



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS



IGOR GABRIEL DA SILVA RAMALHO

**ATIVIDADE ANTITUMORAL E MECANISMO DE AÇÃO DO
DERIVADO SINTÉTICO 2-(3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-3-il)
acrilonitrila (CH_3ISACN)**

JOÃO PESSOA – PB

2024

IGOR GABRIEL DA SILVA RAMALHO

**ATIVIDADE ANTITUMORAL E MECANISMO DE AÇÃO DO
DERIVADO SINTÉTICO 2-(3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-3-il)
acrilonitrila (CH₃ISACN)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz

Coorientador: Profa. Dra. Micheline Freire Donato

JOÃO PESSOA – PB

2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

R165a Ramalho, Igor Gabriel da Silva.

Atividade antitumoral e mecanismo de ação do
derivado sintético
2-(3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-3-il) acrilonitrila
(CH3ISACN) / Igor Gabriel da Silva Ramalho. - João
Pessoa, 2024.
63 f. : il.

Orientação: Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz.
Coorientação: Micheline Freire Donato.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Câncer. 2. Isatina. 3. Gliomas. 4. U87-MG. I.
Diniz, Margareth de Fátima Formiga Melo. II. Donato,
Micheline Freire. III. Título.

UFPB/BC

CDU 616-006(043)

À minha avó, Marleide Lopes Ramalho (in memorian), dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, e à nossa senhora que nunca soltou a minha mão.

À minha família, por todo carinho, apoio e acolhimento, nas horas mais difíceis, a quem eu sempre pude recorrer, em especial pai e mãe, o meu mais sincero obrigado.

À Eduardo, quem está comigo todos os dias, em todos os momentos, nos bons e nos ruins, os meus sinceros agradecimentos, sem você ao meu lado nada disso seria possível.

Agradeço a todos os meus amigos, por todas as mensagens de apoio e torcida em todos os momentos.

Aos meus amigos do “ONCOTOX”, Geovanna, Isione, Heivila, Moisés, Júnior, Mariana, Paulo, os meus dias foram muito mais leves na presença de vocês.

Aos meus amigos Karinne, Rafael e Ramon, agradeço por toda dedicação de tempo e o apoio que me deram durante esses dois anos de mestrado, eu sou extremamente grato pela amizade de vocês.

Aos meus amigos do vôlei, por toda diversão e leveza em nossos encontros, durante esses dois anos vocês foram incríveis, o meu muito obrigado.

À minha equipe do LABETOX, obrigado por toda torcida, apoio e desenvolvimento dessa pesquisa junto comigo, meu muito obrigado.

À professora Danielle Idalino, por todo o suporte dado durante o meu mestrado meu muito obrigado. A senhora foi essencial nesse processo. Aos professores Humberto, Juan, Demétrios, Mascus Túllius e a doutoranda Nathália o meu muito obrigado pelo apoio e parceria.

À professora Margareth de Fátima, que sempre esteve a frente das minhas orientações por toda a minha trilha acadêmica, meus sinceros agradecimentos. À professora Micheline Donato, meus sinceros agradecimentos pelo apoio.

À UFPB por ter sido minha casa durante todos esses anos, à CAPES por todo o fomento e suporte da pesquisa, os meus sinceros agradecimentos.

A tarefa não é tentar ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.

Arthur Schopenhauer

Ramalho, I. G. S. Atividade antitumoral e mecanismo de ação do derivado sintético 2-(3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-3-il) acrilonitrila (CH_3ISACN). 65p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Área de concentração: Farmacologia) – CCS/Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2024.

RESUMO

Com a estimativa de 704 mil novos casos diagnosticados no Brasil até 2025, o câncer apresenta-se atualmente como uma das doenças com maior prevalência mundial. Os tumores que afetam o Sistema Nervoso Central (SNC), como os gliomas, possuem uma elevada taxa de mortalidade, dentre esses, o glioblastoma é o tipo mais corriqueiro em adultos, com uma taxa de sobrevivência dos pacientes de apenas 5% em até 5 anos. Apesar da crescente evolução das pesquisas envolvendo a busca para o tratamento desses casos, a melhora dos quadros clínicos de gliomas ainda permanece insatisfatória. Com o objetivo de contornar esse problema, a busca por novas substâncias com atividade antineoplásica tem crescido, pesquisas realizadas com a isatina e seus derivados têm apresentado uma notável capacidade de inibir o crescimento de células cancerosas sem afetar o desenvolvimento normal das células saudáveis. Dentre essas, o derivado sintético de N-metil-isatina (CH_3ISACN), um derivado sintético da isatina, é apresentada como uma molécula promissora, com atividades antitumorais em modelos de câncer hepatocelular e de pulmão já documentadas. O presente estudo teve como objetivo investigar a atividade antitumoral da substância CH_3ISACN , em modelos experimentais de glioblastoma humano, com a realização de ensaios de viabilidade celular utilizando as linhagens celulares U87 e U373-MG e investigação do mecanismo de ação da CH_3ISACN utilizando bloqueadores farmacológicos. Nos ensaios de citotoxicidade, foi verificado que a CH_3ISACN foi citotóxica para as células U373 e U87-MG, com as CI_{50} de 24,26 e 24,23 μM , respectivamente. O índice de seletividade da substância foi calculado a partir da CI_{50} da célula não tumoral embrionária humana (HEK-293), constatando que a CH_3ISACN é 3 vezes mais seletiva para as células tumorais. No ensaio utilizando microscopia confocal, foram verificadas as morfologias das células tumorais U87-MG, na concentração de 24 μM , indicando apoptose como o tipo de morte das células tumorais tratadas com o derivado da isatina. A CH_3ISACN , foi capaz de diminuir a formação de novas colônias de células U87-MG, além de ser capaz de desintegrar os esferóides (modelo de cultura 3D), diminuindo a área do esferóide para zero. Foi realizada investigação da via de sinalização de morte celular, por ensaio com bloqueadores farmacológicos e por docking molecular, e as vias muscarínicas e glutamatérgicas não participam do mecanismo de ação da substância, já no modelo do docking molecular, a via das MAPKs foi verificada e a substância possui uma interação favorável com a proteína ERK.

Palavras chaves: Isatina. Câncer. Gliomas. U87-MG

Ramalho, I. G. S. Antitumor activity and mechanism of action of the synthetic derivative 2-(3-hydroxy-1-methyl-2-oxoindolin-3-yl) acrylonitrile (CH₃ISACN). 65p. Dissertation (Master's degree in Natural and Synthetic Bioactive Products – Concentration area: Pharmacology) – CCS/Federal University of Paraíba, João Pessoa, 2024.

ABSTRACT

With an estimated 704,000 new cases diagnosed in Brazil by 2025, cancer is currently one of the most prevalent diseases worldwide. Tumors that affect the Central Nervous System (CNS), such as gliomas, have a high mortality rate, among these, glioblastoma is the most common type in adults, with a patient survival rate of just 5% in up to 5 years. Despite the growing evolution of research involving the search for the treatment of these cases, the improvement in the clinical conditions of gliomas still remains unsatisfactory. In order to overcome this problem, the search for new substances with antineoplastic activity has grown, research carried out with isatin and its derivatives has shown a remarkable ability to inhibit the growth of cancer cells without affecting the normal development of healthy cells. Among these, the synthetic derivative of N-methylisatin (CH₃ISACN), a synthetic derivative of isatin, is presented as a promising molecule, with antitumor activities in hepatocellular and lung cancer models already documented. The present study aimed to investigate the antitumor activity of the substance CH₃ISACN, in experimental models of human glioblastoma, by carrying out cell viability assays using the U87 and U373-MG cell lines and investigating the mechanism of action of CH₃ISACN using pharmacological blockers. In cytotoxicity assays, it was verified that CH₃ISACN was cytotoxic to U373 and U87-MG cells, with IC₅₀ of 24.26 and 24.23 μ M, respectively. The selectivity index of the substance was calculated based on the IC₅₀ of the human embryonic non-tumor cell (HEK-293), finding that CH₃ISACN is 3 times more selective for tumor cells. In the assay using confocal microscopy, the morphologies of U87-MG tumor cells were verified at a concentration of 24 μ M, indicating apoptosis as the type of death of tumor cells treated with the isatin derivative. CH₃ISACN was able to reduce the formation of new colonies of U87-MG cells, in addition to being able to disintegrate the spheroids (3D culture model), reducing the spheroid area to zero. An investigation of the cell death signaling pathway was carried out, through testing with pharmacological blockers and molecular docking, and the muscarinic and glutamatergic pathways do not participate in the substance's mechanism of action. In the molecular docking model, the MAPKs pathway was verified and the substance has a favorable interaction with the ERK protein.

Keywords: Isatina. Cancer. Gliomas. U87-MG

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Características biológicas do câncer.....	19
Figura 2: Representação da via de sinalização celular intrínseca e extrínseca.	22
Figura 3: Estrutura química de CH ₃ ISACN.....	26
Figura 4: Citotoxicidade de CH ₃ ISACN em linhagens tumorais humanas U87 e U373-MG, linhagem não tumoral embrionária humana HEK-293, após 24 horas de tratamento.	34
Figura 5: Indução da apoptose pela CH ₃ ISACN ou demecolcine analisada por coloração de laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP) em células de glioblastoma humano U87-MG após 24 h de tratamento.	37
Figura 6: Indução da apoptose pela CH ₃ ISACN ou demecolcine analisada por coloração de laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP) em células de glioblastoma humano U87-MG após 24 h de tratamento. Erro! Indicador não definido.	
Figura 7: Fotomicrografias representando a influência dos tratamentos com a CH ₃ ISACN na clonogenicidade das células U87-MG, em 7 dias.	41
Figura 8: Número de colônias formadas após 7 dias de tratamento com CH ₃ ISACN.	42
Figura 9: Efeito de CH ₃ ISACN e demecolcine nos esferóides das células U87-MG nos tempos de 0, 3, 6, 18 e 24 horas.	44
Figura 10: Efeito de CH ₃ ISACN e demecolcine nos esferóides das células U87-MG nos tempos de 0, 3, 6, 18 e 24 horas.	46
Figura 11: O gráfico representa a viabilidade celular (%) das células U87-MG nos grupos tratados com a CI50 de CH ₃ ISACN e com os bloqueadores farmacológicos no tempo de 24 h.	48
Figura 12: Interações 2D e 3D entre o composto teste (A), o ligante co-cristalizado (B) e a proteína ERK ½ (PDB: 5LCJ).	52
Tabela 1: Valores de energia de ligação (kJ.mol ⁻¹) e de probabilidade de atividade do composto em estudo nas enzimas relacionadas a atividade antitumoral de acordo com as funções de pontuação MolDock Score e Rerank Score.	50

LISTA DE SIGLAS

AMBH	Adutos de Morita-Baylis-Hilman
CBIOTEC	Centro de Biotecnologia
CH₃ISACN	2-(3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-3-il)
CO₂	Dióxido de carbono
DMEM	Meio Dulbecco's Modified Eagle's
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EPM	Erro Padrão da Média
EUA	Estados Unidos da América
FAAD	Domínio de Morte Associado a FAD
FAD	Dessaturase de ácidos graxos
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPEFARM	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
IS	Índice de Seletividade
LA	Laranja de Acridina
LABETOX	Laboratório de Ensaios Toxicológicos
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
MVD	Molegro Virtual Docker
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PR	Progesterona
RMSD	Desvio Médio Quadrado
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UFPB	Universidade Federal da Paraíba

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1. Substâncias Sintéticas	15
2.1.1 Síntese orgânica	15
2.1.2 Isatina e seus derivados.	15
2.1.3 Reação de Morita-Baylis-Hilman	16
2.1.3 Atividade antitumoral da isatina.....	17
2.2 Atividade antitumoral	17
2.2.1 Aspectos gerais do câncer	17
2.2.2 Gliomas	20
2.2.3 Apoptose.....	21
2.2.4 Linhagens Celulares	23
4. OBJETIVOS	24
4.1 OBJETIVO GERAL.....	24
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
6. Material e método	25
6.1 Locais de Pesquisa	25
6.2 Material	25
6.2.1 Substâncias e reagentes	25
6.2.2 Equipamentos	25
6.2.3 Substância teste	26
6.2.4 Linhagens celulares	26
6.3 Método.....	27
6.3.1 Ensaio de Viabilidade Celular MTT	27
6.3.2 Análise morfológica de células U87-MG por microscopia confocal após coloração com laranja de acridina e iodeto de propídio	28
6.3.3 Ensaio de formação de colônias	28
6.3.4 Ensaio com os bloqueadores farmacológicos	29
6.3.5 Cultura 3D (Esferóides).....	29
6.3.6 Docking molecular.....	30
6.3.6.1 Molegro Virtual Docker (MVD) 6.0	31
6.3.6.2 Docking consensus.....	32

6.10 Análises Estatísticas.....	32
7. Resultados e discussões.....	33
7.1 Citotoxicidade de CH ₃ I/SACN em linhagens de células tumorais humanas e não tumoral embrionária humana	33
7.2 Morfologia das células U87-MG por microscopia confocal após coloração com laranja de acridina e iodeto de propídeo.....	37
7.3 Ensaio de formação de colônias.....	40
7.4 Ensaio dos esferóides (Cultura 3D)	43
7.4 Ensaio com os bloqueadores farmacológicos	47
7.5 Docking molecular	49
8. Conclusões	53
Referências	54

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma das doenças mais prevalentes no mundo, estima-se que até 2025 cerca de 704 mil pessoas sejam diagnosticadas no Brasil (INCA,2022). Além disso, aproximadamente, 9,6 milhões de pacientes no mundo foram a óbito no ano de 2022 acometidos pela doença. Portanto, ela é caracterizada pela rápida proliferação de células anômalas nas quais crescem e se expandem além do seu limite, dessa forma, podendo afetar diversas partes do corpo humano (OPAS, 2024).

Os tumores do Sistema Nervoso Central são sólidos, geralmente são descobertos durante a infância e tem uma alta taxa de mortalidade (DA SILVA, 2020). Os gliomas são tumores primários, com alto grau de mortalidade e representam mais de 70% das neoplasias do SNC (DOS SANTOS, 2021). Epidemiologicamente, o tipo mais frequente de glioma em adultos é o glioblastoma, que segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) corresponde ao grau IV, compreendendo 15% dos tumores primários do SNC e a 55% de todos os gliomas. A incidência de glioblastoma é de 3,19 para 100.000 com uma sobrevida máxima de 5 anos para menos que 5% dos casos (VIGNESWARAN, et. al., 2015).

Mesmo com os avanços no tratamento, a melhoria dos quadros clínicos de gliomas ainda não é satisfatória. Atualmente o tratamento mais convencional vem sendo a ressecção cirúrgica máxima, acompanhada da quimioterapia e radioterapia (DOS SANTOS, 2021). Ainda há uma grande dificuldade na administração eficiente de agentes terapêuticos através da barreira hematoencefálica e isso dificulta o tratamento dessas doenças presentes no SNC (WANG, et. al., 2017).

Dessa forma, a busca por novos medicamentos contra neoplasias se tornou constante devido ao aumento significativo no número de novos casos nos últimos anos (DA ROCHA, 2018). Nesse contexto, foi evidenciado um crescimento na produção de novas substâncias sintéticas com o intuito de promover um melhor tratamento para diversas doenças.

Os derivados da Isatina com o núcleo 3-hidroxi-2-oxindola-3-substituídos, são ditas substâncias privilegiadas, por possuírem diversas atividades farmacológicas, entre elas a atividade antineoplásica

(PEDDIBHOTLA, 2009). A CH₃ISACN é uma substância promissora, sintetizada através de uma reação de adição chamada Morita-Baylis-Hillman, a qual gera compostos polifuncionalizados. Esta compreende uma reação rápida, que produz essa substância em um tempo de aproximadamente 40 minutos e com um alto rendimento de cerca de 99% (LIMA JUNIOR et. al., 2016).

Adicionalmente, vários trabalhos com a isatina e derivados apontaram que essas substâncias se apresentam como fortes candidatas a agentes antineoplásicos (PEDDIBHOTLA, 2009), tendo em vista que um derivado da isatina com o núcleo 3- hidroxí-2-oxindol-3-substituídos possuem atividade antitumoral já comprovada em modelos de câncer de adenocarcinoma de pulmão, carcinoma hepatocelular (FRANZ, et. al., 2007).

Dessa forma, sabendo que o câncer é um problema de saúde pública, com altas taxas de mortalidade, e que o tratamento ainda está associado com alta toxicidade e resistência, e considerando os efeitos já descritos de derivados da isatina, o presente trabalho avaliou a atividade antitumoral do derivado sintético N-metil-isatina (CH₃ISACN) em linhagens tumorais humanas de glioma.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Substâncias Sintéticas

2.1.1 Síntese orgânica

Nos dias de hoje, os produtos naturais continuam sendo os meios mais utilizados como forma de tratamento em diversas doenças, sendo estes umas das fontes de pesquisa para novos agentes terapêuticos, tais como medicamentos fitoterápicos ou ainda utilizando os princípios ativos isolados que possam ser usados na produção de novos medicamentos (CASANOVA, et. al., 2019)

Contudo, uma problemática no uso de produtos naturais e derivados se dá uma vez que esses princípios bioativos são isolados de maneira lenta e em baixa quantidade, dificultando assim a pesquisa de novas drogas. Com isso, as substâncias sintéticas passaram a ter grande importância no planejamento de novos medicamentos. Assim, a síntese orgânica cresceu muito nos últimos anos, sendo responsável, hoje, pela grande quantidade de novos fármacos e vários candidatos a fármacos (SANGI, et.al., 2016)

A atuação da síntese orgânica vem crescendo juntamente com a química medicinal na indústria farmacêutica, no que diz respeito à produção e pesquisa de novos medicamentos, além de sua segurança e eficácia. E isso também favorece na diminuição do tempo da pesquisa, visto que a síntese orgânica demanda um tempo menor para garantir a produção de moléculas (PRAJAPAT, et.al., 2017).

A síntese orgânica tem tido grande importância no desenvolvimento de novos fármacos, tornando-os mais seletivos aos alvos e proporcionando um melhor rendimento. Através de modificações moleculares é possível deixar o princípio ativo mais estável, e dessa forma apresentar melhor ação biológica (LEITE et al, 2015).

2.1.2 Isatina e seus derivados.

Os compostos heterocíclicos são bastante notáveis na área da química devido à sua capacidade de gerar novas substâncias a partir da substituição de

átomos de carbono por heteroátomos. Ainda, esses compostos são capazes de desencadear diferentes respostas farmacológicas, o que incentiva os pesquisadores a criarem compostos híbridos e explorarem suas propriedades medicinais. (Rajarshi., et al. 2020)

A isatina é um alcalóide natural encontrado em diferentes organismos, em sua estrutura está presente o núcleo indol, esse que possui boa estabilidade e possibilita à isatina uma gama de alterações em sua estrutura. Esse núcleo é uma molécula heterocíclica de natureza aromática e bicíclica plana, seu anel benzeno liga-se pelas posições 2 e 3 ao anel pirrol, que contém nitrogênio. Ainda, este composto sofre facilmente reações de substituição eletrofílica, por isso é muito utilizado por químicos para introdução de grupos farmacofóricos na sua composição, uma vez que quase todas as posições da molécula podem ser modificadas. (Melis et al., 2017; Ding et al., 2020)

A estrutura da isatina é bastante versátil, sendo precursora de diferentes derivados com uma ampla gama de propriedades biológicas e farmacológicas, como antimalárica, antidiabética, anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana, entre outras. Dessa forma, visando a obtenção de diversificadas estruturas, podem ser empregadas diferentes reações químicas para obtenção desses derivados. (Thakur et al., 2019; Lahari et al., 2020; Toumi et al., 2021)

2.1.3 Reação de Morita-Baylis-Hilman

A reação de Morita-Baylis-Hilman, foi originada em 1968 com Morita descrevendo a reação de aldeídos com acrilatos (MORITA; SUZUKI; HIROSE, 1968), em 1972 Baylis e Hillman complementam essa reação com acoplamentos catalisados entre alcenos ativados e aldeídos. Atualmente, essa constitui uma das mais úteis e populares reações de ligação carbono-carbono. Por meio desta, cria-se um centro quiral, no qual permite a síntese de valiosos compostos, devido suas abundantes funcionalidades, os ditos AMBH (adutos de Morita-Baylis-Hilman). (PELLISSIER, 2017).

Os derivados da Isatina com o núcleo 3-hidroxi-2-oxindola-3-substituídos, são ditas substâncias privilegiadas, por possuírem diversas atividades farmacológicas, particularmente a antitumoral. LIMA-JUNIOR (2016) descreve a atividade citotóxica de trinta e quatro AMBH, dentre esses se destaca o

composto 2-(3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-3-il) acrilonitrila, também chamado por CH3ISACN, esse derivado da isatina é uma substância promissora, sintetizada através da reação de Morita-Baylis-Hillman, ocorrendo em um curto período reacional, de aproximadamente 40 minutos, que produz essa substância com um alto rendimento, cerca de 99% (Santos, 2009).

2.1.3 Atividade antitumoral da isatina

A pesquisa nesse campo tem revelado que a isatina e seus derivados apresentam uma notável capacidade de inibir o crescimento de células cancerígenas em diversos tipos de tumores. Ainda, alguns estudos indicam que a isatina pode atuar de forma sinérgica com outros agentes quimioterápicos, potencializando sua eficácia e reduzindo a resistência das células cancerígenas aos tratamentos convencionais. Assim, tal capacidade de sensibilizar as células tumorais frente aos tratamentos já existentes é extremamente promissora no campo da oncologia. (Busto et al., 2022)

Outro aspecto positivo do uso da isatina como substância antitumoral é sua relativa seletividade, ou seja, sua capacidade de atingir seletivamente células cancerígenas sem afetar, significativamente, as células saudáveis circundantes. Isso reduz os efeitos colaterais associados aos tratamentos convencionais contra o câncer, melhorando assim a qualidade de vida dos pacientes. (Ding et al., 2020)

Contudo, mesmo com avanços promissores, ainda há desafios no desenvolvimento e utilização clínica da isatina como um agente antitumoral, mais estudos são necessários para elucidar completamente seus mecanismos de ação, otimizar sua eficácia e garantir a segurança do seu uso aos pacientes. No entanto, os resultados obtidos até o momento indicam que a isatina tem potencial para se tornar uma importante adição ao arsenal terapêutico contra o câncer (Kakkar, 2019).

2.2 Atividade antitumoral

2.2.1 Aspectos gerais do câncer

A proliferação celular é um processo natural e de suma importância para a manutenção e desenvolvimento da vida, na homeostase as células do corpo se multiplicam de maneira controlada por diversos sinais reguladores os quais são responsáveis pelo equilíbrio apropriado tanto da divisão celular, quanto da apoptose, que é a morte programada da célula (AlBedeary; Getta; Al-Sharaf, 2020) (Morana; Wood, 2022).

Todavia, esse equilíbrio pode ser alterado por diversos fatores, levando ao aparecimento dos tumores (Smith, et al., 2020). Os tumores podem ser divididos em benígnos e malignos (Baloch et al. 2022). Os tumores benígnos apresentam delimitações bem marcadas, estão presentes apenas no tecido de origem e células bem semelhantes às do tecido local (Boutry et al. 2022).

Em contra partida, os tumores malignos se apresentam como uma massa de células anormais, geneticamente modificadas, com uma capacidade absurda de invasão de tecidos subjacentes, ou ainda para tecidos mais distantes, processo esse denominado de metástase (Galon; Lanzi, 2020).

Dessa forma, o câncer pode ser entendido como um conjunto de doenças que se caracteriza pela rápida proliferação de células, acarretada por um descontrole e mutações nos genes codificadores de proteínas envolvidas nos processos de divisão celular (PEREIRA, 2019; BERNARDES, 2019).

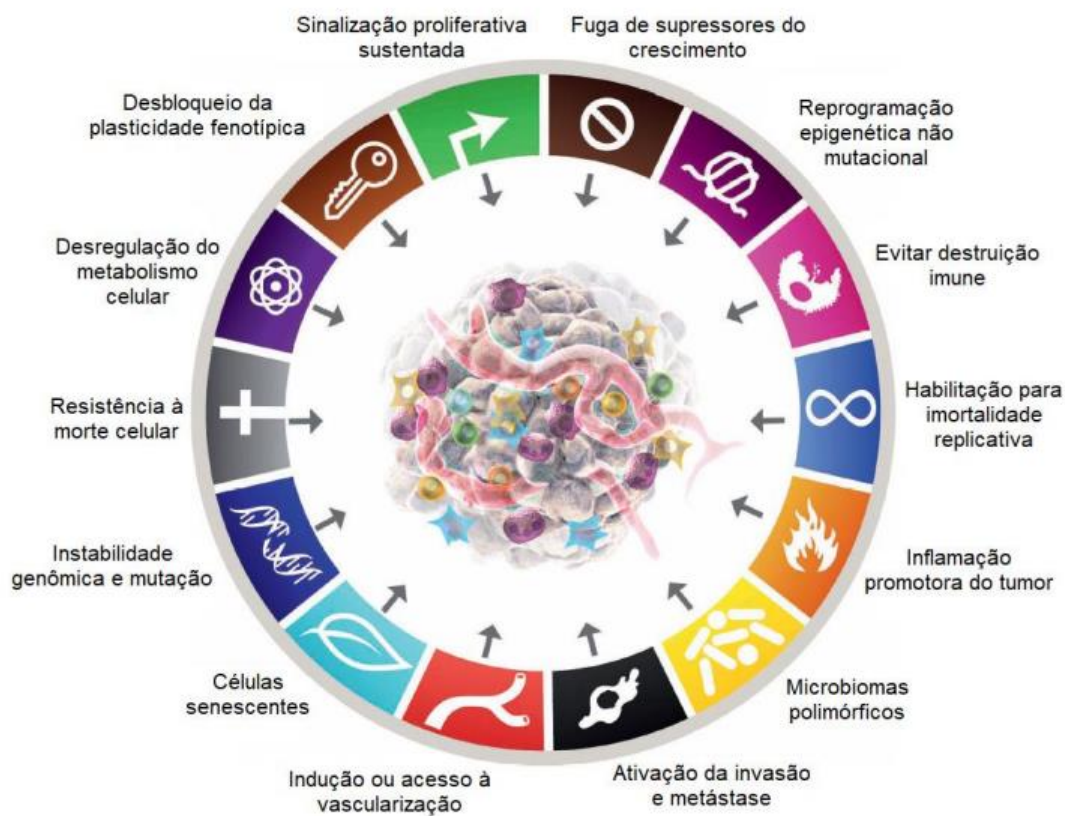
Segundo a OMS, ainda é uma das principais causas de morte em todo o mundo, ocupando hoje o segundo lugar no ranking das doenças que mais matam. Estima-se que cerca de 9,6 milhões de pessoas morreram dessa doença somente em 2018, e o seu desenvolvimento ainda está ligado a fatores como o tabagismo, consumo de álcool e uma dieta não balanceada (OPAS, 2020).

No Brasil, foram notificados cerca de 704.080 casos da doença somente em 2022, sendo mais prevalente o câncer de próstata em homens e o de mama em mulheres. E a estimativa é que até o ano de 2025 mais 704 mil casos serão diagnosticados (Inca, 2022).

Podem-se citar diversos tipos de cânceres, como carcinomas, que são os tipos mais comuns e são originados de células epiteliais a exemplo do câncer de tireóide (Prete et al. 2020); os sarcomas, que são originários de tecidos moles e ósseos (Kohlmeyer et al. 2020); as leucemias, as quais se originam de células sanguíneas (Nemkov; D'alessandro; Reisz, 2019), e também os tumores do sistema nervoso central como os gliomas (Śledzińska et al. 2021).

Mesmo com vários tipos de cânceres diferentes, as células tumorais apresentam características comuns entre si, chamadas de *hallmarks* do câncer (López-Otín et al. 2023) são elas: sinalização proliferativa sustentada; fuga de supressores do crescimento; reprogramação epigenética não mutacional; evasão da destruição imune; habilitação para imortalidade replicativa; inflamação promotora do tumor; microbiomas polimórficos; ativação da invasão e metástase; indução ou acesso à angiogênese; células senescentes; instabilidade genômica e mutação; resistência à morte celular; desregulação do metabolismo celular; e desbloqueio da plasticidade fenotípica (Hanahan, 2022) (Figura 1).

Figura 1: Características biológicas do câncer.



Fonte: adaptado de Hanahan (2022).

Uma série de eventos moleculares estão associados diretamente com a transformação de células sádias em células anômalas, esses eventos alteram o ciclo de vida dessas células e seus mecanismos de proliferação, e a esse processo se dá o nome de carcinogênese, através das etapas de iniciação,

promoção e progressão (Giatagana et al. 2021).

Com altas taxas de mortalidade e morbidade, ainda se encontra dificuldades para o tratamento dessa doença, sendo os mais comuns a combinação de cirurgia, radioterapia, quimioterapia e imunoterapia (HUSE & HOLLAND, et.al., 2010). Por isso, é de grande importância a busca de tratamentos alternativos.

2.2.2 Gliomas

Os tumores primários do sistema nervoso central (SNC) compreendem cerca de 2% dos tumores primários e levam a óbito cerca de 7% das pessoas com câncer antes dos 70 anos de vida. A incidência total de tumores primários do SNC é aproximadamente 18,7 para 100.000 pessoas nos Estados Unidos, e 7 para 100.000 pessoas nos demais países do mundo (Theeler *et al.*, 2012; Vigneswaran *et al.*, 2015).

No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a cada ano são diagnosticados cerca de 11.100 tumores do sistema nervoso central, em geral a probabilidade de se desenvolver um tumor desse tipo é inferior a 1%, e são mais comuns em mulheres que homens.

Esses tumores se originam tanto no cérebro quanto na medula espinhal e podem ser benignos ou malignos (Ostrom et al. 2019). Esses tumores podem se originar de células da glia, como os gliomas (Youssef; Miller, 2020); de células meningeais, os meningiomas (Maggio et al. 2021) e tumores neuroectodérmicos primitivos, os meduloblastomas (Orr, 2020).

Os gliomas são tumores que se originam das chamadas células da glia, que são células de suporte, eles podem ser formados em diferentes áreas do cérebro, com um alto grau de invasão (Yang et al. 2022). Eles podem ser divididos em quatro graus, de acordo com a severidade: graus I e II, astrocitoma, oligodendroma ou oligoastrocitoma; grau III, anaplástico astrocitoma/oligodendroglioma; grau IV, glioblastoma (Zhang et al. 2015).

As neoplasias do tipo glioblastoma caracterizam-se como tumores extremamente invasivos e fatais, formados a partir de células astrocitárias que correspondem a uma das principais causas de morte relacionadas ao câncer em ambas as populações adulta e infantil. Pacientes com esses tipos de tumores

apresentam uma sobrevivência média de 12 a 15 meses (Huse & Holland *et al.*, 2010).

O tratamento desse tipo de tumor inclui uma combinação de cirurgia, terapia de radiação e quimioterapia, contudo só oferecem efeitos paliativos para a sobrevivência (Xu *et al.* 2020). Apesar de muito conhecimento do microambiente tumoral, e de toda biologia conhecida desses tumores, os gliomas ainda são tumores incuráveis (Watowich; Gilbert; Larion, 2023).

2.2.3 Apoptose

As células presentes no corpo humano apresentam diferenciadas vias de sinalizações das quais promovem indução à sua morte, dentre elas temos a apoptose. É caracterizada por apresentar um programa fortemente regulado e evolutivamente conservado para prover a destruição da célula, sendo primordiais para desempenho de funções a exemplo da embriogênese, a homeostase do tecido adulto e principalmente de supressor de possíveis células tumorais. Logo, é uma resposta fisiológica normal de morte celular do organismo podendo ser desencadeada por diferentes fatores como infecções, danos, tratamentos com uso de drogas citotóxicas ou radioterapias (Morana; Wood; Gregory, 2022).

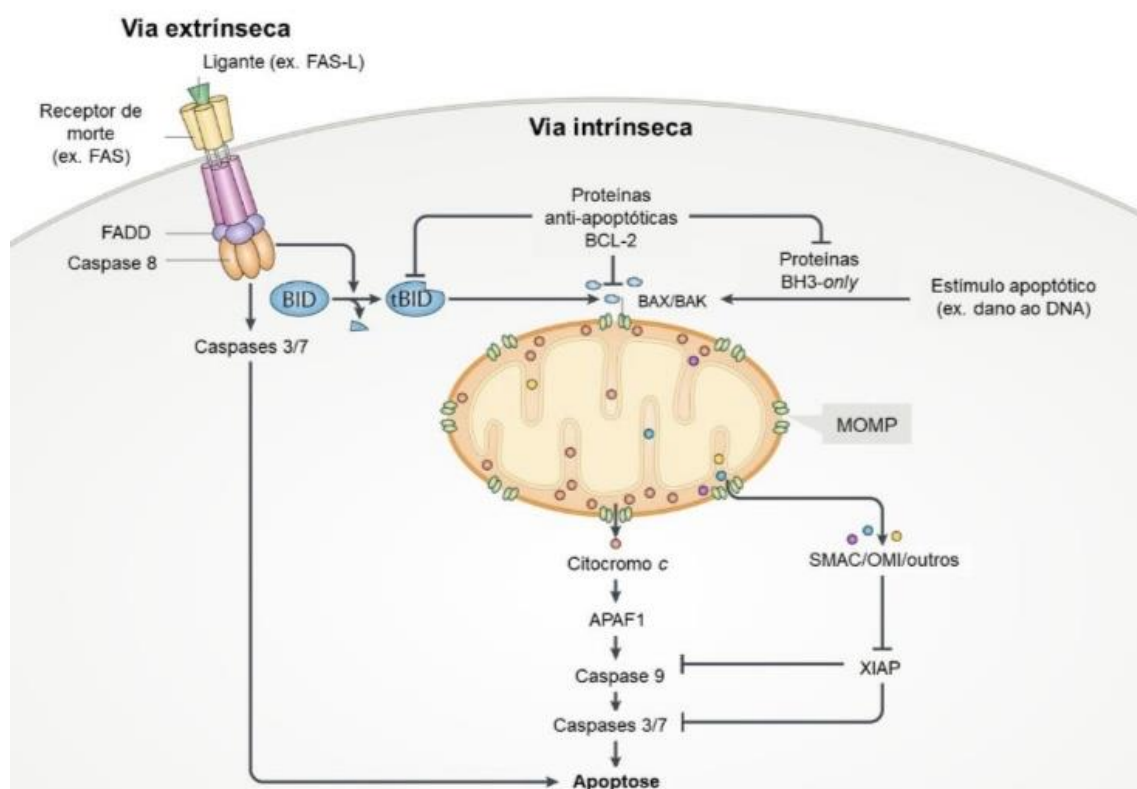
A morfologia das células é específica do processo podendo apresentar um encolhimento celular, condensação da cromatina nuclear, fragmentação do DNA e formação de corpos apoptóticos. Essas modificações estruturais ocorrem em decorrência do processo da ativação das caspases, nas quais são proteases que se fragmentam em proteínas essenciais para a estrutura e funcionamento celular (Saraste; Pulkki, 2000).

A via de sinalização envolvida na ativação das caspases é bem definida, acontecendo pela via intrínseca ou extrínseca (Figura 2). A primeira citada é ativada através de estresses internos dos quais ocasionam danos ao DNA ou acúmulos de proteínas anormais (Alberts *et al.*, 2015). Dessa maneira, as proteínas da Família Bcl-2 presentes na via são responsáveis por regular a permeabilização da membrana externa mitocondrial, apresentando membros anti e pró-apoptóticos. Eles são inibidores de atividade uns dos outros, logo, quando um está ativado inibe a ação do outro, regulando a via. Nesse contexto,

quando a célula sofre danos intracelulares, as proteínas pró-apoptose são ativadas neutralizando as anti fazendo com que haja a liberação das BAX e BAK, as quais promovem permeabilidade a liberação de citocromo C ativador da caspase-9, por fim, quando ativada induz a morte celular (Carneiro; El-Deiry, 2020).

Por outro lado, a via extrínseca, pode ser desencadeada por estímulos externos, ou seja, na superfície celular. Esses estímulos ativam receptores de fatores de morte, como Fes e TNF, através de ligantes como CD95FasL, TNF e TRAIL (Boice; Bouchier-Hayes, 2019). Esses, são responsáveis por ativar o complexo de sinalização de recrutamento do Domínio de Morte Associado a FAD (FADD) que induz ativação da caspase-8 levando à morte celular (Voss; Strasser, 2020).

Figura 2: Representação da via de sinalização celular intrínseca e extrínseca.



Fonte: adaptado de Bock; Tait, 2020.

Portanto, o papel apoptótico da célula vem sendo associado cada vez mais ao câncer, isso ocorre porque as células cancerígenas adquiriram com as mutações

gênicas resistência aos mecanismos indutores que levam à morte promovendo fracasso aos tratamentos (Morana; Wood; Gregory, 2022).

2.2.4 Linhagens Celulares

As linhagens celulares comumente são utilizadas como uma alternativa interessante para compreender processos farmacodinâmicos, como especificidade de drogas aos receptores e sinalização celular, além de serem úteis em ensaios de citotoxicidade utilizando biocompostos ativos, medicamentos, compostos sintéticos e nanocompostos (ARBO et al., 2015).

A linhagem celular U87 MG (ATCC® HTB-14), é uma linhagem humana utilizada como modelo experimental de glioma grau IV (glioblastoma). Essa linhagem tem capacidade aderente, além de formar esferas nas quais contem células-tronco tumorais, e que são responsáveis pela formação de tumores com as características típicas dos glioblastomas humano (YU, et. al., 2008).

Nessas células foram identificadas a presença de genes para receptores Toll-like do tipo TLR2 e TLR4 bem como a co-expressão de genes para as proteínas imunes CD14 e MyD88, o que pode relacionar um processo inflamatório com resposta imune no SNC (MALVANDI, MEHRZAD & MOGHADDAM, 2011). Além de indicar a presença de receptores para progesterona (PR) como sendo importantes para o desenvolvimento do tumor (GONZÁLEZ-OROZCO, et. al., 2018).

A linhagem U-373 MG (ATCC® HTB-17) é uma linhagem humana de glioblastoma-astrocitoma derivada de tumor maligno. Essa linhagem apresenta alguns receptores de membrana específicos, tais como o receptor taquicinina NK1, específico para a substância P (HEUILLET et. al., 1990), além de receptores muscarínicos que modulam canais para potássio ativados pelo cálcio (tipo BK) (BORDEY et al., 2000).

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade antitumoral e mecanismo de ação do derivado sintético de N-metil-isatina (CH₃ISACN)

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* da substância sintética CH₃ISACN em células tumorais de glioma U87 e U373-MG;
- Avaliar a citotoxicidade de CH₃ISACN em linhagem de células sádias HEK-293 (renal);
- Determinar o índice de seletividade (IS) da CH₃ISACN;
- Avaliar o tipo de morte induzido pela CH₃ISACN (Apoptose ou necrose) em células U87-MG;
- Avaliar a formação de colônias da linhagem U87-MG pelo ensaio clonogênico;
- Avaliar a atividade de CH₃ISACN em cultura celular 3D das células U87-MG (esferóides);
- Avaliar o mecanismo de ação de CH₃ISACN nas células U87-MG utilizando bloqueadores farmacológicos;
- Determinar os valores de energia de ligação e os encaixes 2D e 3D entre CH₃ISACN e as estruturas cristalográficas das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs), da Proteína Cinase B (PKB/AKT) em células U87-MG.

6. Material e método

6.1 Locais de Pesquisa

As atividades foram desenvolvidas no Laboratório de Ensaio Toxicológicos (LABETOX) – CCS/UFPB e no Laboratório de Cultivo Celular em colaboração com o Prof. Dr. Demétrius Araújo (CBiotec-UFPB). O docking molecular foi realizado no Laboratório de Quimioinformática localizado no IPeFarM/UFPB em colaboração com a profa. Dra. Luciana Scotti, prof. Dr. Marcus Tullius Scotti e a Me. Natália Ferreira de Sousa.

6.2 Material

6.2.1 Substâncias e reagentes

Foram utilizadas as seguintes substâncias: azul de tripan (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), solução fosfato tamponada (PBS) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), dimetilsulfóxido (DMSO) (Dinâmica®, Indaiatuba, São Paulo, Brasil), brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), meio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), Lglutamina (Nutricell®, Campinas, São Paulo, Brasil), soro fetal bovino (SBF) (GIBCO®, 69 Grand Island, New York, EUA), solução estabilizada de penicilina (100 UI/mL) - estreptomicina (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), iodeto de propídeo (Thermo Fisher®, Rochester, New York, EUA), anexina VFITC (Thermo Fisher®, Rochester, New York, EUA), tripsina 0,25% com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA) e violeta de genciana.

6.2.2 Equipamentos

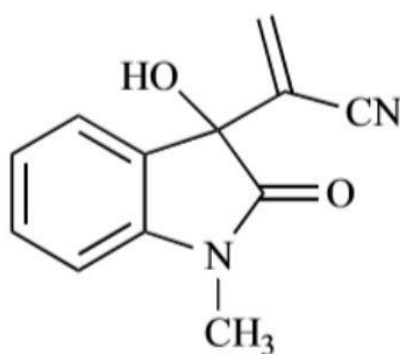
Foram utilizados os seguintes equipamentos: centrífuga Rotina 380R (Hettich®, North Rhine-Westphalia, Alemanha), microscópio invertido Nikon eclipse TS100 (Olympus®, Tóquio, Japão), balança analítica eletrônica SHI-AUW220D (Shimadzu®, São Paulo, Brasil), cabina de fluxo de ar laminar vertical Aeolus V (Telstar®, São Paulo, Brasil), incubadora de CO₂ MCO-18ACL-PA (Panasonic®, Osaka, Japão), leitor de multidetecção Synergy HT (BioTek®,

Vermont, EUA), autoclave vertical linha CS-A (Prismatec®, São Paulo, Brasil), estufa de secagem (DeLeo® equipamentos laboratoriais, Rio Grande do Sul, Brasil), microscópio confocal de varredura a laser (Leica®, Hesse, Alemanha), banho- 70 maria AQUAline (LAUDA®, São Paulo, Brasil), geladeira DFN49 (Eletrolux®, Paraná, Brasil), agitador MS 3 digital (IKA®, Baden-Württemberg, Alemanha), microscópio estereoscópio.

6.2.3 Substância teste

O derivado da isatina 2-(3-hidroxi1-metil-2-oxoindolin-3-il) acrilonitrila, também chamado de CH₃ISACN (figura 1) foi sintetizado e cedido pelo Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal da Paraíba (LASOM-PB), coordenado pelos professores Dr. Claudio Gabriel Lima Júnior e Dr. Mário Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos, do departamentode Química da UFPB.

Figura 3: Estrutura química de CH₃ISACN.



Fonte: LIMA-JUNIOR et al., 2016

A substância foi preparada utilizando DMSO (Dimetilsulfóxido) e estocada como uma solução mãe de concentração 2 Mm em PBS. E diluídas nas concentrações desejadas antes de cada experimento utilizando tampão fosfato (PBS).

6.2.4 Linhagens celulares

Para os ensaios de citotoxicidade foram utilizadas as linhagens celulares:

U87-MG (glioma grau IV humano), U373-MG (glioma grau III humano) e HEK-293 (renal-embrionária).

As células de linhagem neuronal de glioma U373 e U87-MG e a linhagem não tumoral HEK-293 foram alocadas e mantidas aderidas em garrafas de cultivo celular (T-25), com meio de cultura DMEM high glucose (Sigma Aldrich) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 1% (v/v) de antibiótico penicilina/estreptomicina, 1% (v/v) de L-Glutamina, além de manter o Ph do meio em 7,4. As garrafas foram incubadas a 37°C em uma estufa de cultivo celular devidamente umidificada, apresentando 5% de CO₂ e 95% de O₂. Por fim, a confluência celular das garrafas foi monitorada por microscopia óptica até atingir 80%. Após isso as células foram centrifugadas a 1400 rpm por 4 minutos e ressuspensas em meio suplementado para a contagem em câmera de Neubauer. A viabilidade celular foi avaliada usando o corante azul de tripan e a concentração celular ajustada para 1×10^4 células/mL.

6.3 Método

6.3.1 Ensaio de Viabilidade Celular MTT

As células de glioblastoma e a linhagem não tumoral foram semeadas em placas de 96 poços e mantidas por 24 horas na incubadora de cultivo, em condições padrões e com volume de 100 µL de meio DMEM high glucose completo, na densidade de 1×10^4 células por poço.

Após as 24 horas, foi adicionado 100 µL de meio completo em solução com as concentrações da CH₃ISACN e demecolcine, como controle positivo foi utilizado um agente permeabilizante de membranas, o triton-x 1%, já no controle negativo foi usado o próprio meio. Passadas mais 24 horas, o sobrenadante foi removido e no lugar foi adicionado 100 µL de MTT na concentração de 5 mg/ml, incubado por 4 horas na ausência de luz. Após as 4 horas, o MTT foi removido e adicionados 100 µL de DMSO para solubilização dos cristais de formazan. As densidades ópticas foram medidas usando um leitor de microplacas em $\lambda = 570$ nm e usado para calcular a CI₅₀ (concentração inibitória média). Para cada linhagem celular, foram realizados três experimentos em triplicata.

O Índice de Seletividade (IS) foi determinado de acordo com a fórmula: $IS = CI_{50}$ da linhagem celular não tumoral (HEK-293)/ CI_{50} da linhagem celular

tumoral.

6.3.2 Análise morfológica de células U87-MG por microscopia confocal após coloração com laranja de acridina e iodeto de propídio

Neste ensaio, foi realizada a análise morfológica de células U87-MG após tratamento com a CH₃ISACN. As células foram coradas com laranja de acridina (LA) e IP. LA é um corante metacromático, permeável às membranas celulares, que possui afinidade por ácidos nucleicos (Gao et al., 2020). Células viáveis são coradas em 77 verde, por ligação do LA ao RNA citoplasmático e nuclear (Bankó et al., 2021). Para isto, as células U87-MG foram plaqueadas (1×10^4 células/mL) em placas de 24 poços e incubadas com a CH₃ISACN (24 µM/mL, correspondente a CI₅₀) ou demecolcine 0,05 µM, correspondente a CI₅₀, dissolvidos em DMSO a 0,2%, por 24 h. Após este período de tratamento, as células foram coletadas e centrifugadas (500 × g, 20 °C, 5 minutos), ressuspensas em PBS e coradas com LA (1 mg/mL) e solução de IP (10 µg/mL). As células coradas foram observadas sob um microscópio confocal de varredura a laser (Sousa et al., 2023). O critérios estabelecidos foram: a) células viáveis eram aquelas que possuíam núcleo verde claro e estrutura intacta; b) células apoptóticas precoces (iniciais), possuíam núcleo verde brilhante, mostrando cromatina em condensação; c) células apoptóticas tardias, mostrando áreas alaranjadas densas (coradas em verde e vermelho) de condensação da cromatina e formação de bolsas apoptóticas (blebs) da membrana; d) e células necróticas ou mortas, coradas apenas em vermelho (Robbins, Marcus, 1963; Renviosé et. al., 1998; Tan et al., 2019). Foram realizados três experimentos independentes em duplicata.

6.3.3 Ensaio de formação de colônias

As células U87-MG foram cultivadas e semeadas em baixas densidades em placas 24 poços, tratadas com diferentes concentrações (12 e 24 µM/mL) de CH₃ISACN e incubadas por aproximadamente 7 dias em estufa a 37°C com 5% de CO₂, havendo manutenção com trocas de meio de cultura em dias alternados. Após esse período, os poços foram lavados com PBS e as células fixadas com metanol 100% e então coradas com solução de violeta

genciana (FRANKEN et al., 2006). As placas foram avaliadas em microscópio ótico e estereoscópico, onde os poços foram fotografados e as colônias formadas, com no mínimo 50 células, foram contadas com ajuda do software Image J (NIH, EUA). Droga padrão como demecolcine foi utilizada como controle positivo, nas mesmas condições descritas anteriormente.

6.3.4 Ensaio com os bloqueadores farmacológicos

As células U87-MG foram semeadas em placas de 96 poços e mantidas por 24 horas na incubadora de cultivo, em condições padrões e com volume de 100 µL de meio DMEM high glucose completo, na densidade de 1×10^4 células por poço.

Após as 24 horas, foram acrescidos 100 µL de meio, em solução com CH₃ISACN na concentração de 24 µM/mL, também foram adicionados os bloqueadores farmacológicos 30 minutos antes da adição da substância CH₃ISACN, como controle positivo foi utilizado um agente permeabilizante de membranas, o triton-x 1%, já no controle negativo foi usado o próprio meio. Passadas mais 24 horas, o sobrenadante foi removido e no lugar foi adicionado 100 µL de MTT na concentração de 5 mg/ml, incubado por 4 horas na ausência de luz. Após as 4 horas, o MTT foi removido e adicionados 100 µL de DMSO para solubilização dos cristais de formazan. As densidades ópticas foram medidas usando um leitor de microplacas em $\lambda = 570$ nm. Para obter os resultados, foram realizados três experimentos em triplicata.

6.3.5 Cultura 3D (Esferóides)

Para esse ensaio, foram depositadas gotas contendo 25 µl de uma suspensão celular, na concentração de 4×10^4 células/ml, na tampa de uma placa de petri descartável e estéril. Em seguida, a tampa foi invertida sobre a placa de petri, permitindo o acúmulo de células na interface líquido/ar e aguardou-se 3 dias para a formação do esferóide. Os esferóides foram transferidos para uma placa de 48 poços, um por poço, e a placa foi incubada por trinta minutos à 37°C e 5% de CO₂, a fim de garantir a adesão do esferóide à placa. Após os trinta minutos, adicionou-se 1 ml do tratamento, o qual consistiu

no meio base, CH₃ISACN nas concentrações de sua IC₅₀ (24 µM), a metade da IC₅₀ (12 µM). Como controle positivo, foi utilizado o demecolcine na concentração de 0.05 µM. Além disso, cada grupo foi realizado em triplicata. A migração celular foi avaliada por meio de Digifotomicrografias do plano médio dos esferóides nos tempos de 0,3,6,18 e 24 horas de exposição aos tratamentos. A área de migração foi mensurada utilizando o software Imaje J e a porcentagem de migração foi obtida pela normalização dos dados, considerando a média do grupo controle (meio base) como 100%. Por fim, a comparação entre os grupos foi realizada utilizando o teste Anova two-way e pós teste Tuckey, e considerou-se valores de p menores que 0,05 como nível crítico para rejeição da hipótese de nulidade ($p < 0,05$).

6.3.6 Docking molecular

A simulação de *Docking* molecular foi utilizada para investigar o mecanismo do composto teste em estudo que contribua para efeito antitumoral através da afinidade de ligação deste aos respectivos alvos: ERK ½ em complexo com inibidor piridina carbamato (PDB: 5LCJ), com resolução de 1.78 Å e obtida pelo método de Difração de raios-X; JNK-1 em complexo com inibidor Pirazoloquinolonas (PDB: 2G01), com resolução de 3.50 Å e obtida pelo método de Difração de raios-X e PKB Domínio de Quinase (PDB: 1GZN), com resolução de 2.50 Å e obtida pelo método de Difração de raios-X, esta proteína não apresenta ligante co-cristalizado, então foi utilizado como controle o inibidor MK2206. As estruturas 3D das proteínas em estudo foram obtidas do Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>).

Previamente ao início da simulação computacional foi realizado o desenho das estruturas químicas dos compostos no Software Marvin Sketch, ChemAxon (<https://chemaxon.com/marvin>) e em seguida foi realizada a padronização das estruturas químicas em 3D e minimização da energia dos compostos pelos métodos de mecânica molecular e pelo método semi-empírico Austin Model 1 (AM1) por meio do software Spartan 14, WaveFunction (<https://www.wavefun.com/>).

Todas as moléculas de água foram removidas da estrutura cristalina, em seguida foi criado um “*template*” entre a enzima e o ligante co-cristalizado, com

a finalidade de demarcar o sítio ativo da macromolécula, sendo prosseguido o procedimento com a inserção da molécula teste, e por fim realizada a simulação de *Docking molecular*. Para a proteína PKB como esta não apresenta ligante co-cristalizado, o sítio ativo foi identificado por meio dos resíduos pertencentes ao sítio ativo, os quais são descritos no artigo de referência disponível na plataforma PDB por meio do PDB ID 5LCJ. Para isso foram detectadas as cavidades da enzima e as coordenadas do sítio ativo foram determinadas com o auxílio de *Molecular Pockets Predictions*, sendo a plataforma Bit Net - Skoltech I, 2022 (<https://sites.skoltech.ru/immolecule/tools/bitnet>) a web tool utilizada neste trabalho.

O desvio quadrático médio *Root Mean Square Deviation* (RMSD) foi calculado a partir das poses, indicando o grau de confiabilidade do ajuste. O RMSD fornece o modo de conexão próximo à estrutura experimental e é considerado bem-sucedido se o valor for inferior a 2,0 Å.

6.3.6.1 Molegro Virtual Docker (MVD) 6.0

O *software* Molegro Virtual Docker v.6.0.1 (MVD) (MOLEXUS, 2019) foi utilizado com os parâmetros predefinidos no mesmo software. O ligante complexado foi usado para definir o sítio ativo. Em seguida, os compostos foram inseridos, para analisar a estabilidade do sistema através das interações identificadas com o sítio ativo das enzimas, tomando como referência o valor energético do MolDock Score (De Azevedo *et al.*, 2010; Thøgersen e Christensen, 2006). O algoritmo MolDock SE (Simplex Evolution) foi usado com os seguintes parâmetros: Um total de 10 execuções com um máximo de 1.500 interações usando uma população de 50 indivíduos, 2.000 etapas de minimização para cada resíduo flexível e 2.000 etapas de minimização global por simulação. A função de pontuação MolDock Score (GRID) foi usada para calcular os valores de energia de encaixe. Um GRID foi fixado em 0,3 Å e a esfera de busca foi fixada em 15 Å de raio. Para a análise da energia do ligante, foram avaliadas as interações eletrostáticas internas, ligações de hidrogênio internas e torções sp²-sp² (De Azevedo *et al.*, 2010; Thøgersen e Christensen, 2006).

6.3.6.2 Docking consensus

Uma análise de consenso usando duas funções de pontuação diferentes foi usada para diminuir o número de falsos positivos. Os resultados da afinidade dos compostos estudados pelas funções MolDock Score, Rerank Score e PLANTS Score foram considerados no cálculo do consenso. Inicialmente, para cada uma das funções de pontuação em estudo, foi calculado o valor de (p), que equivale a dividir a pontuação obtida por cada um dos compostos pelo composto que obteve a menor energia, conforme a Equação 01:

Equação 01:

$$\text{Prob} = (E \text{ Lig}) / (E_{\text{Min Lig}})$$

Onde E Lig é a energia obtida por cada ligante na simulação de docking desenvolvida. Já o parâmetro EMin Lig corresponde à menor energia obtida entre os ligantes em estudo. A segunda análise de consenso refere-se ao cálculo da média geral obtida em todos os biomarcadores em estudo. Desta forma, os valores de probabilidade de cada um dos compostos em estudo são calculados como uma média geral da probabilidade obtida por este em cada um dos biomarcadores. Após a obtenção dos valores de probabilidade obtidos para os compostos em cada uma das funções de pontuação em estudo, procedeu-se ao cálculo da probabilidade total (P), que corresponde à soma dos valores de probabilidade obtidos para cada uma das funções de pontuação em estudo, dividida pelo número total de observações, conforme a Equação 02:

$$\text{Equação 02: } P \text{ Total} = (P \text{ MolDock Score} + P \text{ Rerank Score}) / n$$

6.10 Análises Estatísticas

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados por Análise de Variância (ANOVA One-way), seguidos pelo teste de Tukey. Os dados serão considerados significantes quando $p < 0,05$. O programa estatístico utilizado para a análise dos dados e para a produção dos gráficos foi GraphPad Prism, versão 8 (GraphPad, EUA).

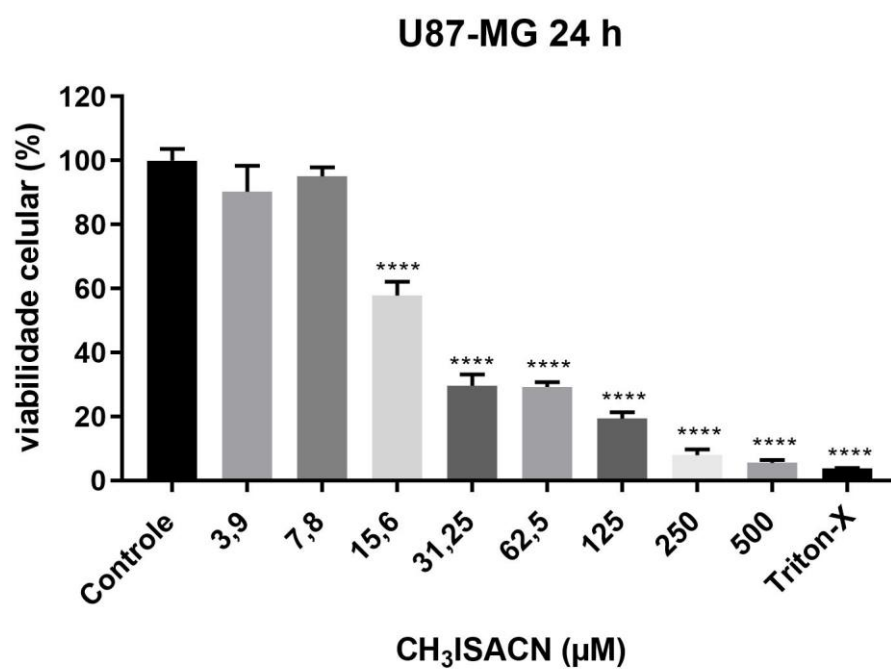
7. Resultados e discussões

7.1 Citotoxicidade de CH₃ISACN em linhagens de células tumorais humanas e não tumoral embrionária humana

No esnaio do MTT, a CH₃ISACN induziu citotoxicidade na linhagem tumoral de glioma grau III (U373-MG), CI_{50} : $24,26 \pm 1,15 \mu\text{M/mL}$, enquanto a linhagem tumoral de glioma grau IV (U87-MG) também se mostrou sensível à substância com CI_{50} : $24,23 \pm 1,18 \mu\text{M/mL}$. Em relação a célula não tumoral renal embrionária humana (HEK-293), a CH₃ISACN apresentou citotoxicidade de CI_{50} : $79,58 \pm 1,34 \mu\text{M/mL}$.

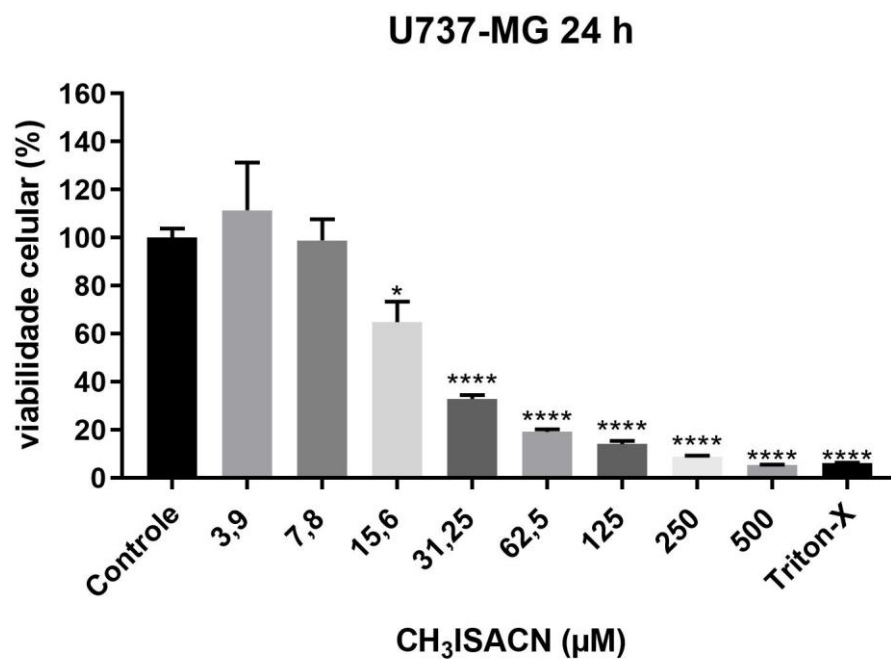
Desse modo, a partir dos valores de CI_{50} obtidos, o Índice de Seletividade (IS) de CH₃ISACN foi calculado, utilizando a linhagem não tumoral HEK-293, a CH₃ISACN apresentou um IS de 3,3 na linhagem U87-MG e 3,2 na linhagem tumoral U373-MG, conforme mostrado na tabela . Diante desses resultados obtidos, a linhagem tumoral de glioma grau IV (U87-MG) foi escolhida para dar seguimento aos experimentos.

Figura 4: Citotoxicidade de CH₃ISACN em linhagens tumorais humanas U87 e U373-MG, linhagem não tumoral embrionária humana HEK-293, após 24 horas de tratamento.



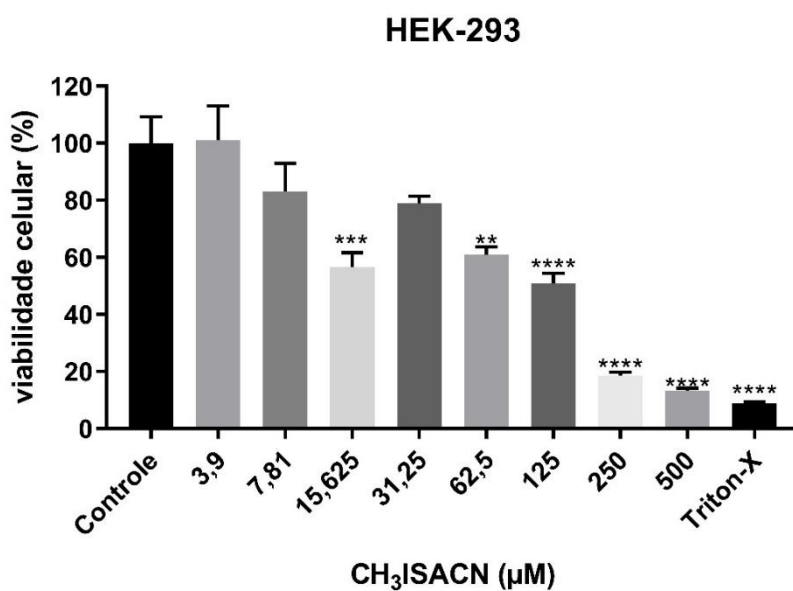
* indica diferenças significativas entre as condições; $p < 0,05$.

Viabilidade celular (%) após 24 h de tratamento com CH₃ISACN. Os dados estão expressos como média \pm EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata analisados por Análise de Variância (ANOVA) one-way seguido do teste de Tukey.



* indica diferenças significativas entre as condições; $p < 0,05$.

Viabilidade celular (%) após 24 h de tratamento com CH₃ISACN. Os dados estão expressos como média \pm EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata analisados por Análise de Variância (ANOVA) one-way seguido do teste de Tukey.



* indica diferenças significativas entre as condições; $p < 0,05$.

Viabilidade celular (%) após 24 h de tratamento com CH₃ISACN. Os dados estão expressos como média \pm EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata analisados por

Análise de Variância (ANOVA) one-way seguido do teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pelo autor

Algumas isatinas possuem atividades como: antitumoral (Ferraz et al. 2021); antioxidante (Muglu; Yakan; Bakir, 2020); antimalárica (Melo, 2020). A substância CH₃ISACN, é um derivado sintético da isatina, que é produzido em um tempo médio de 50 minutos, com um rendimento de 95%. Ela possui uma baixa toxicidade, sendo grau V de toxicidade pelo Sistema Globalmente Harmonizado de Substâncias Químicas e Misturas (GHS) da OECD 423 (Melo, 2020).

No presente trabalho, a CH₃ISACN demonstrou citotóxicidade frente as linhagens de glioma humano U87 e U373-MG, com as CI₅₀ de 24,23 ± 1,18 µM/mL e 24,26 ± 1,15 µM/mL respectivamente. Alguns derivados da isatina, apresentaram citotoxicidade semelhante em linhagens tumorais como MCF-7, com IC₅₀: 1.04-97,65 µM, o que corrobora com este trabalho (Ding; Zhou; Zeng, 2020).

Além disso, derivados sintéticos da isatina, advindos da reação de adição Baylis-Hillman, mesma reação de síntese de CH₃ISACN, foram testados em linhagens de câncer de cólon humano (Colo 205), câncer de ovário de hamster (CHO) e glioma de rato (C6), as CI₅₀ foram definidas a partir de 4 concentrações, e na linhagem C6 ficou por volta de 100 µM (Kumar *et al.*, 2014).

Zhang e colaboradores (2019), verificou a atividade antiproliferativa de alguns derivados da isatina frente a linhagens tumorais de: câncer de pulmão de células não pequenas (H460) com CI₅₀ de 28,40 ± 14,40 µM; câncer de fígado (HepG2) com CI₅₀ 0,42±0,08 µM; e a linhagem HT-29 (Câncer de cólon humano) com uma CI₅₀ de 34,37±6,30 µM.

Mesmo sendo a forma mais comum de tratamento de câncer, a quimioterapia antineoplásica ainda não é seletiva, podendo atuar tanto em células tumorais, quanto em células saudáveis (Blagosklonny, 2023). Portanto é de suma importância a descoberta de novas drogas seletivas para células tumorais, a fim de evitar os vários efeitos adversos das terapias atuais, fazendo com que muitas vezes ocorra a desistência do paciente ao tratamento (Wei *et al.*, 2021).

Sendo assim, a avaliação da citotoxicidade de CH₃ISACN em células embrionárias humanas (HEK-293), permitiu calcular o índice de seletividade da

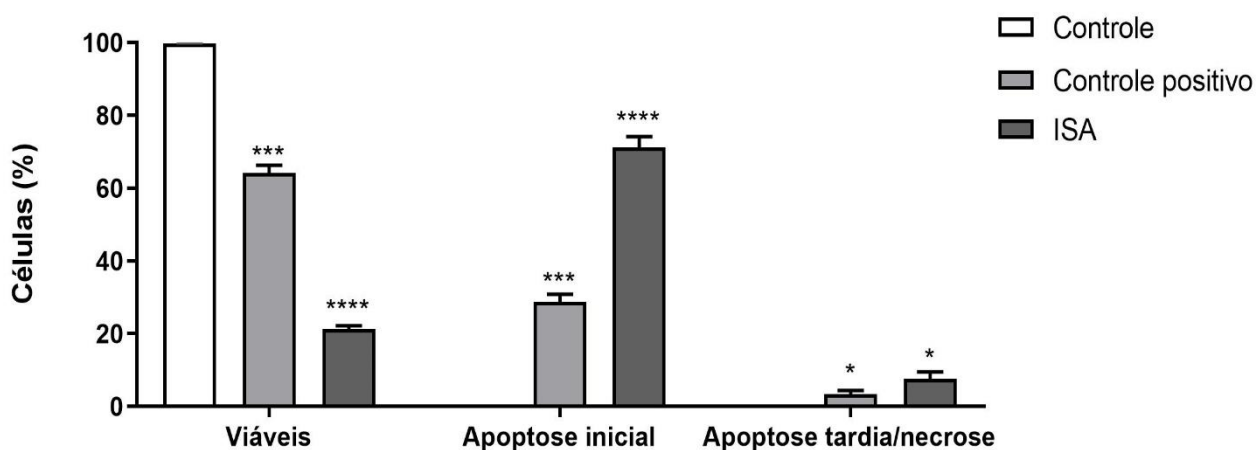
substância, mostrando que a CH₃ISACN possui uma atividade 3 vezes mais seletiva para as linhagens de glioma que para a linhagem não tumoral.

A partir desses resultados e com as linhagens celulares utilizadas, pode-se dizer que a CH₃ISACN, possui uma significativa atividade antitumoral *in vitro* e pouco mais seletivo para a linhagem U87-MG (glioma grau IV). Esse tipo de tumor, glioblastoma, é o mais agressivo entre os tipos de gliomas já descritos, tendo um alto grau de invasão e alta resistência às terapias atuais (Venkataramani *et al.*, 2022). Por esse motivo, para esse trabalho, a linhagem celular escolhida para dar segmento aos experimentos, foi a linhagem U87-MG.

7.2 Morfologia das células U87-MG por microscopia confocal após coloração com laranja de acridina e iodeto de propídeo

A figura 5 mostra o percentual de células U87-MG marcadas com IP e/ou laranja de acridina (LA), após 24 h de tratamento com a CH₃ISACN (24 µM/mL) ou demecolcine (0.05 µM). O tratamento com CH₃ISACN induziu aumento significativo do percentual de células com características típicas de apoptose inicial (71,21%, $p < 0,05$) e tardia/necrose (7,5%, $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle (0%; e 0%, respectivamente). Quanto ao tratamento com demecolcine, observou-se um percentual de células em apoptose inicial (28,82%, $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle.

Figura 5: Indução da apoptose pela CH₃ISACN ou demecolcine analisada por coloração de laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP) em células de glioblastoma humano U87-MG após 24 h de tratamento.

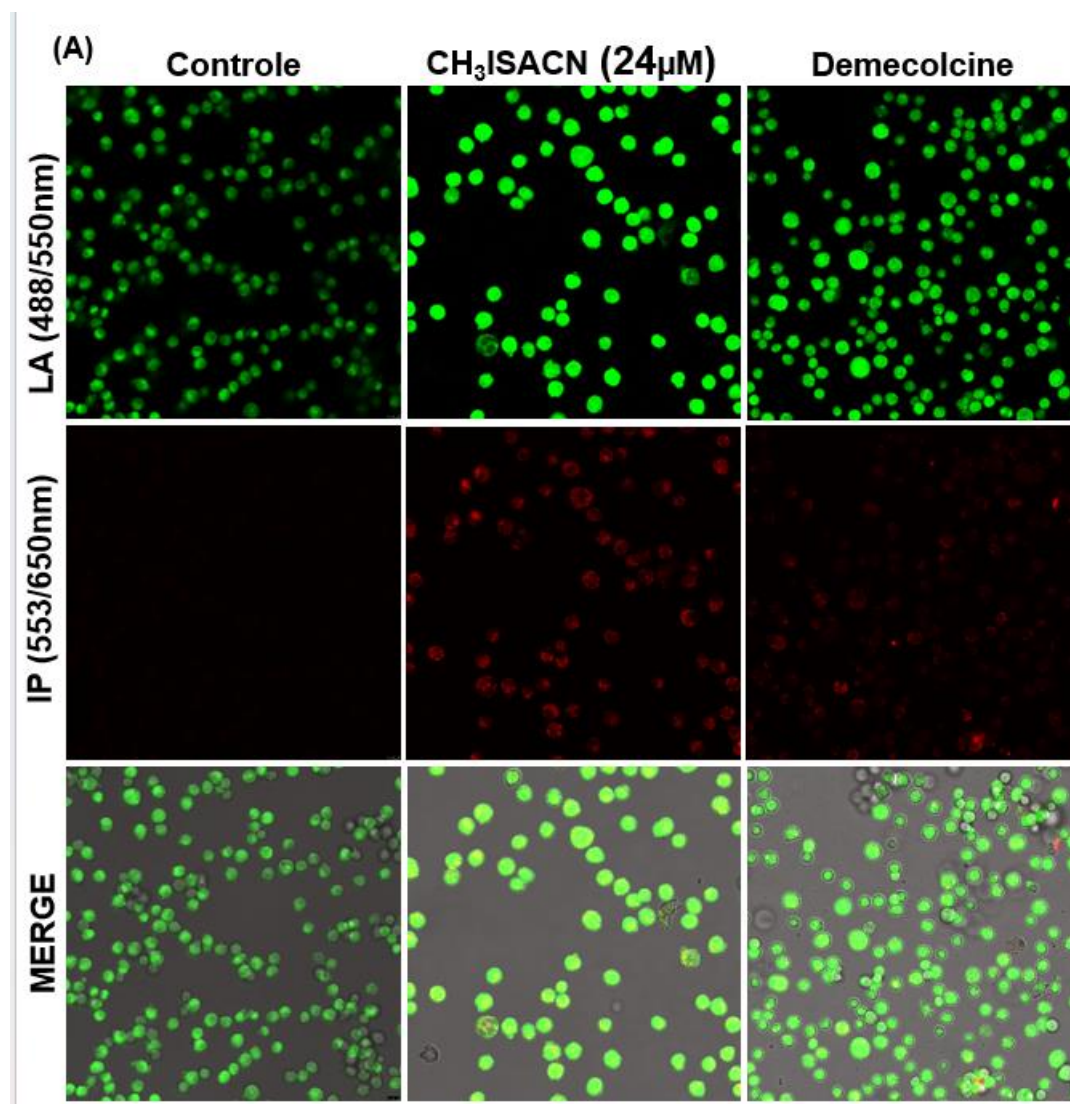


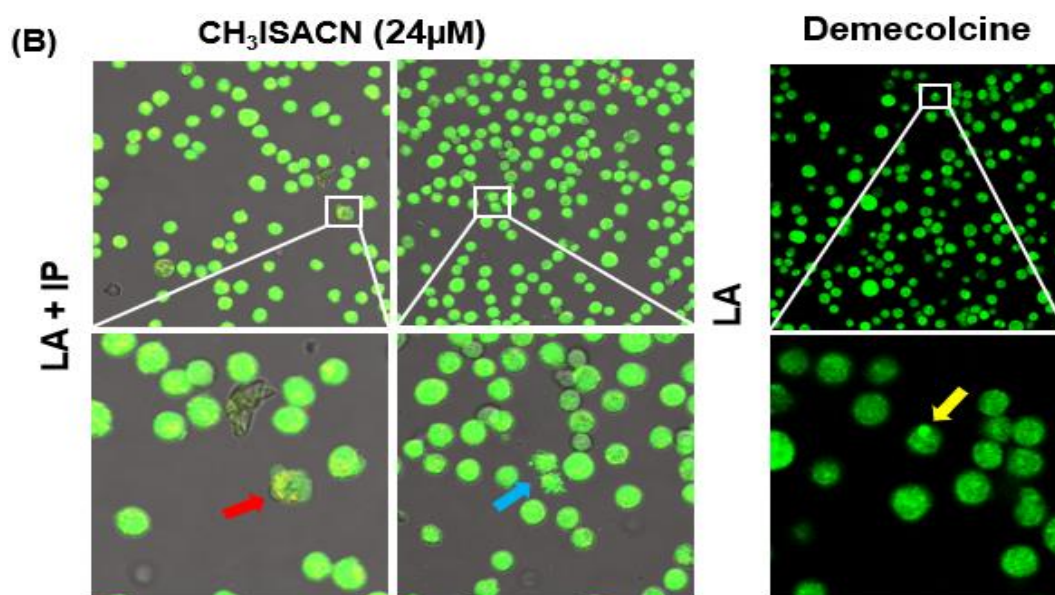
Percentual de células coradas com laranja de acridina (LA) e/ou iodeto de propídeo (IP). Os dados estão expressos como média \pm EPM de dois experimentos independentes realizados em duplicata analisados por Análise de Variância (ANOVA) one-way seguido do teste de Tukey. * indica diferenças significativas entre as condições; $p < 0,05$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A figura 6 apresenta imagens representativas das células dos diferentes grupos experimentais.

Figura 6: Indução da apoptoses pela CH₃ISACN ou demecolcine analisada por coloração de laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP) em células de glioblastoma humano U87-MG após 24 h de tratamento.





Legenda: Imagens representativas ampliadas de células U87-MG após 24 horas de incubação com CH₃ISACN (24 μM/mL) ou demecolcine (0,05 μM) como controle positivo, marcadas com laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP). A seta amarela indica condensação da cromatina; seta azul indica “blebs de membrana” e seta vermelha indica fragmentação do DNA.

A morte por apoptose de células tumorais, tem sido o alvo de pesquisadores durante anos para o desenvolvimento de novos medicamentos contra o câncer (Carneiro; El-Deiry, 2020). Esse tipo de morte celular, é essencial para a manutenção da homeostase, além de promover a remoção de células danificadas (Sorice, 2022).

No processo de apoptose, a célula passa por alterações, como a degradação de proteínas, *blebbing* de membrana e clivagem do DNA (Carneiro; El-Deiry, 2020). As células cancerígenas possuem a capacidade de evitar a apoptose, e consequentemente manter a sua proliferação, através da regulação positiva de proteínas anti-apoptóticas e regulação negativa ou inativação das proteínas pró-apoptóticas (Lopez *et al.*, 2022). Por sua importância, essa via é de grande interesse para a produção de novas drogas anti-câncer e seu estudo requer a utilização de técnicas como a microscopia (Mratínez-Escardó *et al.*, 2021).

Para verificar o possível mecanismo de morte celular, as células U87-MG tratadas com CH₃ISACN foram submetidas à microscopia confocal. A microscopia confocal, utiliza feixes de luz de modo que rejeitam as luzes de fora do foco do detector, fazendo com que partes coradas sejam visualizadas de

forma nítida (Elliott, 2020).

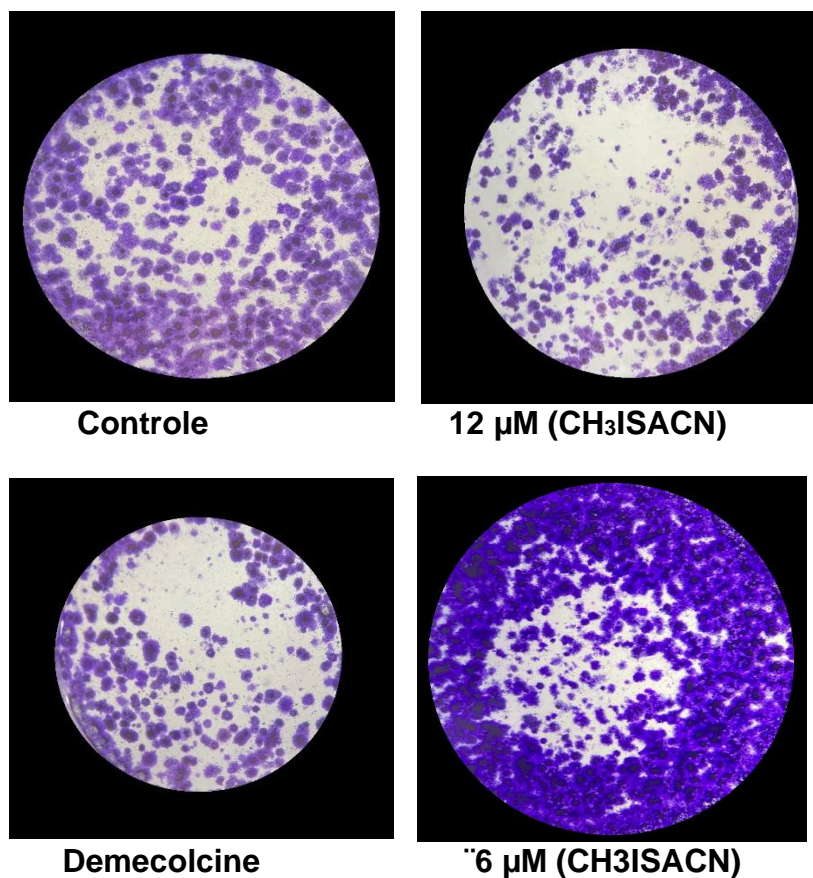
Zhang e colaboradores (2019), realizaram um estudo utilizando 5-acetamido-1- (metoxibenzil) isatina, utilizando linhagens celulares de leucemia humana (K562). Nesse trabalho, foi avaliado o mecanismo de morte celular dessa linhagem e foi verificado que esse derivado da isatina foi capaz de induzir a apoptose de 51,1% das células tratadas, quando comparado ao grupo controle (5,1%).

Em um estudo adicional, utilizando compostos derivados da isatina, foi observado que essas substâncias foram capazes de induzir a apoptose em células tumorais de adenocarcinoma colorretal (HT-29) e células metastáticas (SW620). Essas células foram submetidas a tratamento com um composto derivado da isatina, denominado 5a, em concentrações de 20 $\mu\text{M/mL}$, e constatou-se que o mecanismo de morte celular foi por apoptose, verificado por citometria de fluxo. Além disso, altas expressões de proteínas pró-apoptóticas nessas células foram verificadas.

7.3 Ensaio de formação de colônias

No ensaio de formação de colônias (clonogênico), foram utilizados 4 grupos: controle (apenas o meio de cultura); metade da CI_{50} (12 μM); um quarto da CI_{50} (6 μM) e como controle positivo foi utilizado o demecolcine (0.05 μM). A CH_3ISACN foi capaz de diminuir a formação de novas colônias de células, na concentração de 12 μM e no grupo demecolcine, ambos comparados com o grupo controle. Já na concentração de 6 μM , não houve diferença significativa quando comparada ao grupo controle. Como pode ser visto na figura 7.

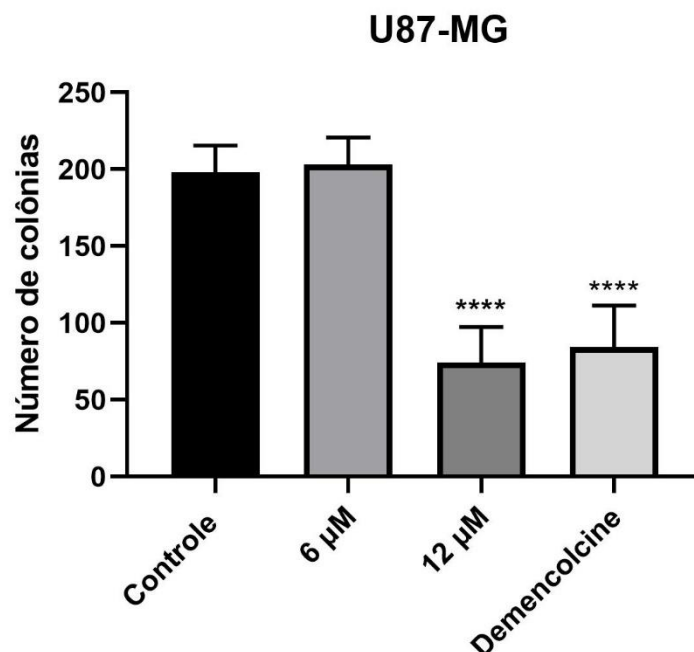
Figura 6: Fotomicrografias representando a influência dos tratamentos com a CH3ISACN na clonogenicidade das células U87-MG, em 7 dias.



Legenda: As imagens representam os diferentes grupos de tratamento utilizados no ensaio de clonogenicidade das células U87-MG. O grupo controle recebeu apenas o meio de cultura, enquanto que os grupos tratados com a CH3ISACN recebem as concentrações de 6 e 12 μM. No controle positivo foi utilizado o antitumoral demecolcine na concentração de 0.05 μM.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7: Número de colônias formadas após 7 dias de tratamento com CH₃ISACN.



* indica diferenças significativas entre as condições; $p < 0,05$.

Número de colônias após 7 do tratamento com CH₃ISACN. Os dados estão expressos como média \pm EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata analisados por Análise de Variância (ANOVA) one-way seguido do teste de Tukey.

A clonogenicidade está ligada à capacidade das células de formar clones idênticos ou colônias de células (Brix *et al.*, 2021). Os ensaios de clonogenicidade, são usados para investigar a atividade antitumoral de uma substância, visto que são experimentos que medem a capacidade de proliferação celular, além de sua sobrevivência (Esquer *et al.*, 2020).

A habilidade de formar novas colônias é de suma importância para a manutenção de células tumorais (Esquer *et al.*, 2020). Através dela, essas células conseguem crescer de forma descontrolada, além de facilitar a migração para outros tecidos (Matsui *et al.*, 2019). A disseminação de células tumorais para tecidos diferentes de sua origem, é conhecida como metástase, e representa a principal causa de morte em pessoas com câncer (Suhail *et al.*, 2019).

Abo-Ashour e colaboradores (2019) verificaram a capacidade de um

derivado da isatina (n-substituído com um grupo benzila) de inibir a formação de colônias. A linhagem utilizada foi a HCT-116 (câncer cólon-retal), e foi constatado que o derivado da isatina reduziu o número de colônias formadas nos poços tratados nas concentrações de 5 e 10 μM .

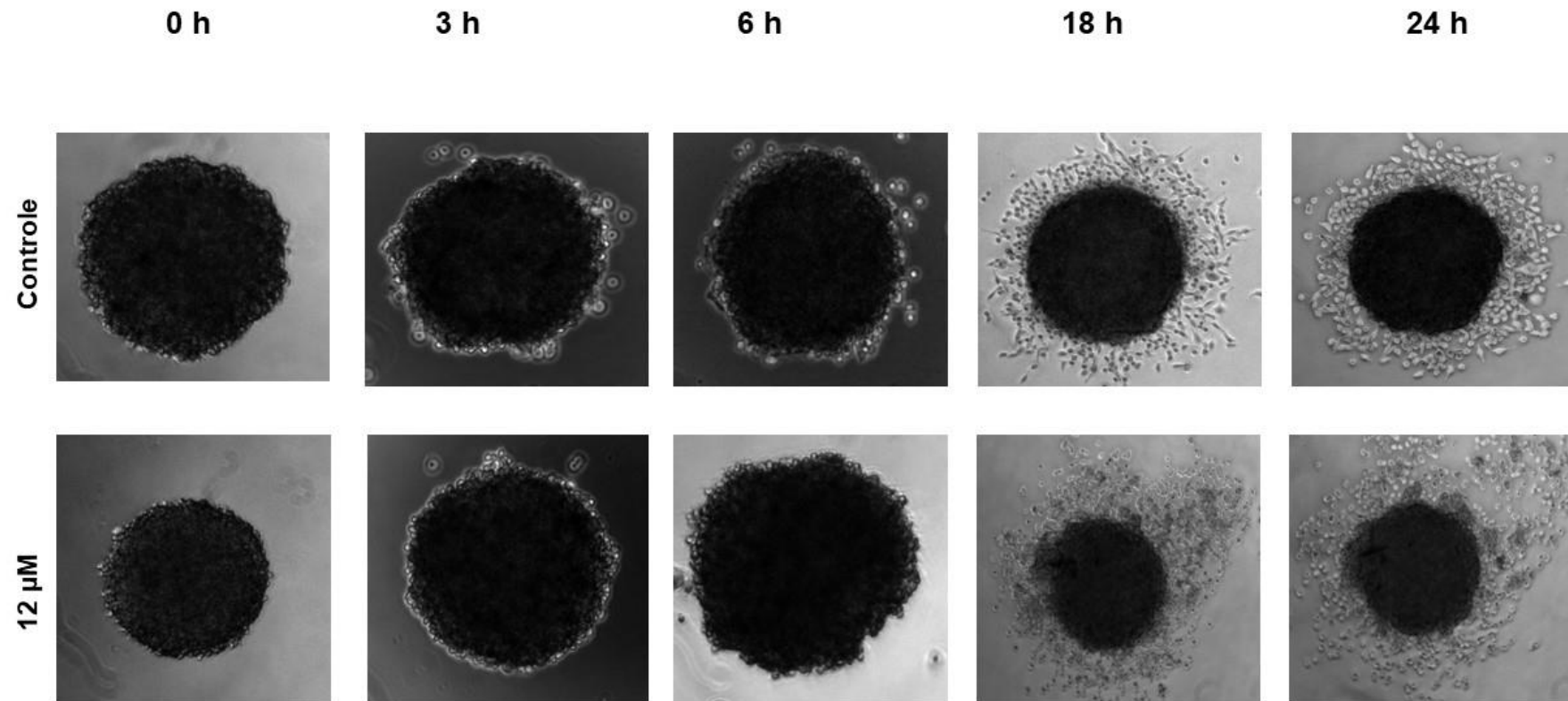
Um outro estudo utilizando células de adenocarcinoma de cólon (HT-29) e células de melanoma humano (A375), mostrou que um derivado da isatina com um grupo metoxi foi capaz de diminuir a formação de novas colônias em 40 e 20%, respectivamente (Tumosienê *et al.* 2021). A N-metil-isatina (CH_3ISACN) foi capaz de reduzir significativamente a formação de novas colônias da linhagem U87-MG, na concentração de 12 μM (medade da CI_{50}), corroborando com os resultados de outros estudos utilizando derivados sintéticos da isatina.

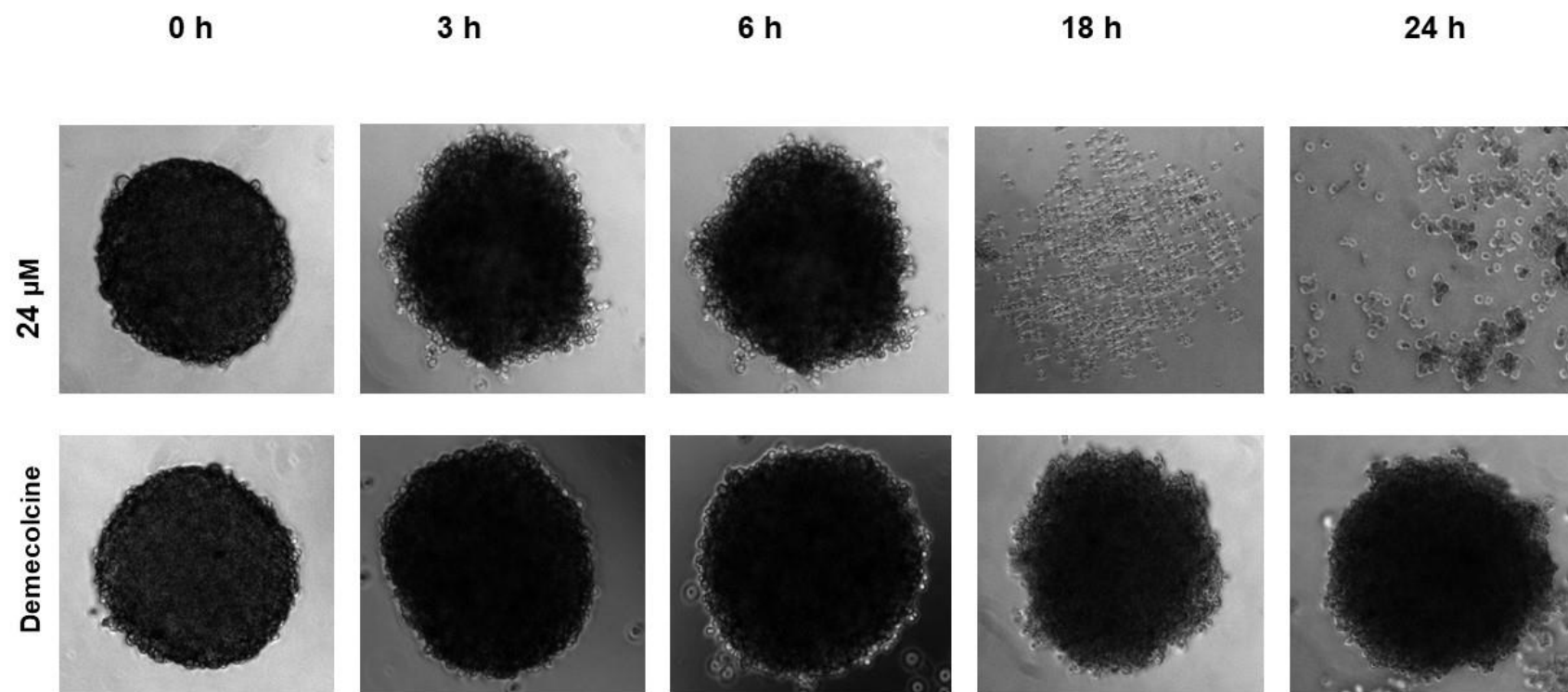
7.4 Ensaio dos esferóides (Cultura 3D)

Para esse ensaio, foram utilizados 4 grupos: o grupo controle (apenas meio de cultura; dois grupos tratados com a CH_3ISACN nas concentrações de 12 e 24 μM (correspondendo a medade da CI_{50} e a própria CI_{50}) e um grupo tratado com demecolcine (droga antitumoral) na concentração de 0.05 μM . Todos os experimentos foram feitos em triplicata, com um N experimental de 3.

A substância CH_3ISACN , na concentração de 24 μM , foi capaz de desintegrar completamente os esferóides a partir do tempo de 18 horas de tratamento, reduzindo a área do esferóide a zero, diferença significativa quando comparada ao grupo controle. Os resultados dos grupos tratados com demecolcine e 12 μM (CH_3ISACN), não foram significativos, quando comparados ao grupo controle. E podem ser observados na figura abaixo:

Figura 8: Efeito de CH3ISACN e demecolcine nos esferóides das células U87-MG nos tempos de 0, 3, 6, 18 e 24 horas.

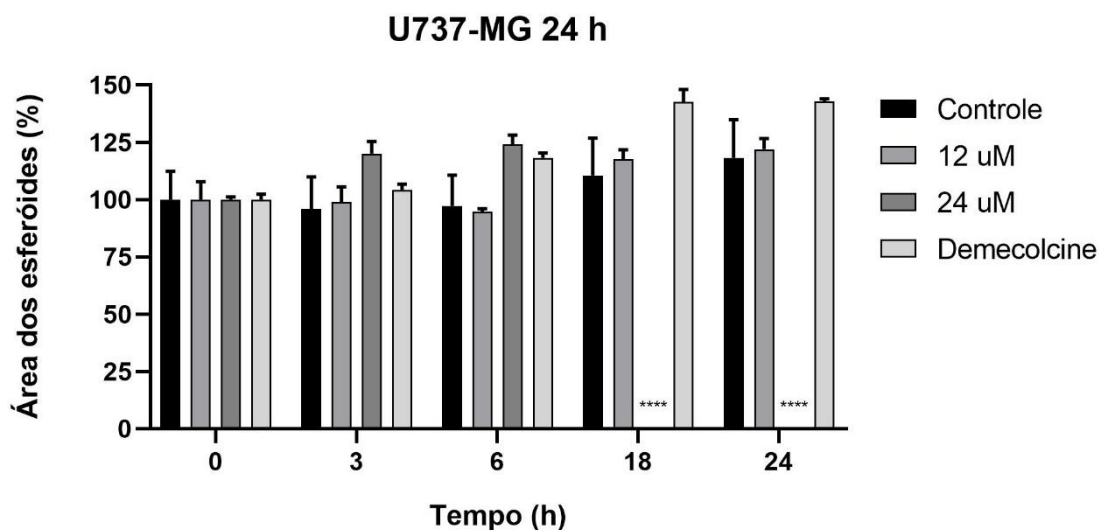




Legenda: Imagens dos esferóides formados por U87-MG, tratadas com concentrações de CH₃ISACN durante 24 horas.

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 9: Efeito de CH₃ISACN e demecolcine nos esferóides das células U87-MG nos tempos de 0, 3, 6, 18 e 24 horas.



Área dos esferóides após 24 h de tratamento com CH₃ISACN. Os dados estão expressos como média ± EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata analisados por Análise de Variância (ANOVA) two-way seguido do teste de Tukey.

Os modelos de cultura celular 2D são amplamente desenvolvidos e trabalhados nas primeiras etapas para testes de novas drogas, etapas necessárias para a descoberta de novos medicamentos antitumorais (Jensen; Teng, 2020). Essa metodologia vem sendo utilizada para o cultivo celular desde o começo de 1900 (Ferreira; Gaspar; Mano, 2018). Contudo, apresenta algumas limitações devido a não conseguir mimetizar o que ocorre no microambiente tumoral (Costa *et al.*, 2016).

Nesse sentido, a necessidade de conseguir reproduzir um ambiente mais semelhante ao encontrado em humanos, fez com que novos modelos de cultura celular fossem estudados e desenvolvidos (Yuki *et al.*, 2020). A fim de solucionar os problemas e limitações do modelo 2D, a cultura celular 3D veio com o objetivo de melhorar a união entre as células tumorais, proporcionando um melhor desempenho de suas funções, a partir de sua união, conseguindo mimetizar o ambiente microtumoral e facilitando os seus processos de adesão e proliferação (Habanjar *et al.*, 2021).

O derivado sintético N-metil-isatina (CH₃ISACN), foi capaz de reduzir significativamente o tamanho dos esferóides na concentração de 24 µM e no

tempo de 24 horas. Nas bases de dados pesquisadas, até o momento não foram encontrados nenhum estudo que envolva as isatinas propriamente ditas, com atividades em esferóides.

Contudo, um estudo utilizando o grupo 2-oxindol, presente nas isatinas, como grupo substituinte de hidrazonas, mostrou que nas linhagens tumorais de melanoma (A375) e em células de câncer de cólon (HT-29), esses derivados foram capaz de reduzir significativamente o tamanho dos esferóides quando comparados com o grupo controle num tempo total de tratamento de 14 dias (Tumosienė *et al.* 2021).

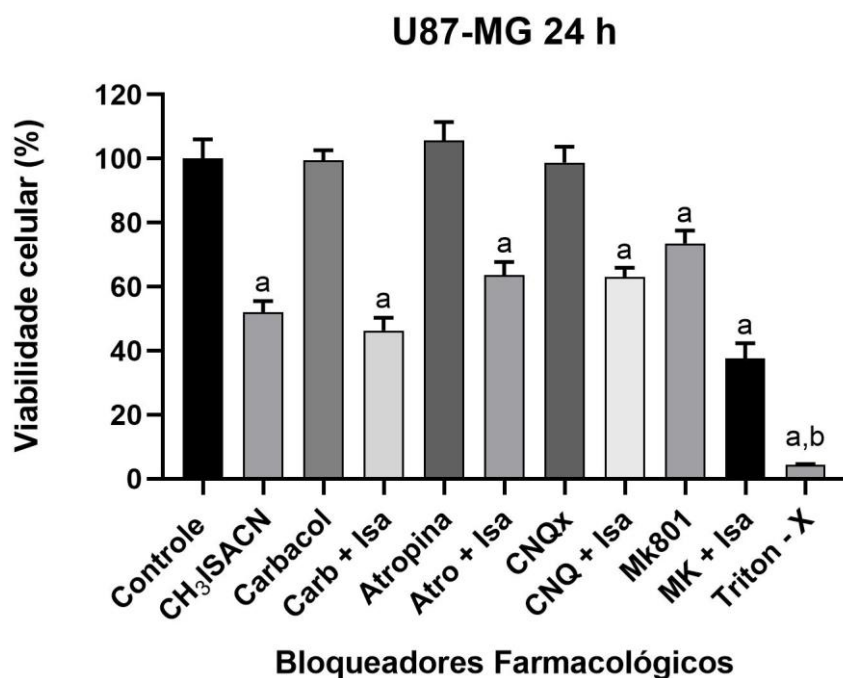
Šermuksnyte e colaboradores (2022) estudaram os efeitos antitumorais de hidrazonas contendo o núcleo tiazol, os resultados demonstram que essas substâncias foram capazes de reduzir o tamanho dos esferóides produzidos a partir das linhagens de câncer de mama (MDA) e câncer pancreático (Panc-1). No tempo de 8 dias, foi verificado que as hidrazonas na concentração de 10 μM , diminuíram o tamanho dos esferóides de forma significativa quando comparado com o grupo controle.

7.4 Ensaio com os bloqueadores farmacológicos

Nesse ensaio utilizando bloqueadores farmacológicos, foram utilizados os seguintes bloqueadores: carbacol (agente parassimpaticomimético); atropina (bloqueador muscarínico); CNQx (antagonista competitivo do receptor AMPA/Cainato) e MK801 (bloqueador do receptor NMDA). A substância CH_3ISACN também foi usada na concentração de 24 μM (CI_{50}).

Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos tratados com CH_3ISACN e bloqueadores, quando comparados com o grupo tratado apenas com o derivado da isatina. Esses resultados inferem que as vias de sinalização tanto muscarínica quanto glutamatérgica, não estão envolvidas na morte das células tumorais U87-MG.

Figura 10: O gráfico representa a viabilidade celular (%) das células U87-MG nos grupos tratados com a C150 de CH3ISACN e com os bloqueadores farmacológicos no tempo de 24 h.



Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as condições; $p < 0,05$.

Viabilidade celular (%) após 24 h de tratamento com CH₃ISACN e bloqueadores farmacológicos. Os dados estão expressos como média \pm EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata analisados por Análise de Variância (ANOVA) one-way seguido do teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A acetilcolina é o principal neurotransmissor do sistema nervoso central e periférico, contudo já se sabe que seu papel não está associado apenas ao sistema nervoso, mas também à sua participação em processos apoptóticos em células tumorais (Calaf *et al.*, 2022). Os receptores desse neurotransmissor, conhecidos como receptores muscarínicos, são acoplados à proteína G (GPCRs).

Nos tumores do tipo glioblastoma, são expressas diferentes subclasses desses receptores e estão associados à sobrevivência dessas células (Cristofaro *et al.*, 2020). Vários mecanismos bioquímicos estão ligados à sobrevivência de tumores, entre eles, a ativação dos receptores muscarínicos. Contudo, ainda não há descrito o papel da ativação dessa via de sinalização para a promoção do

tumor, deixando claro a importância da pesquisa nessa área para elucidar esse mecanismo (Terpinskaya *et al.*, 2021).

Em contrapartida, o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central, ele é responsável pela transmissão sináptica e plasticidade neuronal. Entretanto, em processos de desordem, que promovem sua excessiva liberação, esse neurotransmissor pode levar as células à morte (Czapski; Strosznajder, 2021). Nos gliomas, foi verificado que a atividade neuronal é capaz de impulsionar tanto o desenvolvimento do tumor, quanto a migração de células tumorais (Taylor *et al.*, 2023).

Estudos já revelaram que em gliomas ocorre uma liberação excessiva de glutamato, a qual promove a sobrevivência das células tumorais, essa descoberta é de grande importância, pois isso direciona a pesquisa na busca por novos tratamentos desse tipo de tumor (Corsi; Mescola; Alessandrini, 2019).

7.5 Docking molecular

O composto em estudo foi submetido à simulações de *Docking Molecular* nas seguintes proteínas: ERK ½ (PDB: 5LCJ), JNK-1 (PDB: 2G01) e PKB Domínio de Quinase (PDB: 1GZN). Os resultados foram gerados usando as funções de pontuação MolDock Score e Rerank Score. Valores mais negativos indicaram uma maior afinidade aos alvos em estudo, em seguida foi realizada uma normalização que consistiu na padronização dos resultados dos compostos em função dos valores de energia de ligação do composto de menor energia gerando um valor de probabilidade (p).

Antes da realização da simulação de docking molecular, foi prosseguida a validação dos alvos em estudo por meio do re-docking entre o ligante e a proteína co-cristalizada. O valor do RMSD (Desvio médio quadrático do ligante, do inglês “Root Mean Square Deviation”), indica a distância média quadrática entre os átomos do ligante na estrutura cristalina e os átomos correspondentes na pose ancorada. A observação do valor (melhor pontuação) de RMSD é uma boa forma para avaliação da capacidade de um método em encontrar o modo de ligação de um ligante em um conjunto de posições. Para que um docking seja considerado confiável, é necessário que o valor de RMSD seja igual ou inferior

a 2.0 Å. O valor de RMSD correspondeu a 0.6559 para o ligante co-cristalizado pirimidina carbamato da Proteína ERK 1/2 (PDB: 5LCJ) e a 0.1605 para o ligante Pirazoloquinolonas da proteína JNK1 (PDB: 2G01), indicando que as poses geradas posicionaram o ligante corretamente no local ativo e que o programa forneceu valores considerados satisfatórios para a validação do docking.

Para a enzima PKB (PDB: 1GZN), como esta não apresenta ligante co-cristalizado o sítio ativo foi determinado por cavidade, sendo as coordenadas geradas pela plataforma Bit Net Skoltech I, 2022 (<https://sites.skoltech.ru/ molecule/tools/bitenet>), as quais corresponderam a X: -22.95, Y: 93.64 e Z: -66.50. A Tabela 01 demonstra os valores de energia de ligação e de probabilidade de atividade, respectivamente do composto teste para as proteínas em estudo:

Tabela 11: Valores de energia de ligação (kJ.mol⁻¹) e de probabilidade de atividade do composto em estudo nas enzimas relacionadas a atividade antitumoral de acordo com as funções de pontuação MolDock Score e Rerank Score.

Proteína ERK 1/2 (PDB: 5LCJ)					
Composto	MolDock Score	(p)	Rerank Score	(p)	P Total
Composto Teste	-68.5735	0.551655	-56.4325	1	0.775828
Ligante PDB	-124.305	1	-27.3029	0.483815	0.741908
JNK1 (PDB: 2G01)					
Composto	MolDock Score	(p)	Rerank Score	(p)	P Total
Composto Teste	-62.466	0.915302	-43.7617	0.74787	0.831586
Ligante PDB	-68.2463	1	-58.5151	1	1
PKB (PDB: 1GZN)					
Composto	MolDock Score	(p)	Rerank Score	(p)	P Total
Composto Teste	-105.941	0.720202	-71.2755	0.919022	0.819612
Controle positivo	-147.099	1	-77.5558	1	1

Legenda: Em negrito encontra-se destacado o composto de maior afinidade.

De acordo com os resultados demonstrados na Tabela 2, pode-se observar que o composto teste apresentou valores de energia de ligação negativos em todas as proteínas em estudo, indicando interação. Além disso, é importante mencionar que nos dois alvos em estudo o composto teste apresentou valores de probabilidade (p) superiores aos ligantes PDB, indicando dessa forma uma maior afinidade.

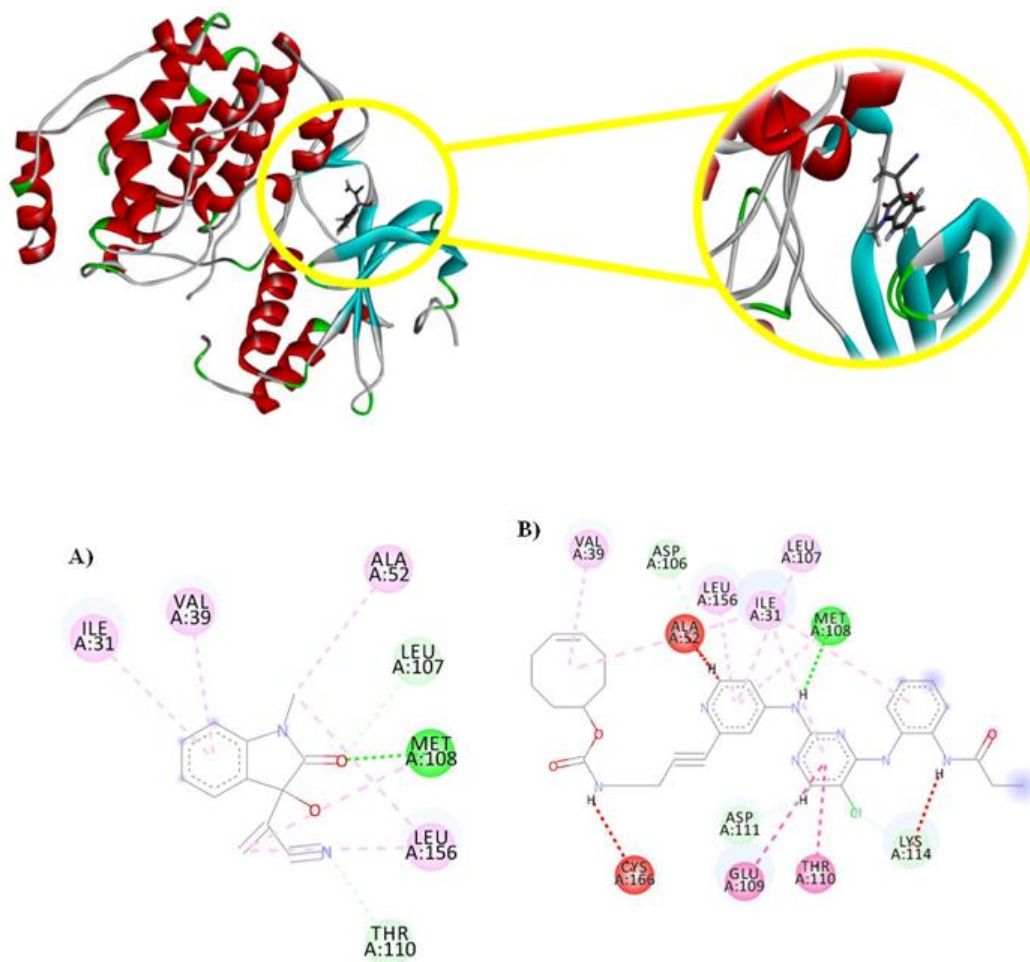
Para a enzima ERK 1/2 (PDB: 5LCJ) foi observado que o composto em estudo apresentou valores de probabilidade correspondentes a 0.775, enquanto o ligante PDB apresentou valores de probabilidade correspondentes a 0.741, demonstrando dessa forma uma maior afinidade. Os demais alvos em estudo a maior afinidade foi demonstrada pelos controles. A Figura 12 demonstra a interação ocorrida entre o composto teste, o ligante PDB e a proteína ERK 1/2 (PDB: 5LCJ).

De acordo com a Figura 12 observa-se que as interações estabelecidas pelo composto testem com a proteína ERK 1/2 (PDB: 5LCJ) são do tipo interações hidrofóbicas (linhas tracejadas em rosa) e interações do tipo ligações de hidrogênio (linhas tracejadas em verde). As interações hidrofóbicas foram as mais prevalentes sendo observadas principalmente nos grupos cíclicos da estrutura química do composto, com também nos grupos metila (CH₃) da estrutura química, as interações observadas foram do tipo alkyl e Pi-alkyl e foram estabelecidas pelos resíduos Ile 31 (1 interação), Val 39 (1 interação), Ala52 (1 interação), Leu 156 (2 interações) e Met 108 (1 interação).

Com relação as interações do tipo ligação de hidrogênio (linha tracejada em verde estas foram observadas nos grupos carbonila por meio dos átomos de oxigênio (O) e nos grupos nitrilas por meio dos átomos de nitrogênio (N), os resíduos observados foram Thr 110 (1 interação), Met 108 (1 interação) e Leu 107 (1 interação).

Foram observados resíduos semelhantes entre o composto teste e o ligante PDB que corresponderam ao resíduo Met 108 das interações do tipo ligação de hidrogênio e aos resíduos Val 39, Leu 156, Leu 107 e Met 108, sendo correspondentes as interações hidrofóbicas do tipo alkyl e Pi-alkyl, indicando que o composto teste e o ligante PDB podem compartilhar o mesmo sítio.

Figura 12: Interações 2D e 3D entre o composto teste (A), o ligante co-cristalizado (B) e a proteína ERK ½ (PDB: 5LCJ).



As ligações de hidrogênio são destacadas em verde, as interações estéricas são destacadas em vermelho e as interações hidrofóbicas são destacadas em rosa. Resíduos: Leu (Leucina), Ile (Isoleucina), Val (Valina), Met (Metionina), Thr (Treonina), Asp (Ácido aspártico), Ala (Alannina), Cys (Cisteína), Glu (Ácido glutâmico), Lys (Lisina).

O docking molecular é uma ferramenta *in silico* bastante utilizada para a pesquisa de novos medicamentos. Essa técnica possibilita a identificação de novas estruturas terapêuticas, prevendo as interações ligante-alvo, determinando a sua estrutura atividade (Pinzi; Rastelle, 2019). Por conseguinte, essa ferramenta foi utilizada para investigar a probabilidade de ligação de CH₃ISACN e os ligantes disponíveis no *Protein Data Bank* (PDP).

A vias de sinalização das MAPKs (proteína cinase ativada por mitógeno) estão envolvidas na comunicação inter e intracelular, e são essenciais para o crescimento, diferenciação e sobrevivência das células. No câncer, a via RAS/RAF/MEK/ERK, é de grande importância no que tange a pesquisa de novos medicamentos antitumorais, visto que essa via participa da sobrevivência de células tumorais e consequentemente da promoção dos tumores (Degirmenci; Wang; Hu, 2020). Essa via de sinalização está alterada em pelo menos 40% de todos os cânceres (Lee; Rauch; Kolch, 2020).

Um estudo utilizando um composto derivado da isatina (1-[(2-metilbenzimidazol-1-il) metil]-2-oxo-indolin-3-ilideno] amino] tioureia), para o tratamento de artrite causada por vírus, demonstrou que esse derivado foi capaz de regular de forma negativa todas as vias das MAPKs (De, Saikat *et al.*, 2022) mostrando a potencial atividade antitumoral dos derivados da isatina. O docking molecular foi essencial nesse trabalho para a futura elucidação do mecanismo de ação de CH₃ISACN.

8. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que o derivado sintético da isatina CH₃ISACN apresentou atividade antitumoral nas linhagens tumoral de glioblastoma humano U87-MG e nas células U373-MG, e que a citotoxicidade foi mais seletiva a essas células quando comparadas com a linhagem não tumoral embrionária humana HEK-293.

Conclui-se que CH₃ISACN apresentou efeito antitumoral por induzir apoptose nas células tumorais, além de ser capaz de diminuir a clonogenicidades dessas células, diminuindo a formação de novas colônias. A substância também foi capaz de desintegrar os esfeóides produzidos a partir de U87-MG. No estudo de docking molecular, CH₃ISACN apresentou interação favorável com o sítio de ligação Das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógeno (MAPKs) Erk 1/2.

Referências

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. 6. ed. New York: Garland Science, 2015.

BALOGH, Zubair W. et al. Overview of the 2022 WHO classification of thyroid neoplasms. **Endocrine pathology**, v. 33, n. 1, p. 27-63, 2022.

BERNARDES, Nicole Blanco et al. Article Title. **ID on line. Revista de psicologia**, v. 13, n. 44, p. 877-885, 2019.

Biochim. Biophys. Acta, p. 118688, 2020.

BLAGOSKLONNY, Mikhail V. Proteção seletiva de células normais contra quimioterapia, ao mesmo tempo que mata células cancerígenas resistentes a medicamentos. **Oncotarget**, v. 193, 2023.

BOCK, F. J.; TAIT, S. W. G. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, v. 21, n. 2, p. 85-100, 2020.

BOICE, A.; BOUCHIER-HAYES, L. Targeting apoptotic caspases in cancer. BORDEY A, SONTHEIMER H, TROUSLARD J (2000). Muscarinic activation of BK channels induces membrane oscillation in glioma cells and leads to inhibition of cell migration. *J. Membrane Biol.* 176:31-40.

BOUTRY, Justine et al. The evolution and ecology of benign tumors. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1877, n. 1, p. 188643, 2022.

BRIX, Nikko et al. Analysis of clonogenic growth in vitro. **Nature protocols**, v. 16, n. 11, p. 4963-4991, 2021.

CALAF, Gloria M. et al. Muscarinic receptors associated with cancer. **Cancers**, v. 14, n. 9, p. 2322, 2022.

CARNEIRO, B. A.; EL-DEIRY, W.S. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat. Rev.Clin. Oncol.*, v. 17, n. 7, p. 395-417, 2020.

CARNEIRO, Benedito A.; EL-DEIRY, Wafik S. Targeting apoptosis in cancer therapy. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 17, n. 7, p. 395-417, 2020.

CASANOVA, L.M; COSTA, S.S. Interações sinérgicas em produtos naturais: potencial terapêutico e desafios. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 2, p. 575-595, 2017.

CHEKE, Rameshwar S. et al. Therapeutic outcomes of isatin and its derivatives against multiple diseases: Recent developments in drug discovery. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 3, p. 272, 2022.

CHOPRA, Bhawna; DHINGRA, Ashwani Kumar. Natural products: A lead for

drug discovery and development. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 9, p. 4660-4702, 2021.

CHUNG, Soobin et al. Quantitative analysis of cell proliferation by a dye dilution assay: application to cell lines and cocultures. **Cytometry Part A**, v. 91, n. 7, p. 704-712, 2017.

CORSI, Lorenzo; MESCOLA, Andrea; ALESSANDRINI, Andrea. Glutamate receptors and glioblastoma multiforme: an old “Route” for new perspectives. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 7, p. 1796, 2019.

Costa, EC, Moreira, AF, de Melo-Diogo, D., Gaspar, VM, Carvalho, MP, e Correia, IJ (2016). Esferóides tumorais 3D: uma visão geral das ferramentas e técnicas utilizadas para sua análise. *Biotechnologia. Av.* 1427–1441. doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.11.002

CRISTOFARO, Ilaria et al. Cross interaction between M2 muscarinic receptor and Notch1/EGFR pathway in human glioblastoma cancer stem cells: effects on cell cycle progression and survival. **Cells**, v. 9, n. 3, p. 657, 2020.

CZAPSKI, Grzegorz A.; STROSZNAJDER, Joanna B. Glutamate and GABA in microglia-neuron cross-talk in Alzheimer’s disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, p. 11677, 2021.

DA COSTA PEREIRA, Viviane; DE OLIVEIRA, Patrícia Aparecida Ferreira. Definição das terapias celulares com receptores de antígenos quiméricos (CAR), receptores de células t (TCR) e linfócitos infiltrantes de tumor (TIL). Perspectivas futuras para a cura do câncer/Definition of cellular therapies with receptors of chemical antigens (CAR), t-cell receptors (TCR), and infiltrant tumor lymphocytes (TIL). Future perspectives for the cure of cancer. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 2, n. 2, p. 1105-1124, 2019.

DA ROCHA, Valmir et al. Novas perspectivas sobre a terapia do câncer: o uso indiscriminado da fosfoetanolamina sem ensaios clínicos prévios. **ANAIS SIMPAC**, v. 8, n. 1, 2018.

GAO, W.; GUO, X. M.; WANG, H. L.; ZHAO, R. H.; XIE, G. S.; LI, C.; HUANG, J. A double staining method using calcofluor white and acridine orange to differentiate life stages of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) on hepatopancreatic sections. *Aquaculture*, v. 528, p. 735628, 2020.

DA SILVA, Gabriela Pereira et al. Tumor de sistema nervoso central e o paciente pediátrico: alterações fonoaudiológicas. **Distúrbios da Comunicação**, v. 32, n. 4, p. 562-573, 2020.

De Azevedo, J.; Walter, F. MolDock Applied to Structure-Based Virtual Screening. *Curr. Drug Targets* **2010**, 11, 327–334.

DE, Saikat et al. MBZM-N-IBT, a novel small molecule, restricts chikungunya virus infection by targeting nsP2 protease activity in vitro, in vivo, and ex

vivo. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 66, n. 7, p. e00463-22, 2022.

DEGIRMENCI, Ufuk; WANG, Mei; HU, Jiancheng. Targeting aberrant RAS/RAF/MEK/ERK signaling for cancer therapy. **Cells**, v. 9, n. 1, p. 198, 2020.

DEVALE, Titiksh L. et al. Híbridos dihidropirimidinona-isatina como novos inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa do HIV-1. **Química Bioorgânica**, v. 70, p. 256-266, 2017.

DING, Zhen; ZHOU, Minfeng; ZENG, Cheng. Recent advances in isatin hybrids as potential anticancer agents. **Archiv der Pharmazie**, v. 353, n. 3, p. 1900367, 2020.

DOS SANTOS, André Luiz. GLIOMAS, TUMORES MALIGNOS QUE SURGEM NO SISTEMA NERVOSO. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 7, n. 2, p. 12-12, 2021.

ELLIOTT, Amicia D. Confocal microscopy: principles and modern practices. **Current protocols in cytometry**, v. 92, n. 1, p. e68, 2020.

ESQUER, Hector et al. Advanced high-content-screening applications of clonogenicity in cancer. **SLAS DISCOVERY: Advancing the Science of Drug Discovery**, v. 25, n. 7, p. 734-743, 2020.

FERRAZ DE PAIVA, Raphael Enoque et al. Anticancer compounds based on isatin-derivatives: Strategies to ameliorate selectivity and efficiency. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 7, p. 627272, 2021.

FERREIRA, L. P.; GASPAR, V. M.; MANO, J. F. Design of spherically structured 3D in vitro tumor models-Advances and prospects. **Acta Biomaterialia**, v. 75, p. 11-34, 2018.

FRANKEN, Nicolaas AP et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315-2319, 2006.

FRANZ, Annaliese K.; DREYFUSS, Philip D.; SCHREIBER, Stuart L. Synthesis and cellular profiling of diverse organosilicon small molecules. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 5, p. 1020-1021, 2007.

GALON, Jerome; LANZI, Anastasia. Immunoscore and its introduction in clinical practice. **The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging: Official Publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN)[and] the International Association of Radiopharmacology (IAR),[and] Section of the Society of..**, v. 64, n. 2, p. 152-161, 2020.

GIATAGANA, Eirini-Maria et al. Lumican in carcinogenesis—revisited. **Biomolecules**, v. 11, n. 9, p. 1319, 2021.

GONZÁLEZ-OROZCO, Juan Carlos et al. Activation of membrane progesterone

receptor-alpha increases proliferation, migration, and invasion of human glioblastoma cells. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 477, p. 81-89, 2018.

HABANJAR, Ola et al. 3D cell culture systems: tumor application, advantages, and disadvantages. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 22, p. 12200, 2021.

HEUILLET E, MÉNAGER J, FARDIN V, FLAMAND O, BOCK M., GARRET C, CRESPO A, FALLOURD AM., DOBLE, A (1990). Characterization of a human NK1 tachykinin receptor in the astrocytoma cell line U373 MG. *J. Neurochem.* 60: 868-76.

HUSE, Jason T.; HOLLAND, Eric C. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. **Nature reviews cancer**, v. 10, n. 5, p. 319-331, 2010.

JACHAK, Sanjay M.; SAKLANI, Arvind. Challenges and opportunities in drug discovery from plants. **Current science**, p. 1251-1257, 2007.

JENSEN, Caleb; TENG, Yong. Is it time to start transitioning from 2D to 3D cell culture?. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 7, p. 33, 2020.

KAKKAR, Rita et al. Isatin and its derivatives: a survey of recent syntheses, reactions, and applications. **MedChemComm**, v. 10, n. 3, p. 351-368, 2019.

KOHLMEYER, Jordan L. et al. CDKs in sarcoma: mediators of disease and emerging therapeutic targets. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 8, p. 3018, 2020.

KUMAR, Priti; NAGARAJAN, Arvindhan; UCHIL, Pradeep D. Analysis of cell viability by the MTT assay. **Cold spring harbor protocols**, v. 2018, n. 6, p. pdb. prot095505, 2018.

KUMAR, Sriramoju Bharath et al. Synthesis, antitubercular and anticancer activity of new Baylis–Hillman adduct-derived N-cinnamyl-substituted isatin derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, v. 23, p. 1934-1940, 2014.

LAHARI, Kosaraju; SUNDARARAJAN, Raja. Design and synthesis of novel isatin derivatives as potent analgesic, anti-inflammatory and antimicrobial agents. **Journal of Chemical Sciences**, v. 132, p. 1-15, 2020.

LEE, Shannon; RAUCH, Jens; KOLCH, Walter. Targeting MAPK signaling in cancer: mechanisms of drug resistance and sensitivity. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 3, p. 1102, 2020.

LIMA-JUNIOR, C. G. et al. Synthesis, Cytotoxic activity on Leukemia Cell lines and Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) Studies of Morita-Baylis-Hillman Adducts. **Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 602-612, 2016.

LOPEZ, Andrea et al. Co-targeting of BAX and BCL-XL proteins broadly

overcomes resistance to apoptosis in cancer. **Nature communications**, v. 13, n. 1, p. 1199, 2022.

LÓPEZ-OTÍN, Carlos et al. Meta-hallmarks of aging and cancer. **Cell metabolism**, v. 35, n. 1, p. 12-35, 2023.

MAGGIO, Ilaria et al. Meningioma: not always a benign tumor. A review of advances in the treatment of meningiomas. **CNS oncology**, v. 10, n. 2, p. CNS72, 2021.

MALVANDI, Amir Mohammad; MEHRZAD, Jalil; MOGHADDAM, Masoud Saleh. Gene expression quantification of toll like receptors 2, 4 and co-molecules in human glioblastoma cell line (U87-MG): toward a new in vitro model of inflammation. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 14, n. 5, p. 428, 2011.

MARTÍNEZ-ESCARDÓ, Laura et al. Gossypol Treatment Restores Insufficient Apoptotic Function of DFF40/CAD in Human Glioblastoma Cells. **Cancers**, v. 13, n. 21, p. 5579, 2021.

MATSUI, Toshiaki et al. Robustness of clonogenic assays as a biomarker for cancer cell radiosensitivity. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 17, p. 4148, 2019.

MATTIUZZI, Camilla; LIPPI, Giuseppe. Current cancer epidemiology. **Journal of epidemiology and global health**, v. 9, n. 4, p. 217, 2019.

MELIS, C.; et al. Isatin: a privileged scaffold for the design of carbonic anhydrase inhibitors. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 32, n. 1, p. 68-73, 2017.

MELO, Cinthia Rodrigues et al. Atividade antiplasmodial in vitro de um derivado da N-metil-isatina (CH3ISACN), e sua toxicidade in silico e in vivo. 2020.

Molexus Computational Drug Discovery Molegro Virtual Docker User Manual - MVD 2019.7.0. *Copyr. Molexus* **2019**, 1, 239.

MORANA, Ornella; WOOD, Will; GREGORY, Christopher D. The apoptosis paradox in cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1328, 2022.

MUĞLU, Halit; YAKAN, Hasan; BAKIR, Temel Kan. Synthesis, spectroscopic studies, and antioxidant activities of novelthio/carbohydrazones and bis-isatin derivatives from terephthalaldehyde. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 44, n. 1, p. 237-248, 2020.

NATH, Rajarshi et al. Isatin containing heterocycles for different biological activities: Analysis of structure activity relationship. **Journal of Molecular Structure**, v. 1222, p. 128900, 2020.

NEMKOV, Travis; D'ALESSANDRO, Angelo; REISZ, Julie A. Metabolic

underpinnings of leukemia pathology and treatment. **Cancer Reports**, v. 2, n. 2, p. e1139, 2019.

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

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde. Câncer: folha informativa. 2020.

OPAS, Organização Mundial Pan-Americana de Saúde. **Carga global de câncer aumenta em meio à crescente necessidade de serviços**: folha informativa. 2024.

ORR, Brent A. Pathology, diagnostics, and classification of medulloblastoma. **Brain Pathology**, v. 30, n. 3, p. 664-678, 2020.

OSTROM, Quinn T. et al. Risk factors for childhood and adult primary brain tumors. **Neuro-oncology**, v. 21, n. 11, p. 1357-1375, 2019.

PEDDIBHOTLA, S. 3-Substituted-3-hydroxy-2-oxindole, an emerging new scaffold for drug discovery with potential anti-cancer and other biological activities. **Current Bioactive Compounds**, v. 5, n. 1, p. 20-38, 2009.

PINZI, Luca; RASTELLI, Giulio. Molecular docking: shifting paradigms in drug discovery. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 18, p. 4331, 2019.

PRAJAPAT, P.; et al. Synthetic and Medicinal Chemistry in Drug Discovery: Needs for Today. **Ann Med Chem Res**, v. 3, n.1, p.1021, 2017.

PRETE, Alessandro et al. Update on fundamental mechanisms of thyroid cancer. **Frontiers in endocrinology**, v. 11, p. 102, 2020.

PUNDIR, C. S.; JAKHAR, Seema; NARWAL, Vinay. Determination of urea with special emphasis on biosensors: A review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 123, p. 36-50, 2019.

RAJESH, Y. et al. Targeting NFE2L2, a transcription factor upstream of MMP-2: A potential therapeutic strategy for temozolomide resistant glioblastoma. **Biochemical pharmacology**, v. 164, p. 1-16, 2019.

RENVOIZE C., BIOLA A., PALLARDY M., BREARD J. Apoptosis: identification of dying cells. *Cell biology and toxicology*, v. 14, n. 2, p. 111-120, 1998.

ROBBINS E., MARCUS P.I. Dynamics of acridine orange-cell interaction: I. Interrelationships of acridine orange particles and cytoplasmic reddening. *The Journal of cell biology*, v. 18, n. 2, p. 237-250, 1963.

Sangeetha, M.K.; Vallabi, D.E.; Sali, V.K.; Thanka, J.; Vasanthi, H.R. Sub-acute toxicity profile of a modified resveratrol supplement. **Food and Chemical**

Toxicology, 59: 492–500, 2013.

SANGI, D.P. Estratégias de síntese na descoberta de fármacos: o emprego da síntese orientada pela diversidade estrutural. **Química Nova**, v. 39, n. 8, p. 995-1006, 2016.

SARASTE, Antti; PULKKI, Kari. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular research**, v. 45, n. 3, p. 528-537, 2000.

SCHAFF, Lauren R.; MELLINGHOFF, Ingo K.. Glioblastoma and Other Primary Brain Malignancies in Adults. **Jama**, [S.L.], v. 329, n. 7, p. 574, 21 fev. 2023.

ŚLEDZIŃSKA, Paulina et al. Prognostic and predictive biomarkers in gliomas. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 19, p. 10373, 2021.

SMITH, Martyn T. et al. As principais características dos carcinógenos: relação com as características do câncer, biomarcadores relevantes e ensaios para medi-los. **Epidemiologia, Biomarcadores e Prevenção do Câncer**, v. 10, pág. 1887-1903, 2020.

SORICE, Maurizio. Crosstalk of autophagy and apoptosis. **Cells**, v. 11, n. 9, p. 1479, 2022.

SRAVANTHI, T.V.; MANJU, S. L. Indoles—a promising scaffold for drug development. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, p. 1-10, 2016.

SUHAIL, Yasir et al. Systems biology of cancer metastasis. **Cell systems**, v. 9, n. 2, p. 109-127, 2019.

TAN B.L., NORHAIZAN M.E. Manilkara zapota (L.) P. Royen leaf water extract triggered apoptosis and activated caspase-dependent pathway in HT-29 human colorectal cancer cell line, *Biomed. & Pharmacother*, v. 110, p. 748-757, 2018.

TAYLOR, Kathryn R. et al. Glioma synapses recruit mechanisms of adaptive plasticity. **Nature**, v. 623, n. 7986, p. 366-374, 2023.

TERPINSKAYA, Tatiana I. et al. α -Conotoxins and α -cobratoxin promote, while lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitors suppress the proliferation of glioma C6 cells. **Marine Drugs**, v. 19, n. 2, p. 118, 2021.

THAKUR, Ravi Kumar et al. Synthesis of isatin based N1-alkylated 3- β -C-glycoconjugated-oxopropylidene oxindoles as potent antiplasmodial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 162, p. 448-454, 2019.

THEELER, Brett J. et al. Moving toward molecular classification of diffuse gliomas in adults. **Neurology**, v. 79, n. 18, p. 1917-1926, 2012.

Thomsen, R.; Christensen, M.H. MolDock: A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 3315–3321.

TOUMI, Amani et al. Synthesis, antidiabetic activity and molecular docking study of rhodanine-substituted spirooxindole pyrrolidine derivatives as novel α -amylase inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, v. 106, p. 104507, 2021.

TUMOSIENĖ, Ingrida et al. Novel N-substituted amino acid hydrazone-isatin derivatives: Synthesis, antioxidant activity, and anticancer activity in 2D and 3D models in vitro. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 15, p. 7799, 2021.

UGWAH-OGUEJIOFOR CJ.; et al. Acute and sub-acute toxicity of aqueous extract of aerial parts of *Caralluma dalzielii* N. E. **Brown in mice and rats. Heliyon**, v. 5, n. 1, p. e01179, 2019.

VENKATARAMANI, Varun et al. Glioblastoma hijacks neuronal mechanisms for brain invasion. **Cell**, v. 185, n. 16, p. 2899-2917. e31, 2022.

VIGNESWARAN, Krishanthan; NEILL, Stewart; HADJIPANAYIS, Costas G. Beyond the World Health Organization grading of infiltrating gliomas: advances in the molecular genetics of glioma classification. **Annals of translational medicine**, v. 3, n. 7, 2015.

VOSS, A. K.; STRASSER, A. The essentials of developmental apoptosis. **F1000Res.**, v. 9, 2020.

WANG, Ying I.; ABACI, Hasan Erbil; SHULER, Michael L. Microfluidic blood-brain barrier model provides in vivo-like barrier properties for drug permeability screening. **Biotechnology and bioengineering**, v. 114, n. 1, p. 184-194, 2017.

Watowich MB, Gilbert MR, Larion M. T cell exhaustion in malignant gliomas. **Trends Cancer**. 2023 Apr;9(4):270-292.

WEI, Guoqing et al. Recent progress in nanomedicine for enhanced cancer chemotherapy. **Theranostics**, v. 11, n. 13, p. 6370, 2021.

XU, Shengchao et al. Immunotherapy for glioma: current management and future application. **Cancer letters**, v. 476, p. 1-12, 2020.

XU, Shengchao; TANG, Lu; LI, Xizhe; FAN, Fan; LIU, Zhixiong. Immunotherapy for glioma: current management and future application. **Cancer Letters**, [S.L.], v. 476, p. 1-12, abr. 2020.

XU, Z.; et al. Isatin hybrids and their anti-tuberculosis activity. **Chinese Chemical Letters**, v.28, n. 2, p. 159-167, 2017.

YANG, Keyang et al. Glioma targeted therapy: insight into future of molecular approaches. **Molecular Cancer**, v. 21, n. 1, p. 1-32, 2022.

YOUSSEF, Gilbert; MILLER, Julie J. Lower grade gliomas. **Current neurology and neuroscience reports**, v. 20, p. 1-9, 2020.

YU, Shi-cang et al. Isolation and characterization of cancer stem cells from a human glioblastoma cell line U87. *Cancer letters*, v. 265, n. 1, p. 124-134, 2008.

YUKI, Kanako et al. Organoid models of tumor immunology. **Trends in immunology**, v. 41, n. 8, p. 652-664, 2020.

ZHANG, Fang; XU, Chun-Lei; LIU, Chun-Mei. Drug delivery strategies to enhance the permeability of the blood–brain barrier for treatment of glioma. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 9, p. 2089, 2015.

ZHANG, Qian et al. 5-Acetamido-1-(methoxybenzyl) isatin inhibits tumor cell proliferation, migration, and angiogenesis. **RSC advances**, v. 9, n. 63, p. 36690-36698, 2019.

