi menos expressiva em comparação com *CCNB1*, *CDK1* e *AURKA*. Curiosamente, a expressão relativa de p21 foi, aproximadamente, nove vezes maior em culturas Hep3B tratadas com **LASSBio-2052** em relação ao grupo controle (Figura 13).

A linhagem Hep3B não expressa o gene *TP53*, principal regulador transcricional de *CDKN1A* (QIU *et al.*, 2015; YU *et al.*, 2020), de modo que o aumento na expressão relativa de *CDKN1A*, induzido por **LASSBio-2052**, é independente da ativação de p53. Por outro lado, a linhagem Hep3B tem o genoma do vírus da hepatite B integrado em seu genoma e expressa a proteína viral X (HBx). Foi demonstrado por Ahn *et al.* (2001) que a proteína HBx inibe a transcrição de *CDKN1A* por regular negativamente a expressão do fator de transcrição SP1. Assim, é possível que o aumento expressivo de *CDKN1A* em resposta ao tratamento com **LASSBio-2052** seja decorrente da inibição de HBx ou da inibição direta de SP1, uma vez que a ativação transcricional de *CDKN1A*, mediada por SP1 tem sido demonstrada em outros estudos (DE SIERVI *et al.*, 2004; YOSHIDA *et al.*, 2009).

Figura 12 - Expressão relativa de *AURKA* e *AURKB*, *PLK1*, *CDK1*, *CNNB1*, *CNND1*, *FOXM1* e *CDKN1A* na linhagem HepG2.

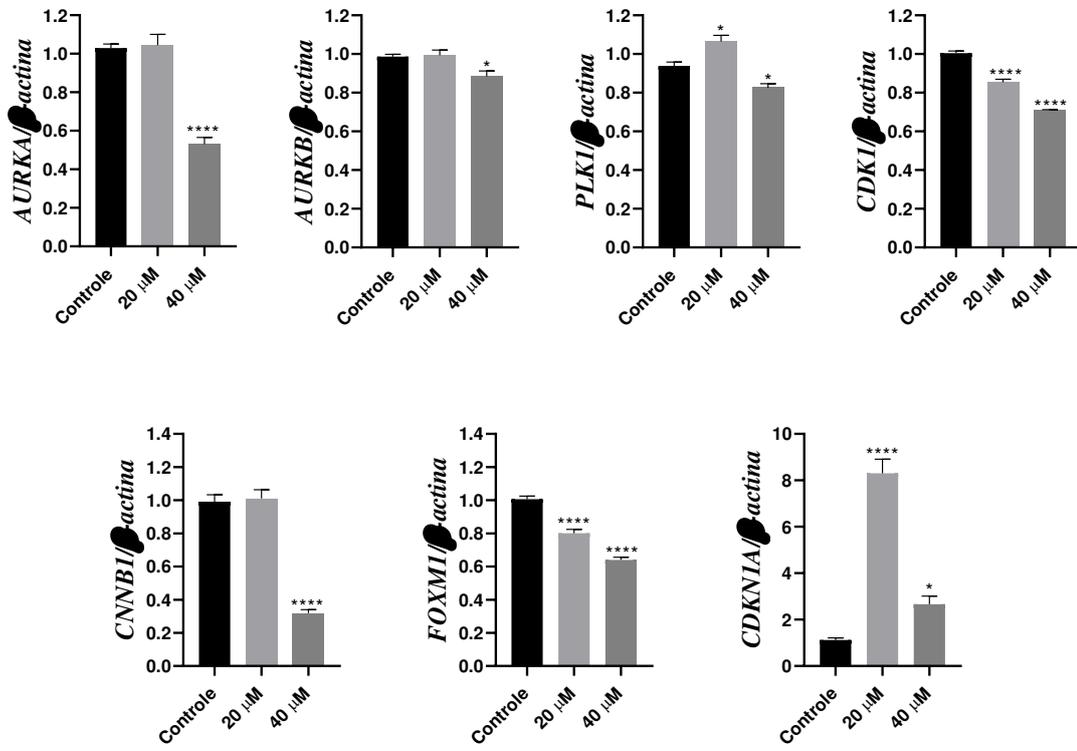


Fonte: Do autor

Nota: As culturas foram tratadas por 24 horas com **LASSBio-2052** e a expressão relativa dos genes *AURKA* e *AURKB*, *PLK1*, *CDK1*, *CNNB1*, *CNND1*, *FOXM1* e *CDKN1A* foi determinada por qPCR. *p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001 de acordo com ANOVA e pós-teste de Tukey.

Os níveis de expressão proteica de ciclina B foram determinados nas linhagens HepG2 e Hep3B, após 48 horas de tratamento com **LASSBio-2052** (Figuras 14A e 15A). Em ambas as linhagens, houve significativa redução nos níveis de ciclina B em resposta ao tratamento, corroborando os dados obtidos em nível de RNA mensageiro. Assim sendo, os dados sugerem que o bloqueio em G2/M nas linhagens HepG2 e Hep3B, induzido por **LASSBio-2052**, está associado à sua capacidade de regular negativamente a expressão de cinases mitóticas, reduzir a expressão de ciclina B e induzir a ativação transcricional de *CDKN1A* (LAPENA, GIORDANO, 2009; SUR; AGRAWALL, 2016; VAN LEUKEN; CLIJSTERS; WOLTHUIS, 2008).

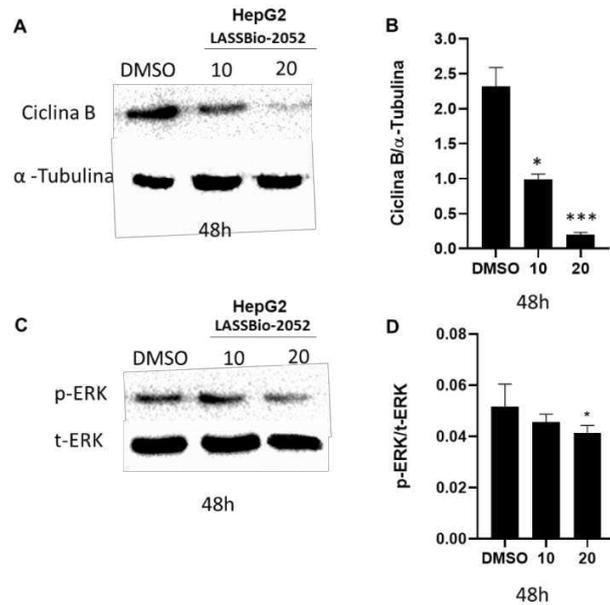
Figura 13 - Expressão relativa de *AURKA* e *AURKB*, *PLK1*, *CDK1*, *CNNB1*, *FOXM1*, *CDKN1A* na linhagem Hep3B.



Fonte: Do autor

Nota: As culturas foram tratadas por 24 horas com **LASSBio-2052** e a expressão relativa dos genes *AURKA* e *AURKB*, *PLK1*, *CDK1*, *CNNB1*, *FOXM1* e *CDKN1A* foi determinada por qPCR.. *p<0,05, ****p<0,0001 de acordo com ANOVA e pós-teste de Dunnet.

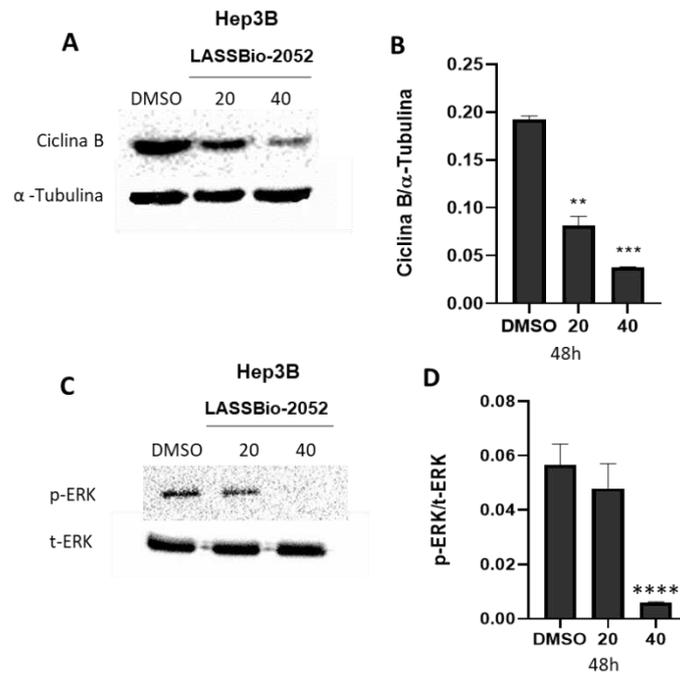
Figura 14 - Expressão de ciclina B e p-ERK na linhagem HepG2.



Fonte: Do autor

Nota: As culturas foram tratadas com **LASSBio-2052** (10 e 20 μM) por 48 horas e a expressão de ciclina B (A e B) e p-ERK (C e D) foi determinada por *western blot*. α-tubulina foi utilizada como controle. *p<0,05 e ***p<0,001 de acordo com ANOVA e pós-teste de Dunnet.

Figura 15 - Expressão de ciclina B e p-ERK na linhagem Hep3B.



Fonte: Do autor

Nota: As culturas foram tratadas com **LASSBio-2052** (20 e 40 μM) por 48 horas e a expressão de ciclina B (A e B) e p-ERK (C e D) foi determinada por *western blot*. α-tubulina foi utilizada como controle. **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 de acordo com ANOVA e pós-teste de Dunnet.

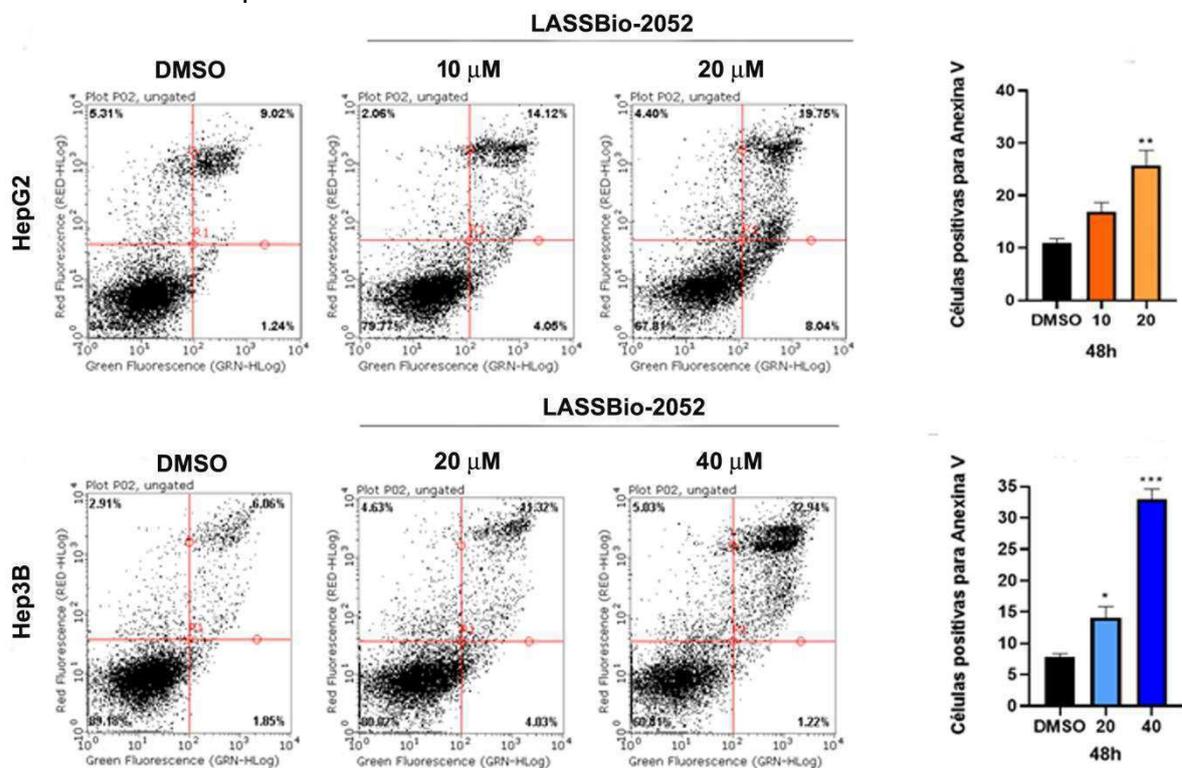
Considerando a concomitante redução, em nível transcricional das cinases mitóticas em resposta ao tratamento com **LASSBio-2052**, o perfil de expressão de *FOXM1* foi investigado. *FOXM1* é um fator de transcrição da família *Forkhead box* envolvido na ativação transcricional de uma variedade de genes, incluindo os genes necessários à transição G2/M (SADASIVAM; DUAN; DECAPRIO, 2012; GUILLEN *et al.*, 2023). Os dados mostraram que a expressão relativa de *FOXM1* foi significativamente reduzida em culturas de HepG2 e Hep3B tratadas com **LASSBio-2052** (Figuras 12 e 13), o que reforça a atividade antitumoral dessa substância. Estudo recente mostra uma correlação positiva entre níveis de expressão de *FOXM1* e progressão tumoral em pacientes com CHC (CHAND *et al.*, 2019; 2022). Yu *et al.* (2015) mostraram que os níveis de expressão de *FOXM1* são maiores em CHC (76.09 %) comparado com o tecido hepático adjacente ao tumor (39.13 %) e com o fígado normal (8.33 %). Os autores mostraram que a expressão exógena de *FOXM1* in CHC aumenta a taxa de proliferação *in vitro* e *in vivo*. Além disso, os autores demonstraram que, paralelamente ao aumento de *FOXM1*, houve um aumento significativo na expressão das ciclinas B1 e D1 e redução de inibidores de CDKs p27^{Kip1} e p21^{Cip1}. O aumento proporcional de *FOXM1* e ciclina B também foi demonstrada em CHC por Chai *et al.* (2018).

Tem sido demonstrado que *FOXM1* regula a expressão de cinases mitóticas (aurora A e PLK-1), VEGFA e CXCL12A via RAF/MEK/ERK (WANG *et al.*, 2010). A regulação transcricional de *FOXM1* é complexa e envolve diferentes vias de sinalização, incluindo as vias RAS/MEK/ERK, PI3K-AKT e STAT (KALATHIL; JOHN; NAIR, 2021). Assim, no presente estudo, os níveis de expressão e de ativação de ERK foram avaliados. Os resultados mostraram que **LASSBio-2052** inibiu significativamente a ativação de ERK em culturas de HepG2 e Hep3B após 48 horas de tratamento, como demonstrado pelo aumento na expressão de p-ERK (Figuras 14B e 15B). A inibição da Via RAF/MEK/ERK pode ter contribuído para redução nos níveis de expressão de *FOXM1* e, conseqüentemente, das auroras cinases, PLK1 e das ciclinas B e D.

Por fim, o potencial pró-apoptótico de **LASSBio-2052** foi avaliado, considerando que o estresse celular induzido pelo bloqueio do ciclo em G2/M pode ter ativado vias que culminam na indução de apoptose. Além disso, muitos agentes que inibem VEGFR2 induzem apoptose em células tumorais incluindo HepG2

(ALSAIF *et al.*, 2021a; ALSAIF *et al.*, 2021b; TAHA *et al.*, 2022). De acordo com os resultados do ensaio de anexina V, **LASSBio-2052** induz apoptose em células HepG2 e Hep3B (Figura 16). Houve aumento significativo na frequência de células positivas para anexina V em culturas tratadas com **LASSBio-2052** por 48 horas, indicando que a atividade citotóxica dessa substância está associada, pelo menos em parte, à indução de apoptose. Embora a atividade pró-apoptótica de **LASSBio-2052** tenha que ser melhor caracterizada, essa substância representa um promissor candidato a fármaco considerando o conjunto de dados obtidos no presente estudo.

Figura 16 - Análise da frequência de células apoptóticas nas linhagens HepG2 e Hep3B.



Fonte: Do autor

Nota: Análise da frequência de células apoptóticas nas linhagens HepG2 e Hep3B realizada após 48 de tratamento com **LASSBio-2052**. Os *dot plots* são representativos e mostram as células viáveis (quadrante inferior esquerdo), células apoptóticas em fase inicial (quadrante inferior direito) e tardia (quadrante superior direito) e células necróticas (quadrante superior esquerdo). A determinação de frequência de apoptose foi realizada considerando os eventos de apoptose em fase inicial e tardia. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ de acordo com ANOVA e pós-teste de Dunnett.

6 CONCLUSÃO

- a) Os derivados NAH reduziram a viabilidade de células HepG2 e Hep3B, contudo **LASSBio-2052** foi a substância mais ativa considerando o valor de IC_{50} ;
- b) **LASSBio-2052** tem atividade antiproliferativa e inibe a progressão do ciclo celular na transição G2/M em ambas as linhagens estudadas;
- c) **LASSBio-2052** inibe a progressão do ciclo celular por modular a expressão de genes que regulam a transição G2/M. Os níveis de expressão de ciclina B e CDK1 foram reduzidos, enquanto a expressão relativa de p21, um inibidor de CDKs, foi aumentada em resposta ao tratamento;
- d) **LASSBio-2052** inibe a expressão de FOXM1, principal regulador transcricional de genes que regulam positivamente o ciclo celular;
- e) **LASSBio-2052** induz apoptose em células HepG2 e Hep3B;
- f) **LASSBio-2052** representa um protótipo promissor e seus alvos moleculares devem ser investigados futuramente.

REFERÊNCIAS

- ALSAIF, N.A.; DAHAB, M.A.; ALANAZI, M.M.; OBAIDULLAH, A.J.; AL-MEHIZIA, A.A.; ALANAZI, M.M.; ALDAWAS, S.; MAHDY, H.A.; ELKADY, H. New quinoxaline derivatives as VEGFR-2 inhibitors with anticancer and apoptotic activity: Design, molecular modeling, and synthesis. **Bioorg Chem.**, [S.l.], v. 110, p. 104807, 2021. DOI: 10.1016/j.bioorg.2021.104807.
- ARZUMANIAN, V.A.; KISELEVA, O.I.; POVERENNAYA, E.V. The Curious Case of the HepG2 Cell Line: 40 Years of Expertise. **Int J Mol Sci.**, [S.l.], v. 22, n. 23, p. 13135, 2021. DOI: 10.3390/ijms222313135. PMID: 34884942; PMCID: PMC8658661.
- BARCENA-VARELA, M.; LUJAMBIO, A. The Endless Sources of Hepatocellular Carcinoma Heterogeneity. **Cancers (Basel)**, [S.l.], v. 13, n. 11, p. 2621, 2021. DOI: 10.3390/cancers13112621. PMID: 34073538; PMCID: PMC8198457. 2021.
- CHAI, N.; XIE, H.H.; YIN, J.P.; SA, K.D.; GUO, Y.; WANG, M.; LIU, J.; ZHANG, X.F.; ZHANG, X.; YIN, H.; NIE, Y.Z.; WU, K.C.; YANG, A.G.; ZHANG, R. FOXM1 promotes proliferation in human hepatocellular carcinoma cells by transcriptional activation of CCNB1. **Biochem Biophys Res Commun.**, [S.l.], v. 500, n. 4, p. 924-929. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.04.201. Epub 2018 Apr 30. PMID: 29705704. Jun 12, 2018
- CHAND, L.K.; TSUI, Y.M.; HO, D.W.; NG, I.O. Cellular heterogeneity and plasticity in liver cancer. **Semin Cancer Biol.**, [S.l.], v. 82, p. 134-149. DOI: 10.1016/j.semcancer.2021.02.015. Epub 2021 Feb 26. PMID: 33647386. Jul, 2022.
- CHAND, V.; PANDEY, A.; KOPANJA, D.; GUZMAN, G.; RAYCHAUDHURI, P. Opposing Roles of the Forkhead Box Factors FoxM1 and FoxA2 in Liver Cancer. **Mol Cancer Res.**, [S.l.], v. 17, n. 5, p. 1063-1074. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-18-0968. Epub 2019 Feb 27. PMID: 30814128; PMCID: PMC6497570. Maio, 2019.
- CHOU, C.H.; LOH, J.K.; YANG, M.C.; LIN, C.C.; HONG, M.C.; CHO, C.L.; CHOU, A.K.; WANG, C.H.; LIEU, A.S.; HOWNG, S.L.; HSU, C.M.; HONG, Y.R.; AIBp regulates mitotic entry and mitotic spindle assembly by controlling activation of both Aurora-A and Plk1. **Cell Cycle.**, [S.l.], v. 14, n. 17, p. 2764-76. DOI: 10.1080/15384101.2015.1066536. Epub 2015 Jun 26. PMID: 26114227; PMCID: PMC4614063. 2015.
- COLICINO, E.G.; HEHNLY, H. Regulating a key mitotic regulator, polo-like kinase 1 (PLK1). **Cytoskeleton (Hoboken)**, [S.l.], v. 75, n. 11, p. 481-494. DOI: 10.1002/cm.21504. Epub 2018 Dec 7. PMID: 30414309; PMCID: PMC7113694. Nov, 2018.
- CONNELL, L.C.; HARDING, J.J.; SHIA, J.; ABOU-ALFA, G.K. Combined intrahepatic cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma. **Chin Clin Oncol.**, [S.l.], v. 5, n. 5,

p. 66. DOI: 10.21037/cco.2016.10.02. PMID: 27829279. Oct, 2016.

DAGOGO-JACK, I.; SHAW, A.T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. **Nat Rev Clin Oncol.**, [S.l.], v. 15, n. 2, p. 81-94. DOI: 10.1038/nrclinonc.2017.166. Epub 2017 Nov 8. PMID: 29115304. Feb, 2018.

DE SIERVI, A.; MARINISSEN, M.; DIGGS, J.; WANG, X.F.; PAGES, G.; SENDEROWICZ, A. Transcriptional activation of p21(waf1/cip1) by alkylphospholipids: role of the mitogen-activated protein kinase pathway in the transactivation of the human p21(waf1/cip1) promoter by Sp1. **Cancer Res.**, [S.l.], v. 64, n. 2, p. 743-50. DOI: 10.1158/0008-5472.can-03-2505. PMID: 14744793. Jan, 2004.

DIAZ-MORALLI, S.; TARRADO-CASTELLARNAU, M.; MIRANDA, A.; CASCANTE, M. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. **Pharmacol Ther.**, [S.l.], v. 138, n. 2, p. 255-71. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2013.01.011. Epub 2013 Jan 26. PMID: 23356980. Maio, 2013.

DING, X.; HE, M.; CHAN, A.W.H.; SONG, Q.X.; SZE, S.C.; CHEN, H.; MAN, M.K.H.; MAN, K.; CHAN, S.L.; LAI, P.B.S.; *et al.* Genomic and Epigenomic Features of Primary and Recurrent Hepatocellular carcinomas. **Gastroenterology.**, [S.l.], v. 157, p. 1630–1645. e1636. 2019.

Finn, R.S.; Qin, S. Ikeda, M. *et al.* Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. **N Engl J Med.**, [S.l.], v. 382, p. 1894-1905, 2020. DOI: 10.1056/NEJMoa1915745

EL-DASH, Y.; ELZAYAT, E.; ABDOU, A.M.; HASSAN, R.A. Novel thienopyrimidine-aminothiazole hybrids: Design, synthesis, antimicrobial screening, anticancer activity, effects on cell cycle profile, caspase-3 mediated apoptosis and VEGFR-2 inhibition. **Bioorg Chem.**, [S.l.], v. 114, p. 105137. DOI: 10.1016/j.bioorg.2021.105137. Epub 2021 Jul 1. PMID: 34237644. Setembro, 2021.

FINN, R.S.; QIN, S.; IKEDA, M.; GALLE, P.R.; *et al.* IMbrave150 Investigators. Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. **N Engl J Med.**, [S.l.], v. 382, n. 20, p. 1894-1905. DOI: 10.1056/NEJMoa1915745. PMID: 32402160. maio, 2020.

FORNER, A.; REIG, M.; BRUIX, J. Seminar Hepatocellular carcinoma. **The Lancet.**, [S.l.], v. 6736, n. 18, p. 1–14. [https://DOI.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30010-2](https://DOI.org/10.1016/S0140-6736(18)30010-2). 2018.

HARPER, J.W.; ELLEDGE, S.J. Cdk inhibitors in development and cancer. **Curr Opin Genet Dev.**, [S.l.], v. 6, n. 1, p. 56-64. DOI: 10.1016/s0959-437x(96)90011-8. PMID: 8791491. Feb, 1996.

HOSHIKAWA, K., UENO, Y. Prevention of Hepatocarcinogenesis in Liver Cirrhosis. In: Yoshiji, H., Kaji, K. (eds) *The Evolving Landscape of Liver Cirrhosis Management*. Springer, Singapore, cap. 2019. https://DOI.org/10.1007/978-981-13-7979-6_14

JI, L.; LIN, Z.; WAN, Z.; *et al.* miR-486-3p mediates hepatocellular carcinoma

sorafenib resistance by targeting FGFR4 and EGFR. **Cell Death Dis.**, [S.I.], v. 11, p. 250, 2020.

JOHNSON, M.; DIMITROV, D.; VOJTA, P.J.; BARRETT, J.C.; NODA, A.; PEREIRA-SMITH, O.M.; SMITH, J.R. Evidence for a p53-independent pathway for upregulation of SDI1/CIP1/WAF1/p21 RNA in human cells. **Mol Carcinog.**, [S.I.], v. 11, n. 2, p. 59-64. DOI: 10.1002/mc.2940110202. PMID: 7522462. Oct, 1994.

KALATHIL, D.; JOHN, S.; NAIR, A.S. FOXM1 and Cancer: Faulty Cellular Signaling Derails Homeostasis. **Front Oncol.**, [S.I.], v. 15, n. 10, p. 626836. DOI: 10.3389/fonc.2020.626836. PMID: 33680951; PMCID: PMC7927600. Feb, 2021.

KETTENBACH, A.N.; SCHLOSSER, K.A.; LYONS, S.P.; NASA, I.; GUI, J.; ADAMO, M.E.; GERBER, S.A. Global assessment of its network dynamics reveals that the kinase Plk1 inhibits the phosphatase PP6 to promote Aurora A activity. **Sci Signal.** [S.I.], v. 11, n. 530, p. 1441. DOI: 10.1126/scisignal.aag1441. PMID: 29764989; PMCID: PMC6002859. May, 2018.

KRENN, V.; MUSACCHIO, A. The Aurora B Kinase in Chromosome Bi-Orientation and Spindle Checkpoint Signaling. **Front Oncol.**, [S.I.], v. 16, p. 5:225. DOI: 10.3389/fonc.2015.00225. PMID: 26528436; PMCID: PMC4607871. Oct, 2015.

KUDO, M.; FINN, R.S.; QIN, S.; *et al.* Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. **Lancet.**, [S.I.], v. 391, p. 1163- 1173. 2018.

LEE, J.H; KU, J.L.; PARK, Y.J.; LEE, K.U.; KIM, W.H.; PARK, J.G. Establishment and characterization of four human hepatocellular carcinoma cell lines containing hepatitis B virus DNA. **World J Gastroenterol.**, [S.I.], v. 5, n. 4, p. 289-295. DOI: 10.3748/wjg.v5.i4.289. PMID: 11819450; PMCID: PMC4695537. Aug, 1999.

LEE SM, KIM-HA J, CHOI WY, LEE J, KIM D, LEE J, CHOI E, KIM YJ. Interplay of genetic and epigenetic alterations in hepatocellular carcinoma. **Epigenomics.**, [S.I.], v. 8, n. 7, p. 993-1005, 2016. DOI: 10.2217/epi-2016-0027. Epub 2016 Jul 14. PMID: 27411963.

LEVRERO, M.; ZUCMAN-ROSSI, J. Mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma. **J Hepatol.**, [S.I.], v. 64, n. 1 Suppl., p. S84-S101. DOI: 10.1016/j.jhep.2016.02.021. PMID: 27084040. Apr, 2016.

LIAN, Z.; LIU, J.; LI, L.; *et al.* Enhanced cell survival of Hep3B cells by the hepatitis B x antigen effector, URG11, is associated with upregulation of beta-catenin. **Hepatology.**, [S.I.], v. 43, n. 3, p. 415-24. DOI: 10.1002/hep.21053. PMID: 16496348. Mar, 2006.

LIN, X.; XIANG, X.; HAO, L.; WANG, T.; LAI, Y.; ABUDOUREYIMU, M.; ZHOU, H.; FENG, B.; CHU, X.; WANG, R. The role of Aurora-A in human cancers and future therapeutics. **Am J Cancer Res.**, [S.I.], v. 10, n. 9, p. 2705-2729. PMID: 33042612; PMCID: PMC7539775. Sep, 2020.

- LLOVET, J.M.; HERNANDEZ-GEA, V. Hepatocellular carcinoma: reasons for phase III failure and novel perspectives on trial design. **Clin Cancer Res.**, [S.I.], v. 20, n. 8, p. 2072-9. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0547. Epub 2014 Mar 3. PMID: 24589894. Apr, 2014.
- LLOVET, J.M.; ZUCMAN-ROSSI, J.; PIKARSKY, E.; SANGRO, B.; SCHWARTZ, M.; SHERMAN, M.; GORES, G. Hepatocellular carcinoma. **Nat Rev Dis Primers.**, [S.I.], v. 2, p. 16018. DOI: 10.1038/nrdp.2016.18. PMID: 27158749. Apr, 2016.
- LOLLI, G.; JOHNSON, L.N. CAK-Cyclin-dependent Activating Kinase: a key kinase in cell cycle control and a target for drugs? **Cell Cycle.**, [S.I.], v. 4, n. 4, p. 572-7. Epub 2005 Apr 16. PMID: 15876871. Apr, 2005.
- LONG, J.; WANG, A.; BAI, Y.; LIN, J.; YANG, X.; WANG, D.; YANG, X.; JIANG, Y.; ZHAO, H. Development and validation of a TP53-associated immune prognostic model for hepatocellular carcinoma. **EBioMedicine.**, [S.I.], v. 42, p. 363-374. DOI: 10.1016/j.ebiom.2019.03.022. Epub 2019 Mar 16. PMID: 30885723; PMCID: PMC6491941. Apr, 2019.
- LU, L.; ZHAO, T.T.; LIU, T.B.; SUN, W.X.; XU, C.; LI, D.D.; ZHU, H.L. Synthesis, Molecular Modeling and Biological Evaluation of 4-Alkoxyquinazoline Derivatives as Novel Inhibitors of VEGFR2. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v. 64, n. 11, p. 1570-1575. DOI: 10.1248/cpb.c16-00386. Epub 2016 Aug 26. PMID: 27568484. Nov, 2016.
- MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nat Rev Cancer**, [S.I.], v. 9, n. 3, p. 153-66. DOI: 10.1038/nrc2602. PMID: 19238148. Mar, 2009.
- MANZIONE, M.G.; ROMBOUTS, J.; STEKLOV, M.; PASQUALI, L.; SABLINA, A.; GELENS, L.; QIAN, J.; BOLLEN, M. Co-regulation of the antagonistic RepoMan:Aurora-B pair in proliferating cells. **Mol Biol Cell.**, [S.I.], v. 31, n. 6, p. 419-438. DOI: 10.1091/mbc.E19-12-0698. Epub 2020 Jan 22. PMID: 31967936; PMCID: PMC7185888. Mar, 2020.
- MARQUARDT, J.; ANDERSEN, J.; THORGEIRSSON, S. Functional and genetic deconstruction of the cellular origin in liver cancer. **Nat Rev Cancer**, [S.I.], v. 15, p. 653–667. <https://DOI.org/10.1038/nrc4017>. 2015.
- MARTIN, M.; HERCEG, Z. From hepatitis to hepatocellular carcinoma: a proposed model for cross-talk between inflammation and epigenetic mechanisms. **Genome Med.**, [S.I.], v. 4, n. 1, p. 8. DOI: 10.1186/gm307. PMID: 22293089; PMCID: PMC3334556. Jan, 2012.
- MARUMOTO, T.; ZHANG, D.; SAYA, H. Aurora-A - a guardian of poles. **Nat Rev Cancer.**, [S.I.], v. 5, n. 1, p. 42-50. DOI: 10.1038/nrc1526. PMID: 15630414. Jan 2005.
- MATTHEWS, H.K.; BERTOLI, C.; DE BRUIN, R.A.M. Cell cycle control in cancer. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, [S.I.], v. 23, n. 1, p. 74-88. DOI: 10.1038/s41580-021-00404-3. Epub 2021 Sep 10. PMID: 34508254. Jan, 2022.

MCGLYNN, K.A.; PETRICK, J.L.; EL-SERAG, H.B. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. **Hepatology**, [S.I.], v. 73, n. Suppl 1, p. 4-13. DOI: 10.1002/hep.31288. Epub 2020 Nov 24. PMID: 32319693; PMCID: PMC7577946. Jan, 2021.

MITRY, R.R.; SARRAF, C.E.; WU, C.G.; PIGNATELLI, M.; HABIB, N.A. Wild-type p53 induces apoptosis in Hep3B through up-regulation of bax expression. **Lab Invest.**, [S.I.], v. 77, n. 4, p. 369-78. PMID: 9354771. Oct, 1997.

MOHAMED, T.K.; BATRAN, R.Z.; ELSEGINY, S.A.; ALI, M.M.; MAHMOUD, A.E. Synthesis, anticancer effect and molecular modeling of new thiazolylypyrazolyly coumarin derivatives targeting VEGFR-2 kinase and inducing cell cycle arrest and apoptosis. **Bioorg Chem.**, [S.I.], v. 85, p. 253-273. DOI: 10.1016/j.bioorg.2018.12.040. Epub 2019 Jan 3. PMID: 30641320. Apr, 2019.

MONTIRONI, C.; MONTAL, R.; LLOVET, J.M. New Drugs Effective in the Systemic Treatment of Hepatocellular Carcinoma. **Clinical Liver Disease**, [S.I.], v. 14, p.56-61. <https://DOI.org/10.1002/cld.796>. 2019.

NIU, G.; CHEN, X. Vascular endothelial growth factor as an anti-angiogenic target for cancer therapy. **Curr Drug Targets**, [S.I.], v. 11, n. 8, p. 1000-1017. DOI:10.2174/138945010791591395. 2010.

OTTO, T.; SICINSKI, P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. **Nat Rev Cancer**, [S.I.], v. 17, n. 2, p. 93-115. DOI: 10.1038/nrc.2016.138. PMID: 28127048; PMCID: PMC5345933. Jan, 2017.

PAULI, F.P.; MARTINS, J.R.; PASCHOALIN, T.; IONTA, M.; BARBOSA, M.L.C.; BARREIRO, E.J. Novel VEGFR-2 inhibitors with an N-acylhydrazone scaffold. **Archiv Der Pharmazie**, [S.I.], v. 353, n. 11. <https://DOI.org/10.1002/ardp.202000130>. 2020.

PRESSETE, C.G.; VIEGAS, F.P.D.; CAMPOS, T.G.; CAIXETA, E.S.; HANEMANN, J.A.C.; FERREIRA-SILVA, G.Á.; ZAVAN, B.; AISSA, A.F.; MIYAZAWA, M.; VIEGAS, C., JR.; IONTA, M. Piperine–Chlorogenic Acid Hybrid Inhibits the Proliferation of the SK-MEL-147 Melanoma Cells by Modulating Mitotic Kinases. **Pharmaceuticals**, [S.I.], v. 16, p. 145. <https://DOI.org/10.3390/ph16020145>. 2023.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J.M.; DEPREZ, R.H.; MOORMAN, A.F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neurosci Lett.**, [S.I.], v. 339, n. 1, p. 62-6. DOI: 10.1016/s0304-3940(02)01423-4. PMID: 12618301. Mar, 2003.

REBOUISSOU, S.; NAULT, J.C. Advances in molecular classification and precision oncology in hepatocellular carcinoma. **J Hepatol.**, [S.I.], v. 72, n. 2, p. 215-229. DOI: 10.1016/j.jhep.2019.08.017. PMID: 31954487. Feb, 2020.

RODERBURG, C.; ÖZDIRIK, B.; WREE, A.; DEMIR, M.; TACKE, F. Systemic treatment of hepatocellular carcinoma: from sorafenib to combination therapies. **Hepatic Oncology**, [S.I.], v. 7, n. 2 HEP20. <https://DOI.org/10.2217/hep-2020-0004>.

2020.

RODRIGUES, D.A.; FERREIRA-SILVA, G.À.; FERREIRA, A.C.; FERNANDES, R.A.; KWEE, J.K.; SANT'ANNA, C.M.; IONTA, M.; FRAGA, C.A. Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Novel N-Acylhydrazone Derivatives as Potent Histone Deacetylase 6/8 Dual Inhibitors. **J Med Chem.** [S.I.], v. 59, n. 2, p. 655-70. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b01525. Epub 2016 Jan 13. PMID: 26705137. Jan, 2016.

SARVEAZAD A, AGAH S, BABAHAJIAN A, AMINI N, BAHARDOUST M. Predictors of 5 year survival rate in hepatocellular carcinoma patients. **J Res Med Sci.**, [S.I.], v. 25, p. 24-86, 2019. DOI: 10.4103/jrms.JRMS_1017_18. PMID: 31741658; PMCID: PMC6856560.

SADASIVAM, S.; DUAN, S.; DECAPRIO, J.A. The MuvB complex sequentially recruits B-Myb and FoxM1 to promote mitotic gene expression. **Genes Dev.**, [S.I.], v. 26, p. 474–489. <https://DOI.org/10.1101/gad.181933.111>. 2012.

SANYAL, A.J.; YOON, S.K.; LENCIONI, R. The Etiology of Hepatocellular Carcinoma and Consequences for Treatment. **The Oncologist**, [S.I.], v. 15, n. S4, p. 14–22. <https://DOI.org/10.1634/theoncologist.2010-s4-14>. 2010.

SHIMADA, S.; MOGUSHI, K.; AKIYAMA, Y.; *et al.* Comprehensive molecular and immunological characterization of hepatocellular carcinoma. **EBioMedicine.**, [S.I.], v. 40, p. 457-470. DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.12.058. Epub 2018 Dec 29. PMID: 30598371; PMCID: PMC6412165. Feb, 2019.

SMITH, J.; THO, L.M.; XU, N.; GILLESPIE, D.A. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. **Adv Cancer Res.**, [S.I.], v. 108, p. 73-112. DOI: 10.1016/B978-0-12-380888-2.00003-0. PMID: 21034966. 2010.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R.L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA Cancer J Clin.**, [S.I.], v. 71, n. 3, p. 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660. Epub 2021 Feb 4. PMID: 33538338. May, 2021.

TAHA, A.M.; ABOULWAFI, M.M.; ZEDAN, H.; HELMY, O.M. Ramucirumab combination with sorafenib enhances the inhibitory effect of sorafenib on HepG2 cancer cells. **Sci Rep.**, [S.I.], v. 12, n. 1, p. 17889. DOI: 10.1038/s41598-022-21582-w. PMID: 36284117; PMCID: PMC9596484. Oct, 2022.

TURKES, F.; CHAU, I. Ramucirumab and its use in the treatment of hepatocellular carcinoma. **Future Oncol.**, [S.I.], v. 15, n. 9, p. 979-988. DOI: 10.2217/fon-2018-0822. Epub 2019 Jan 15. PMID: 30644314. Mar, 2019.

TROJAN, J.; ZANGOS, S.; SCHNITZBAUER, A.A. Diagnostics and Treatment of Hepatocellular Carcinoma in 2016: Standards and Developments. **Visc Med.**, [S.I.], v. 32, p. 116-120. DOI: 10.1159/000445730. 2016.

VAN LEUKEN, R.; CLIJSTERS, L.; WOLTHUIS, R. To cell cycle, swing the APC/C.

Biochim Biophys Acta., [S.l.], v. 1786, n. 1, p. 49-59. DOI: 10.1016/j.bbcan.2008.05.002. Epub 2008 May 21. PMID: 18544349. Sep, 2008.

VIANNA, B.L.; Muncinelli, J.F.G.; Garcia, R.E, Tomasich, F.D.S. HEPATOCELLULAR CARCINOMA – A LITERATURE REVIEW. **Rev. Med. UFPR** v. 2, n. 4, p. 178-188. <https://DOI.org/10.5380/rmu.v2i4.44264>

VILLANUEVA, A. Hepatocellular carcinoma. **N Engl J Med.**, [S.l.], v. 11, n. 380, p. 1450-1462, 2019. DOI: 10.1056/NEJMra1713263.

WANG, H.; THE, M.T.; JI, Y.; PATEL, V.; FIROUZABADIAN, S.; PATEL, A.A.; *et al.* EPS8 upregulates FOXM1 expression, enhancing cell growth and motility. **Carcinogenesis**, [S.l.],v. 31, p. 1132–41. DOI: 10.1093/carcin/bgq058. 2010.

WONG, S.S.; WILMOTT, Z.M.; SAURYA, S.; ALVAREZ-RODRIGO, I.; ZHOU, F.Y.; CHAU, K.Y.; GORIELY, A.; RAFF, J.W. Centrioles generate a local pulse of Polo/PLK1 activity to initiate mitotic centrosome assembly. **EMBO J.**, v. 41, n. 11, p. e110891. DOI: 10.15252/embj.2022110891. Epub 2022 May 3. PMID: 35505659; PMCID: PMC9156973. Jun, 2022.

YOSHIDA, M.; MATSUI, Y.; IIZUKA, A.; IKARASHI, Y. G2-phase arrest through p21(WAF1 / Cip1) induction and cdc2 repression by gnidimacrin in human hepatoma HLE cells. **Anticancer Res.**, [S.l.], v. 29, n. 4, p. 1349-54. PMID: 19414386. Apr, 2009.

YU, S.; LEE, C.; HA, S.; LEE, J.; JANG, K.; PARK, S. Induction of cell cycle arrest and apoptosis by tomentosin in hepatocellular carcinoma HepG2 and Huh7 cells. **Human & Experimental Toxicology**, [S.l.], v. 40, n. 2, p. 231–244. DOI:10.1177/0960327120943935. 2020.

ZUCMAN-ROSSI, J.; VILLANUEVA, A.; NAULT, J.C.; LLOVET, J.M. Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. **Gastroenterology**. [S.l.], V. 149, n. 5, p. 1226-1239.e4. DOI: 10.1053/j.gastro.2015.05.061. Epub 2015 Jun 20. PMID: 26099527. Oct, 2015.