UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

AUVANI ANTUNES DA SILVA JÚNIOR

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICÂNCER E MECANISMO DE AÇÃO DE DERIVADOS IMIDAZOLIDÍNICOS

Recife
2023

AUVANI ANTUNES DA SILVA JÚNIOR

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICÂNCER E MECANISMO DE AÇÃO DE DERIVADOS IMIDAZOLIDÍNICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde.

Orientador (a): Profª Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta

Coorientador (a): Profº. Dr. Mardonny Bruno de Oliveira Chagas

Coorientador (a): Profª. Drª. Michelly Cristiny Pereira

Recife

2023

Catalogação na Fonte:
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Silva Júnior, Auvani Antunes da.
Avaliação da atividade anticâncer e mecanismo de ação de derivados imidazolidínicos. / Auvani Antunes da Silva Júnior. – 2023.

138 f. : il., fig.; tab.

Orientadora: Maíra Galdino da Rocha Pitta.
Coorientador: Mardonny Bruno de Oliveira Chagas.
Coorientadora: Michelly Cristiny Pereira.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação terapêutica, 2023.
Inclui referências.

1. Anticâncer. 2. Docking molecular. 3. Imidazolidina. 4.VEGFR2. 5. SwissADME. I. Pitta, Ma´ra Galdino da Rocha. (Orient.). II. Chagas, Mardonny Bruno de Oliveira. (Coorient.). III. Pereira, Michelly Cristiny. (Coorient.). IV. Título.

587 CDD (22.ed.) UFPE/CB – 2023-104

AUVANI ANTUNES DA SILVA JÚNIOR

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICÂNCER E MECANISMO DE AÇÃO DE DERIVADOS IMIDAZOLIDÍNICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Área de Concentração Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Orientadora: Profª. Drª. Maira Galdino da Rocha Pitta
Co-orientador: Profº. Dr. Mardonny Bruno de Oliveira Chagas

Co-orientadora: Profª. Drª. Michelly Cristiny Pereira

.

Aprovado em: _28/04/2023.

BANCA EXAMINADORA

_____
Prof.ª Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

_____
Prof.ª. Dra. Gardenia Carmen Gadelha Militão (Avaliadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

_____
Dr. Anderson Rodrigues de Almeida (Avaliador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

_____
Dr. Jeann Fabian Branco Júnior (Avaliador Externo)

Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordestes - CETENE

_____
Prof.ª Dra. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro (Avaliadora Interna)

Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

DEDICATÓRIA

Aos meus pilares maiores,

que sempre acompanharam meus passos

e me deram conselhos para a vida,

meus pais, Auvani Antunes e Marlene Galindo.

AGRADECIMENTO

A Deus e a todas as Nossas Senhoras, pela benção da vida, por me fortalecer e proteger sempre em meus caminhos, pelas pessoas que pude conhecer até aqui, pela dádiva de poder realizar este trabalho e por acalmar meu coração nos momentos de dificuldade e aflição.

À minha família, em especial a minha mãinha Marlene, meu painho Auvani e meu irmão Rodrigo, por todo amor, compreensão e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida. Amo vocês.

A meu noivo Edson Nogueira (Edinho) pelo carinho, paciência e companheirismo constantes durante essa jornada. Muito obrigado pelo apoio com paciência e compreensão nos meses que precederam a etapa final deste trabalho.

À Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta pela orientação neste trabalho, pela confiança, e contribuições profissionais. Muito obrigado por seu acolhimento, incentivo, disponibilidade de sempre responder a qualquer hora e, principalmente, ensinamentos acadêmicos.

Ao Prof. Dr. Mardonny Bruno de Oliveira Chagas pela orientação neste trabalho, pela confiança, amizade e oportunidades. Muito obrigado por toda sua dedicação e contribuição nesta jornada. Obrigado pelos ensinamentos acadêmicos, pelo amor à pesquisa e à docência. Espero um dia ser capaz de retribuir tudo o que fez por mim.

À Profa. Dra. Michelly Cristiny Pereira pela orientação neste trabalho, pelo brilho no olho expressos pelo amor a pesquisa e à docência. Muito obrigado por sua dedicação e disponibilidade constante em ajudar sempre me guiando também nesta jornada.

Ao Prof. Dr. Moacyr de Jesus Barreto de Melo Rêgo, pela orientação neste trabalho e extrema dedicação a pesquisa. Muito obrigado por sua dedicação e disponibilidade constante em contribuir com a pesquisa cientifica.

À Profa. Dra. Michelle Melgarejo da Rosa e Dra. Marina Galdino da Rocha Pitta por sempre contribuir com orientações complementares e fazer parte desta parceria, por enormes contribuições de orientação valiosas, pelo amor a pesquisa e ajudar ao próximo, pelo aprendizado e pela paciência. Muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Fabrício Oliveira Souto e aos seus alunos pela contribuição e oportunidades no auxilio em experimentos auxiliados em seu laboratório.

A Profª Dra. Luanna Moita do Lab. Morfofuncional do NCV, pelos incentivos a dar novos passos rumo ao doutorado.

Ao Prof. Dr. Vitor Caiaffo, Coordenador do NCV, pelo seu apoio a este desafio profissional e todos os meus colegas do Núcleo de Ciências da Vida do Campus Caruaru, que sempre se empenham em dar seu melhor para crescimento da interiorização do ensino público federal de nível superior, em especial a equipe do Laboratório Morfofuncional, Ana Theresa Santos, Ligia Ferreira e Carlos Renato.

Ao meu aluno de iniciação científica e companheiro de laboratório Thalles Rodolfo pela convivência, contribuições e disponibilidade em aprender e executar com zelo e presteza tudo que lhe fora ensinado.

Aos pós-doutorandos Dra. Sayonara Gonçalves, Amanda Albuquerque, Barbara Oliveira e Joelson Crispim, por sua ajuda, paciência e disponibilidade em sempre acolher minhas dúvidas e necessidades científicas. Meu muito obrigado!

Aos colegas que me acolheram em minha chegada ao laboratório, Kaleb Simão e Eduardo David, por suas disponibilidades e paciência em transmitir conhecimentos.

Aos meus colegas de apartamento Anderson Felix e Eduardo Davi, pela risadas, compartilhamento de conhecimentos, trocas de dicas de culinária e conversas leves para deixarmos ao dias mais leves. Muito obrigado pela acolhida e companheirismo.

Aos amigos do LPSF, Jean Branco e Arion Moura, por seus ensinamentos, paciência e contribuições das características e propriedades químicas e ensinamentos na execução de técnicas.

Aos Técnicos e Biomédicos do NUPIT, Hernando Neto, Valéria Moura, Thacianna Barreto, Shana Weber, Luciana Gomes, vocês sempre ajudaram diariamente de diversas formas, ajudas as quais não tenho palavras para descrever o quão foram importantes e agradeço muito a todos vocês.

Aos meus companheiros da tumoral, Celine Beatriz, Lílian Galdino, Lucas Sousa, Vanessa Brito, João Victor, Isabella Ralph, Thiago Douberin, muito obrigado por todos

os seus gestos de coleguismos e ajudas sempre que possível, o apoio de vocês sempre foi de grande importância. Muito obrigado.

A todos os meus colegas de laboratório do LINAT pela convivência, momentos de descontração, conselhos e cordialidade.

A Paulo Germano, secretário do Programa de Pós-graduação em Inovação terapêutica por ser sempre prestativo e atencioso. Obrigado Paulo.

À Universidade Federal de Pernambuco pela oportunidade oferecida.

A todos aqueles não mencionados que, de alguma maneira, contribuíram na realização deste trabalho.

Títulos, cargos e funções são rótulos temporais (Silva-Júnior, 2023), o que mais importa é saber que mesmo que se conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana (Carl Jung).

RESUMO

O câncer é um grave problema de saúde pública em escala mundial, sua incidência tem aumentado devido à crescente exposição da população a fatores de risco e ao aumento da expectativa de vida. A quimioterapia é a modalidade de tratamento que atua de maneira sistêmica e a mais empregada, contudo, sabe-se que a maioria dos agentes quimioterápicos podem acarretar diferentes graus de toxicidade em células normais. O que torna necessário o desenvolvimento de novas terapias. Nesse contexto os derivados imidazolidínicos são agentes heterocíclicos importantes, devido a sua capacidade de apresentar efeitos biológicos já conhecidos, como anticonvulsivante, antiparasitário, imunomodulador e, especialmente, anticâncer. Baseado nisso, o presente estudo avaliou a atividade anticâncer *in vitro* de dez novos derivados imidazolidínicos e seus possíveis mecanismos de ação. Na avaliação *in silico* através da plataforma SwissADME e SwissTarget, todas as moléculas apresentam alta polaridade, boa solubilidade em água, ausência de violações dos princípios de Lipinski, e características de bioatividade, estas sugerem a possibilidade de aplicações anticâncer. Foi observado nos resultados *in sílico que* todas as moléculas possuem alta absorção gastrointestinal e excreção renal, e possuem as proteínas do tipo quinases como alvos com os quais têm maior afinidade. No ensaios in vitro, frente as PBMCs todos os derivados imidazolidínicos não apresentaram citotoxicidade com concentrações iguais e menores que 100µM, apresentando viabilidade celular superior a 100%. Frente às células tumorais de câncer de próstata (Du145), câncer de pâncreas (MiaPACA2) o composto LPSF/MG-2 apresentou CI50 entre 17,19 ± 1,11µM a 45,92µM ±1,31, respectivamente. O composto LPSF/MG-3 apresentou CI50 de 65,64µM na linhagem de câncer de pâncreas (Panc1). A molécula de LPSF/MG-4 apresentou CI50 de 29,9± 2,3µM na linhagem Du145. A molécula LPSF/MG-7 apresentou atividade para todas as linhagens pesquisadas com concentrações CI50 entre 13,92± 2,3µM a 55,93 ± 3,1µM,sendo observado efeito significativo de retardo da migração celular, redução da formação de clones pelos compostos LPSF/MG-2, LPSF/MG-3 e LPSF/MG-7 nas respectivas linhagens celulares. Identificou-se ainda que os compostos LPSF/MG-2 e LPSF/MG-7 foram capazes de causar a parada do ciclo celular na fase Sub-G0 e induzir morte celular. No ensaio de docking molecular foi evidenciado a interação da LPSF/MG-7 com sítio ativo da proteína alvo VEGFR2. No Ensaio de RTqPCR em estudos primários a esta pesquisa foram evidenciados que a molécula de LPSF/MG-7 demonstrou maior expressão da Caspase 3 e 7, assim como das

moléculas pro-apoptóticas BID e BAX. Assim, os derivados sintetizados e aplicados neste estudo são estruturas com atividade anticâncer, se destacando a LPSF/MG-2 e LPSF/MG-7 com resultados interessantes, que sugerem potencial para aprofundamento de ensaios e possíveis aplicações terapêuticas como novas moléculas anticâncer.

Palavras-chave: Anticancer, docking molecular, imidazolidina, VEGFR2, SwissADME.

ABSTRACT

Cancer is a serious public health problem worldwide, its incidence has increased due to the increasing exposure of the population to risk factors and the increase in life expectancy. Chemotherapy is the treatment modality that acts systemically and is the most used, however, it is known that most chemotherapeutic agents can cause different degrees of toxicity in normal cells. This makes it necessary to develop new therapies. In this context, imidazolidine derivatives are important heterocyclic agents, due to their ability to present known biological effects, such as anticonvulsant, antiparasitic, immunomodulatory and, especially, anticancer. Based on this, the present study evaluated the in vitro anticancer activity of ten new imidazolidine derivatives and their possible mechanisms of action. In the in silico evaluation through the SwissADME and SwissTarget platform, all molecules present high polarity, good solubility in water, absence of violations of Lipinski's principles, and bioactivity characteristics, these suggest the possibility of anticancer applications. It was observed in the in silico results that all molecules have high gastrointestinal absorption and renal excretion, and have protein kinases as targets with which they have greater affinity. In the in vitro assays, against PBMCs, all imidazolidine derivatives did not show cytotoxicity with concentrations equal to and lower than 100µM, showing cell viability greater than 100%. Against prostate cancer (Du145) and pancreatic cancer (MiaPACA2) tumor cells, the compound LPSF/MG-2 showed IC50 between 17.19 ± 1.11µM and 45.92µM ±1.31, respectively. The compound LPSF/MG-3 showed an IC50 of 65.64µM in the pancreas cancer cell line (Panc1). The LPSF/MG-4 molecule showed an IC50 of 29.9± 2.3µM in the Du145 strain. The LPSF/MG-7 molecule showed activity for all strains investigated with IC50 concentrations between 13.92± 2.3µM to 55.93 ± 3.1µM, with a significant effect of delaying cell migration, reduction of clone formation by LPSF/MG-2, LPSF/MG-3 and LPSF/MG-7 compounds in the respective cell lines. It was also identified that the compounds LPSF/MG-2 and LPSF/MG-7 were capable of causing cell cycle arrest in the Sub-G0 phase and inducing cell death. In the molecular docking assay, the interaction of LPSF/MG-7 with the active site of the target protein VEGFR2 was evidenced. In the RTqPCR assay in primary studies for this research, it was evidenced that the LPSF/MG-7 molecule showed greater expression of Caspase 3 and 7, as well as the pro-apoptotic molecules BID and BAX. Thus, the derivatives synthesized and applied

in this study are structures with anticancer activity, highlighting LPSF/MG-2 and LPSF/MG-7 with interesting results, which suggest potential for further testing and possible therapeutic applications as new anticancer molecules.

Keywords: Anticancer, molecular docking, imidazolidine, VEGFR2, SwissADME.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fatores de riscos associados ao desenvolvimento de câncer no Brasil e no Mundo.....30

Figura 2 - Distribuição relativa total de incidências e mortes por câncer no mundo por sítio anatômico.....31

Figura 3 - Distribuição proporcional dos tipos de neoplasias com maiores taxa de incidência no Brasil estimados para 2020-2022, por sexo, exceto pele não melanoma.....32

Figura 4 – Processo de progressão tumorgênico.....33

Figura 5 – Marco das principais características do câncer apresentadas por células transformadas.....36

Figura 6 – Fases do ciclo celular e a interferência das quinases dependentes de ciclinas (CDKs).....39

Figura 7 – Vias de morte celular: necrose, apoptose e autofagia.....41

Figura 8 – Representação das cascatas das vias intrínseca e extrínseca da apoptose.....44

Figura 9 – Cascata de sinalização e formação de complexos da via de morte da necroptose.....46

Figura 10 – Microambiente tumoral, carcinogênese e metástase.....49

Figura 11 - Representação molecular do arcabouço estrutural de imidazolidinas e algumas possibilidades de variações de ligantes.....53

Figura 12 – Representação da estrutura química do 4, β- tetimurtina……54

Figura 13 – Estrutura química do DFH (A) e DCH (B)…….55

Figura 14 - Estrutura química do Fluoren-NU……...56

Figura 15 – Estrutura química de Imidazolidinas: NBI, HBI, MBI e DBI.....57

Figura 16 - Representação química da azaspiro hidantoína, ASHD…….58

Figura 17 - Esquema de rota de síntese de imidazolidina-2,4-diona e seus derivados.....61

Figura 18 - Representação da interação 3D da molécula LPSF/MG-7 acoplada ao sítio da VEGFR2.....79

Figura 19 - Avaliação da inibição da formação de clones celulares de Panc1 tratados com os derivados LPSF/MG-3 e LPSF/MG-7.....83

Figura 20 - Avaliação da inibição da formação de clones celulares de Mia-paca2 tratados após 24 horas (a) e 48 horas (b) com o derivado LPSF/MG-2 e LPSF/MG-7.....84

Figura 21 - Avaliação da inibição da migração celular na linhagem de câncer de pâncreas Panc1 tratados no tempo de 12 e 24 horas com os compostos LPSF/MG-3 e LPSF/MG-7, controle negativo (DMSO 0,1%) e controle positivo (gemcitabina 1µM) 85

Figura 22 - Avaliação da inibição da migração celular na linhagem de câncer de pâncreas Mia-paca2 tratados no tempo de 12 e 24 horas com os compostos LPSF/MG-2 e LPSF/MG-7, controle negativo (DMSO 0,1%) e controle positivo (gemcitabina 1µM).....86

Figura 23 - Avaliação da influência sobre o ciclo celular do tratamento com LPSF/MG-2 e LPSF/MG-7 na dose de CI50 e o dobro do CI50 na linhagem de câncer de pâncreas Mia-paca-2 no tempo de 48 horas.....88

Figura 24 - Avaliação da influência sobre o ciclo celular do tratamento com LPSF/MG-3 e LPSF/MG-7 na dose de CI50 e o dobro do CI50 na linhagem de câncer de pâncreas Panc1 no tempo de 48 horas.....89

Figura 25 - Avaliação da influência sobre o ciclo celular do tratamento com LPSF/MG-2 e LPSF/MG-7 na dose de CI50 e o dobro do CI50 na linhagem de câncer de pâncreas Mia-paca-2 no tempo de 72 horas.....90

Figura 26 - Avaliação da influência sobre o ciclo celular do tratamento com LPSF/MG-3 e LPSF/MG-7 na dose de CI50 e o dobro do CI50 na linhagem de câncer de pâncreas Panc1 no tempo de 72 horas.....91

Figura 27 - Avaliação do perfil de indução de morte no tratamento com LPSF/MG-2 e LPSF/MG-7 na dose de CI50 e o dobro do CI50 na linhagem de câncer de pâncreas Mia-paca-2 no tempo de 48 e 72 horas.....93

Figura 28 - Avaliação do perfil de indução de morte no tratamento com LPSF/MG-3 e LPSF/MG-7 na dose de CI50 e o dobro do CI50 na linhagem de câncer de pâncreas Panc1 no tempo de 48 e 72 horas.....94

Figura 29 – Efeito dos derivados de imidazolidinas-2,4-dionas na expressão de genes relacionados a apoptose (BAX, BID, Casp3 e Casp7) em comparação ao gene endógeno 18S na linhagem de Mia-paca2.....97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Derivados imidazolidínicos potencialmente anticâncer.....62

Tabela 2 - Linhagens celulares.....65

Tabela 3 - Propriedades físico químicas e predição de semelhança de imidazolidinas-2,4-diona com drogas conhecidas.....71

Tabela 4 - Predição de score de bioatividade das imidazolidina-2,4-diona.....72

Tabela 5 - Propriedades farmacocinéticas e metabólicas dos derivados de imidazolidina.....74

Tabela 6 - Análise de toxicidade *in silico* das moléculas de imidazolidina.....76

Tabela 7 - Estudo de modelagem molecular do derivado mais promissor (LPSF/MG-4) dentro dos sítios ativos da VEGFR2 (PDB ID: A4SD) 78

Tabela 8 – Concentração inibitória mínima capaz de induzir efeito antiproliferativo de 50% da população celular pelos compostos imidazolidina-2,4-diona.....80

Tabela 9 – Índice de seletividade de novos derivados imidazolidina-2,4-diona.....81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A549 – Linhagem celular de câncer de pulmão

AIF - Fator de Indução de Apoptose

Al – Alumínio

ALT - Alanina transaminase

APAF-1 - Fator de ativação de protease apoptótica (do inglês Apoptotic Protease Activating Factor 1).

Apo2L -Ligante do receptor de morte 2

Apo3L - Ligante do receptor de morte 3

AST - Aspartato transaminase sérica

ATCC (The Global Bioresource Center)

BCRJ - (Rio de Janeiro Cell Bank)

Bad - Agonista de morte celular associado a Bcl-2.

Bak - Antagonista homólogo à Bcl-2.

Bax - Proteína associada ao domínio X de Bcl-2

Bcl-2 - Célula B CLL/Linfoma 2 (B-cell lymphoma protein-2 family).

Bcl-w - Membro da família de proteínas Bcl-2.

Bcl-xl - Célula B CLL/Linfoma extra grande (B-cell lymphoma extra-large).

BG-1 – Linhagem de câncer de ovário humano

Bid - Agonista de morte associado ao domínio BH3.

BRCA1 - Câncer de mama 1 (Breast cancer 1)

BRCA2 - Câncer de mama 2 (Breast cancer 2)

BSA - Albumina bovina sérica (Bovine Serum Albumin)

CaCl2 – Cloreto de Cálcio

CAFs – Fibroblastos associados a câncer

CDK - Quinase dependente de ciclina

CDs - Células dendríticas

CKI - Inibidor de quinase dependente de ciclina.

CO2 - Gás carbônico.

DAMPs - Padrões Moleculares Associados a Danos (do inglês "Damage-associated molecular patterns)

DANT - Doenças e agravos não transmissíveis

DMEN HIGH – Meio Eagle modificado por Dulbeccos com alta concentração de glicose (do inglês: Dulbecco′s Modified Eagle′s Medium - high glucose)

DMEN LOW - Meio Eagle modificado por Dulbeccos com baixa concentração de glicose (do inglês: Dulbecco′s Modified Eagle′s Medium -Low glucose)

DMSO - Dimetilsulfóxico.

cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar (do inglês: Complementary deoxyribonucleic acid)

DNA - Ácido desoxirribonucleico (do inglês: deoxyribonucleic acid)

cRNA - Ácido ribonucleico complementar (do inglês: Complementary ribonucleic acid)

RNA - Ácido ribonucleico (do inglês: ribonucleic acid)

RTqPCR - Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa (do inglês: Polymerase Chain Reaction with Reverse Transcription)

DU-145 – Linhagem de câncer de próstata,

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético (inglês **ethylenediaminetetraacetic acid)**

EGF - Fator de crescimento epidermal

EGF – Fator de crescimento tumoral.

FADD - Domínio de morte associado à via Fas (Fas-Associated via Death Domain).

Fas – Membro "6" da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral.

Fe – Ferro

FGF - Fator de Crescimento de Fibroblasto

G0 - Intervalo celular 0

G1 - Intervalo celular 1

G2 - Intervalo celular 2

Ga - Gálio

GLOBOCAN – Observatório Global do Câncer (do inglês: Global Cancer Observatory)

HCT-116 - Linhagem de carcinoma colorretal

Hek-293 – Linhagem celular de câncer embrionário renal

HeLa – Linhagem de adenocarcinoma de colo do útero

HEPES – Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico (do inglês: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)

HepG2 – Linhagem de carcinoma hepatocelular

HL-60 - Linhagem de leucemia aguda.

HPV - papiloma vírus humano

HT29 Linhagem celular de câncer de fígado;

IAPs - (do inglês Inhibitor Apoptosis Proteins)

IARC - Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (do inglês Internation Agency of Research Cancer)

IC25 - Concentração inibitória de 25%.

CI50 - Concentração inibitória de 50%.

CI502x – Dobro da concentração inibitória de 50%.

IFN-γ - Interferon-gama

IL-2 - Interleucina-2

IMR-32 - Linhagem celular de neuroblastoma

In - índio

INCA– Instituto Nacional do Câncer.

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês: I*nternational Union of Pure and Applied Chemistry*

Jurkat - Linhagem de leucemia aguda.

K562 - Linhagem de leucemia aguda.

L929 – Linhagem celular de fibrossarcoma

LDH - Lactado desidrogenase

LPSF - Laboratório de Síntese e Planejamento de Fármacos.

M - Mitose.

MCF-7 – Linhagem de adenocarcinoma mamário

Mcl-1 - Proteína de indução à diferenciação mieloide.

MEC - Matriz extracelular

MG - Imidazolidina

mg - miligrama

ml - mililitro

MLKL - Mixed Lineage Kinase Domain-Like

mM - milimolar

MTT - 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-Hbrometo de tetrazolium

Na+ - Ìons de Sòdio

NaCl – Cloreto de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

NGF - Fator de crescimento neuronal

NK - Células Natural Kiler

ON - Óxido nítrico

Noxa - Agonista de morte associado ao domínio BH3

Omi/HtrA2 - Protease de serina localizado na mitocôndria.

OMS - Organização Mundial de Saúde.

OVCAR3 – Linhagem de câncer de ovário humano

p - Significância estatística.

p15 - Proteína de 15 kDa.

p150 - Proteína de 150 kDa.

p16 - Proteína de 16 kDa.

p18 - Proteína de 18 kDa.

p19 - Proteína de 19 kDa.

p21 - Proteína de 21 kDa.

p27 - Proteína de 27 kDa.

p53 - Proteína de 53 kDa.

p57 - Proteína de 57 kDa.

p73 - Proteína de 73 kDa.

PBMC - Células mononucleares do sangue periférico.

PBS - Tampão Salino Fosfato.

PDB – Banco de Dados de Proteínas (do inglês: Protein Data Bank)

pH - potencial hidrogeniônico

PI - Iodeto de Propídeo (do inglês Propidiun Iodide)

PI3K III - Fosfatidilinositol 3-cinase de classe III

PPAR - Receptor Ativado por proliferadores de peroxissomos.

pRbE2F - Complexos proteico

pré-RC - Complexo pré-replicação

CKIs - Quinases inibidoras de ciclinas

r.p.m – Rotações por minuto

RIPA - Radio-Immunoprecipitation Assay

RIPK1 - Proteína Cinase de Interação com o Receptor 1 (do inglês Receptorinteracting serine/threonine-protein kinase 1)

RIPK3 - Proteína Cinase de Interação com o Receptor 3 (do inglês *Receptorinteracting serine/threonine-protein kinase 3*)

RNA - Ácido Ribonucléico (Ribonucleic Acid)

ROS - espécies oxidativas de oxigênio

rTNF - Receptor do fator de necrose tumoral.

S - Fase S do ciclo celular (síntese de DNA)

SDS – Dodessil Sulfato de Sódio

SiHa - Linhagem de câncer de colo de útero

SK-N-SH – Linhagem celular de neuroblastoma

SMAC/DIABLO - Segundo ativador de caspases derivado da mitocôndria.

SPF - phase promoting factor

SW480 – Linhagem de adenocarcinoma colorretal tipo B

TBS-T - Solução tamponada com Tris (inglês: mixture of tris-buffered saline*)*

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGF-β - Fator de Crescimento tumoral beta

Th1 – Célula linfócítica citotóxica tipo 1

Th2 - Célula linfócítica citotóxica tipo 2

TILs - Linfócitos infiltrantes de tumor

TNF - Fator de Necrose Tumoral

TNFR1 - Receptor 1 do fator de necrose tumoral.

U937 – Linhagem de leucemia monocítica

UV - Ultravioleta.

VEGF - Fator decrescimento do endotélio vascular humano

γ-GT - Fosfatase alcalina gama glutamil transferase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 26
2. OBJETIVO 28
2.1 OBJETIVO GERAL 28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 28
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 29
3.1 GENERALIDADES DO CÂNCER 29
3.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DO CÂNCER 30
3.3 PRINCÍPIOS BÁSICOS DA ONCOGÊNESE 33
3.4 CICLO CELULAR 36
3.5 MECANISMOS DE MORTE CELULAR 40
3.6 APOPTOSE 43
3.7 NECROPTOSE 45
3.8 MICROAMBIENTE TUMORAL E METÁSTASE 48
3.9 TERAPÊUTICA DO CÂNCER E SUAS ESTRATÉGIAS 50
3.10 IMIDAZOLIDINAS 52
3.11 DERIVADOS DE IMIDAZOLIDINAS COM ATIVIDADE ANTICÂNCER 54
3.12 ENSAIOS *IN SILICO* 58
4. METODOLOGIA 61
4.1 DERIVADO IMIDAZOLIDÍNICOS 61
4.1.1Síntese dos derivados de imidazolidina **61**
4.2 COMPOSTOS ESTUDADOS 61
4.3 ANÁLISE *IN SILICO* 63
4.3.1 In *silico* ADMET prediction 63
4.3.2 Molecular docking study 63
4.3.2.1 Preparação dos ligantes 63
4.3.2.2 Obtenção e preparação dos alvos 64
4.3.2.3 Docking molecular 64
4.4 LINHAGENS CELULARES 64
4.5 MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS 65
4.6 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEADAS DO SANGUE PERIFÉRICO 65
4.7 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS NEOPLÁSICAS, NÃO TUMORAIS E NORMAIS: MÉTODO MTT 66
4.8 ANÁLISE DO CICLO CELULAR 67

4.9 ANÁLISE DA INDUÇÃO DE MORTE CELULAR: APOPTOSE E NECROSE . 68
4.10 ENSAIO DE MIGRAÇÃO 68
4.11 ENSAIO DA INIBIÇÃO DE FORMAÇÃO DE CLONES 69
4.12 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE CDNA 69
4.13 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-QPCR 69
4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA 70
5. RESULTADOS 71
6. DISCUSSÃO 100
7. CONCLUSÃO 106
8. PERSPECTIVAS 107
REFERÊNCIAS 108
ANEXO 01 - PARECER COMITE DE ETICA HUMANO 127
ANEXO 02 – Artigo Publicado: Imidazolidine Derivates in Cancer Research: what is Know? 132

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma das maiores causas de mortes em todo o mundo (Taitt, 2018; Ferlay et al., 2021; Chhikara & Parang, 2023;), e também de maior índice de letalidade quando comparado aos demais tipos de doenças crônicas não transmissíveis. Segundo a Agencia Internacional de Pesquisas sobre o Câncer no ano de 2020 ocorreram 19.292.789 novos casos e os números de morte pela doença foi de 9.958.133, e as perspectivas para o ano de 2040 é que estes números aumentem ainda mais chegado a uma incidência maior que 28 milhões de casos e o número de mortes ultrapasse os 16 milhões (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2019; SUNG et al., 2021).

O câncer é uma doença de desenvolvimento heterogêneo, no qual o processo de transformação neoplásica das células de diferentes tipos ocorre em decorrência de fenômenos diversos (CULP et al., 2020a), onde por muitas vezes surge como processos neoplásicos localizados, seguindo-se para tumores mais desenvolvidos e que podem progredir para tumores invasivos, e que por conseguinte pode evoluir para casos de metástase, acometendo diversos sítios anatômicos, sendo em geral linfonodos e ossos os principais acometidos (PEISCH et al., 2017a; CULP et al., 2020b).

Os fatores de risco para o câncer são diversos e múltiplos, englobando desde hábitos alimentares, histórico familiar, fatores ambientais e idade até fatores genéticos e étnicos (FOWKE et al., 2015; PEISCH et al., 2017a; HA CHUNG; HORIE; CHIONG, 2019). Há relatos de que o consumo em excesso de proteínas ou cálcio derivado de alimentos lácteos pode contribuir para a promoção a doença. Consequentemente, mudança nos hábitos de vida e de alimentação, não uso de cigarro, podem reduzir os riscos ao desenvolvimento de tumores, assim como o consumo de vitaminas, isoflavonas, licopeno e selênio (Peisch et al., 2017b; Moreira et al., 2022;).

Atualmente as opções de tratamento do câncer depende de diversos fatores, como sítio anatômico do tumor, recidivas, resistência a tratamentos já executados, contudo incluem cirurgia, quimioterapia, radiação, hormônio e imunoterapia. Ainda assim, o principal abordagem terapêutica para pacientes com câncer é a quimioterapia sistêmica difusa usando agentes citostáticos e citotóxicos com maior seletividade, que induzem a apoptose e ou inibem a progressão do ciclo celular (DE BONO et al., 2020a; AHMAD; CHERUKURI; CHOYKE, 2021a). No entanto, a maioria dos quimioterápicos não atua exclusivamente nas células neoplásicas, o que pode acarretar inúmeros efeitos colaterais

sistêmicos de diferentes graus de toxicidade, dependendo de fatores como tempo de exposição a medicamentos, idade, estado físico do paciente. Logo, a necessidade de agentes anticâncer menos tóxicos e mais eficazes (ZAIDI et al., 2019a, 2019b; AHMAD; CHERUKURI; CHOYKE, 2021b).

Nesse contexto o planejamento e desenvolvimento de moléculas com atividade anticâncer com características como menor toxicidade e alta seletividade possuem necessidade urgente (WANG et al., 2020). A imidazolidina-2,4-diona, também chamada de hidantoína, é um núcleo farmacofórico com perfil versátil para aplicação na síntese de novas moléculas, as quais tem demonstrado na literatura possuir efeitos farmacodinâmicos excelentes com diversas aplicações terapêuticas: anticâncer, inibidores de COX-1/2 e outros (ABDEL-AZIZ et al., 2015; MOSTAFA et al., 2016a).

Estudos com derivados da fenitoína (5,5-difenilimidazolidina-2,4-diona) apresentaram resultados interessantes com efeito anticâncer em diversas linhagens tumorais, onde o mecanismo de ação evidenciado foi a inativação do receptor quinase do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (ALKAHTANI et al., 2019a). Outro estudo com a linhagem de câncer de pulmão (A549) foi observado efeito anticâncer para molécula de imidazolidina-2,4-diona, com ação de inibição da autofosforilação do EGFR (MOSTAFA et al., 2016b; ALKAHTANI et al., 2019b, 2019c).

Neste contexto, o objetivo desta pesquisa se pautou em estudar a atividade anticâncer de novos derivados imidazolidínicos, bem como contribuir para um melhor entendimento de seu mecanismo de ação.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade anticâncer de novos derivados imidazolidínicos e compreender os seus possíveis mecanismos de ação.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar as propriedades físico-químicas, farmacodinâmica e de interação ligante-receptor dos derivados imidazolidínicos por métodos *in silico*;
- Avaliação da citotoxicidade dos derivados imidazolidínicos frente células normais (PBMCs) e diferentes linhagens de células neoplásicas;
- Investigar o efeito dos derivados imidazolidínicos no ciclo celular e possíveis efeitos de indução de morte celular;
- Analisar o potencial dos derivados imidazolidínicos na inibição do efeito migratório e efeito clonogênico de linhagens tumorais;
- Investigar possíveis alvos moleculares de vias de morte de linhagens tumorais após tratamento com derivados imidazolidínicos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Generalidades do câncer

A palavra câncer foi mencionada pela primeira vez por Hipócrates, conhecido como o pai da medicina, termo originário do grego *karkinos*, que significa caranguejo, este inclusive símbolo da luta contra o câncer em diversos serviços de saúde até hoje. Tal comparação se dá pela característica das células do câncer se organizarem em tumores e estes se espalharem de forma desorganizada, comparado a um caranguejo (INCA, 2017).

O câncer se caracteriza por diversas alterações que afetam a matriz da vida (a célula) em diferentes níveis, desde a alteração molecular até a tecidual, alterações estas que representam um conjunto de mais de 200 doenças, com capacidade de alterar as células ditas como normais e seu processo de multiplicação (SIERRA et al., 2016). As células formam os tecidos do corpo humano, estes que por sua vez precisam estar em constante renovação, de acordo com o ciclo e morte celular. Quando as células sofrem processos de alterações em seu material genético se tornam células mutadas, conhecidas também como células neoplásicas (SIGMAN; MAZUMDER; PERRIN, 1993).

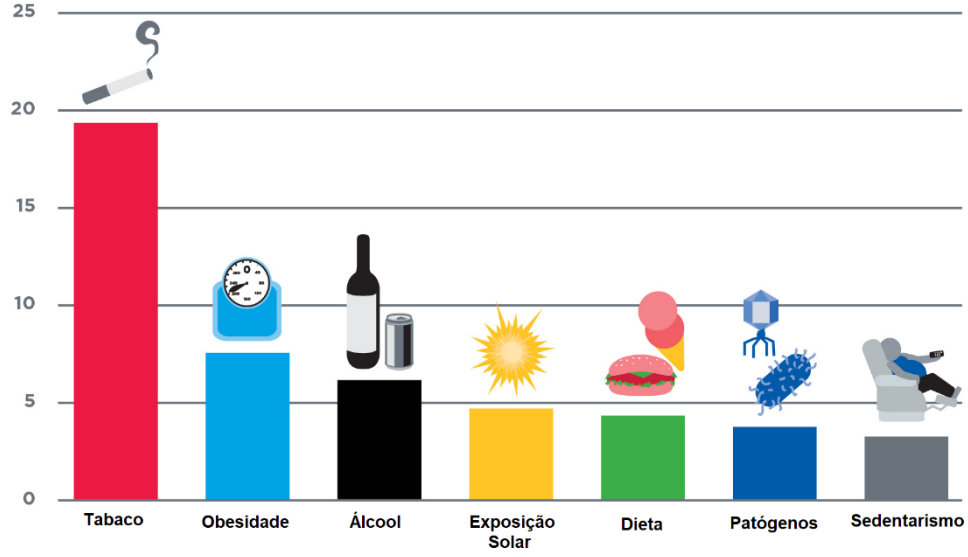
O termo “neo” da palavra neoplasia refere-se a algo novo e diferente, relacionado a capacidade das novas células não responderem mais a controles como ao tempo correto de morte ou tempo de replicação celular, uma vez que, estas novas células estão programadas para não morrer e se multiplicar de modo rápido comparado as demais (GUTSCHNER; DIEDERICHS, 2012). Porém, a formação de novas células pode ocorrer em decorrência de alguns estímulos ambientais ou fisiológicos, os quais podem ser ditos como benigno, que não causa danos ao indivíduo, ou maligno, no qual pode evoluir para o desenvolvimento de um tumor o qual compromete a função das células (GIROD et al., 1973); (LIANG et al., 2019).

Os fatores ambientais ou fisiológicos, são conhecidos também como fatores de risco, estes de modo geral são categorizados em três grupos principais: fatores ambientais ou externos (relacionados ao ambiente ao qual o indivíduo é exposto, seja onde habita ou trabalha), pré-disposição (fatores genéticos hereditários) e a combinação de ambos (WALDUM; SAGATUN; MJØNES, 2017).

Aprofundando-se um pouco mais, pode-se caracterizar os fatores externos como o ambiente ocupacional (serviços, comércio, indústrias e afins), o ambiente social e cultural (relacionados ao consumo de álcool, tabagismo, hábitos sexuais), o ambiente de

consumo de tipo de alimentação e medicamentos, fator este último bastante influenciado pelo acelerar da vida moderna, como pode ser observado na Figura 1. Além destes a poluição provocada pelo próprio homem e o estilo de vida podem potencializar o desenvolvimento de diversos tipos de câncer (CAZACU et al., 2018; PEDERSINI et al., 2021).

Figura 1 - Fatores de riscos associados ao desenvolvimento de câncer no Brasil e no Mundo.



Fonte: Adaptado de AACR, 2019.

Os casos de câncer relacionados a fatores genéticos, familiares e étnicos são raros, embora alterações genéticas podem contribuir processos oncogênicos. Contudo, fatores ambientais e hereditários podem atuar de forma associada, por exemplo, mutações genéticas com efeitos de tonar possível a tolerância a agressões externas (GREENLEE et al., 2021a; PEDERSINI et al., 2021).

Outra característica importante das células tumorais é a capacidade de migrar para outros sítios anatômicos e ocasionar metástases, esse fenômeno é caracterizado pelo fato de células precursoras se deslocarem de seu sítio de origem, e invadirem tecidos vizinhos e órgãos onde as células tumorais podem obter sucesso na criação de novas colônias de células tumorais; os processos de metástases correspondem a 90% dos casos de morte por câncer em humanos em todo o mundo(GREENLEE et al., 2021a; INCA, 2021).

3.2 Aspectos epidemiológicos do câncer

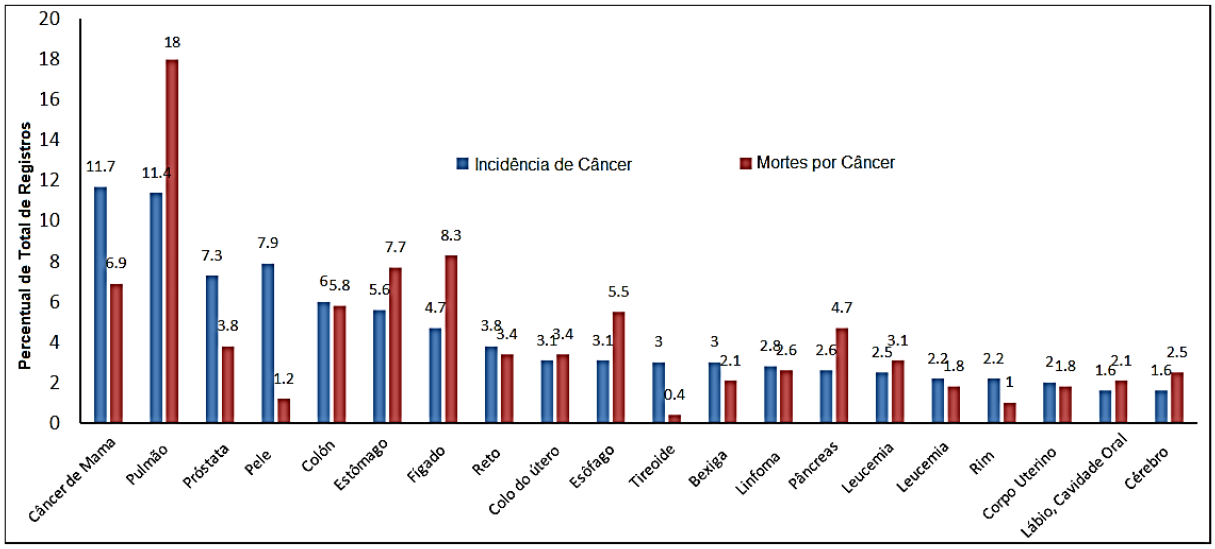
O mundo como um todo tem sofrido bastante com o número crescente de doenças infectocontagiosas, contudo estas em sua maioria podem ter seus números de casos controlados através de ações de prevenção e tratamento das mesmas, e assim o número

de casos pode ser mitigado (BEZERRA et al., 2020). Por sua vez, as doenças crônicas não transmissíveis, como o câncer, são um problema de saúde pública recorrente de impacto global, principalmente em países com rendas consideradas baixas e médias e que mesmo com a descoberta de novas terapias, o número crescente de casos persiste (Sung et al., 2021)

Segundo o GLOBOCAN (2020), observatório que monitora estudos sobre câncer em mais de 180 países no mundo, todos os países têm sido sobrecarregados pelo crescente número de casos de câncer e as mortes decorrentes dessa doença. A nível mundial estimou-se para o ano de 2022 uma incidência de 19,3 milhões de casos de câncer em todo mundo e 10 milhões de mortes por câncer (FERLAY et al., 2021).

A incidência de câncer no mundo no ano de 2022, distribuída por valor total comumente diagnosticado foi: mama (2,26 milhões de casos, 11,7%), pulmão (2,21 milhões, 11,4%) e câncer de próstata (1,41 milhão, 7,3%). No que se refere aos índices de mortalidade por câncer, os principais tipos foram pulmão (1,79 milhão de mortes, 18% do total de mortes por câncer), fígado (830.000, 8,3%), estômago (769.000, ~7,7%) e câncer de mama (680.000, 6,9%), de acordo com o que é apresentado na figura 2 (CHHIKARA; PARANG, 2023).

Figura 2 - Distribuição relativa total de incidências e mortes por câncer no mundo por sítio anatômico.



Fonte: Adaptado Chhikara; Parang, 2023.

Ainda referente a dados mundiais, em análise por sexo referente a incidência de casos e números de mortes, os tipos de câncer mais comuns detectados nos homens são: câncer de pulmão (14,3%), próstata (14,1%), pele não melanoma (7,2%) e estômago (7,1%); e nas mulheres são: mama (24,5%), pulmão (8,4%) e colo do útero (6,5%). No tocante a mortalidade, para os homens o câncer de pulmão aparece em primeiro lugar (21,5%), seguido pelo câncer de fígado (10,4%) e estômago (9,1%), enquanto nas mulheres a maior mortalidade foi por câncer de mama (15,5%), pulmão (13,7%) e câncer do colo do útero (7,7%) (FERLAY et al., 2021; CHHIKARA; PARANG, 2023).

No Brasil, no período do biênio de 2020-2022 foi estimado 625 mil novos casos de câncer, com descrito na Figura 3, que apresenta os principais tipos de cânceres mais incidentes de acordo com o gênero, com exceção do câncer de pele não melanoma, Logo os tipos de câncer mais incidentes entre os homens no Brasil são: câncer de próstata, pulmão, cólon e reto, estômago, cavidade oral, esôfago, laringe, bexiga e leucemias; Nas mulheres, por sua vez, são: mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão, tireoide, estômago, corpo do útero, ovário, Sistema Nervoso Central e leucemias (INCA, 2019).

Figura 3 - Distribuição proporcional dos tipos de neoplasias com maiores taxa de incidência no Brasil estimados para 2020-2022, por sexo, exceto pele não melanoma.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens	Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia,brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA, 2019

É importante destacar que há variações regionais na distribuição de incidência de casos de câncer no Brasil: as regiões Sul e Sudeste concentram mais de 60% da ocorrência de novos casos, seguidos pela Região Nordeste que concentra 22% dos casos de câncer. Os números da incidência de casos da região Nordeste seguem a tendência Nacional, porém é importante ressaltar que é na região nordeste que estão os maiores índices de

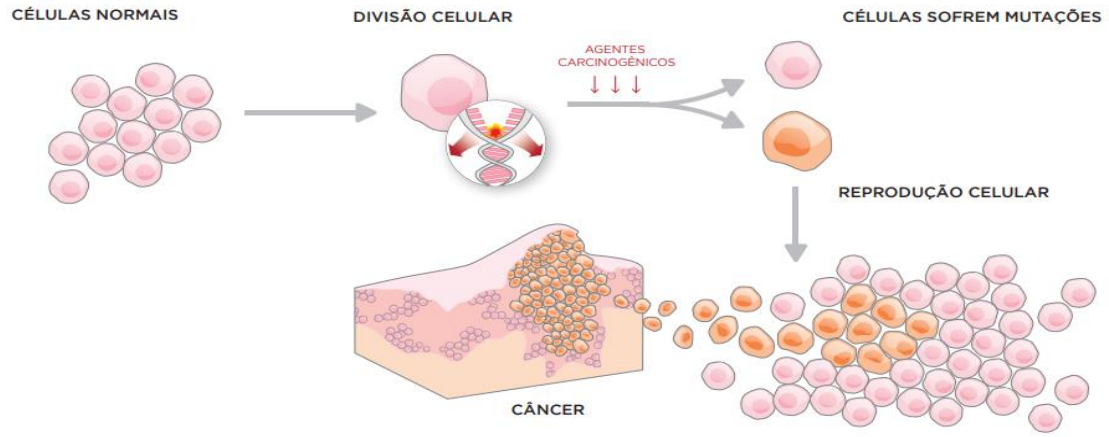
câncer de próstata e mama, quando comparado com as demais regiões do Brasil (INCA, 2019).

3.3 Princípios básicos da oncogênese

O câncer é um termo geral utilizado para definir um grupo de doenças diversas que apresentam características em comum, dentre estas pode-se ressaltar o crescimento de células transformadas de maneira descontrolada, fenômeno muitas vezes provocado por alterações genéticas que corroboram para o desenvolvimento de neoplasias (DICK, 2008; INCA, 2019). O termo neoplasia é utilizado como denominação de proliferação anormal de tecidos, o qual deixa de ser regulado pelo próprio organismo de maneira parcial ou totalmente, logo desenvolvendo autonomia fisiológica e de multiplicação (LÚCIA DE ALMEIDA et al., 2005).

Os tumores são neoplasias que podem ser leucêmicos ou sólidos, estes últimos podem ser classificados como neoplasias benignas, ou seja, crescem de maneira organizada, lenta, com limites bem delimitados, permanecendo no sítio de origem, enquanto, as neoplasias ditas malignas, também denominados de carcinomas, geralmente apresentam elevado grau de autonomia, alta capacidade de invadir tecidos vizinhos e provocar metástases (BAJAJ; DIAZ; REYA, 2020; RINDI; INZANI, 2020). O processo de transformação de uma célula hígida em uma célula tumoral é lento e ocorre conhecidamente em três etapas, definidas como: iniciação, promoção e progressão; as quais em conjunto são definidas como oncogênese, tumorigênese ou carcinogênese (Figura 4) (DICK, 2008; INCA, 2019).

Figura 4 – Processo de progressão tumorgênico.



Fonte: Adaptado INCA, 2019.

Na primeira etapa, iniciação, as células sofrem o efeito de algum agente carcinogênico, muitas vezes um agente oncoiniciador, o qual pode ser de origem física, química ou biológica (SABARWAL; KUMAR; SINGH, 2018). As principais fontes de agentes físicos são a radiação ultravioleta (UV) e os raios-x, os quais estão relacionados a um grande número de alterações a nível do DNA, alterações estas que permanecem após a divisão celular, podendo deste modo afetar oncogenes e/ou genes supressores de tumor (GEORGE; CHANDRAN; ABRAHAMSE, 2021).

São vários os agentes químicos capazes de condicionar células saudáveis a uma condição neoplásica. Dentre eles, pode-se destacar, por exemplo, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, que são substâncias com maior caráter cancerígeno (DICK, 2008; DOWLATH et al., 2021). Há agentes químicos com ação iniciadora direta, capaz de causar lesão celular e outras que atuam de forma indireta promovendo a desregulação da proliferação celular. De modo semelhante, agentes carcinogênicos de caráter biológico, como parasitas e bactérias e muitos tipos de vírus, estão relacionados ao surgimento de neoplasias (SHALAPOUR; KARIN, 2015, DOWLATH et al., 2021; GRETEN; GRIVENNIKOV, 2019).

A exemplo de agentes biológicos, o vírus papiloma vírus humano (HPV) e o Epstein Barr, possuem ciclo de replicação específico que pode culminar na proliferação das células hospedeiras de forma forçada e desregulada, o que pode deste modo contribuir para promoção oncogênica (SCHÜZ et al., 2015; SHALAPOUR; KARIN, 2015). De modo geral, apenas uma alteração no DNA, seja físico, químico ou biológico não é suficiente para que uma determinada célula torne-se maligna e agressiva ao organismo (GRETEN; GRIVENNIKOV, 2019).

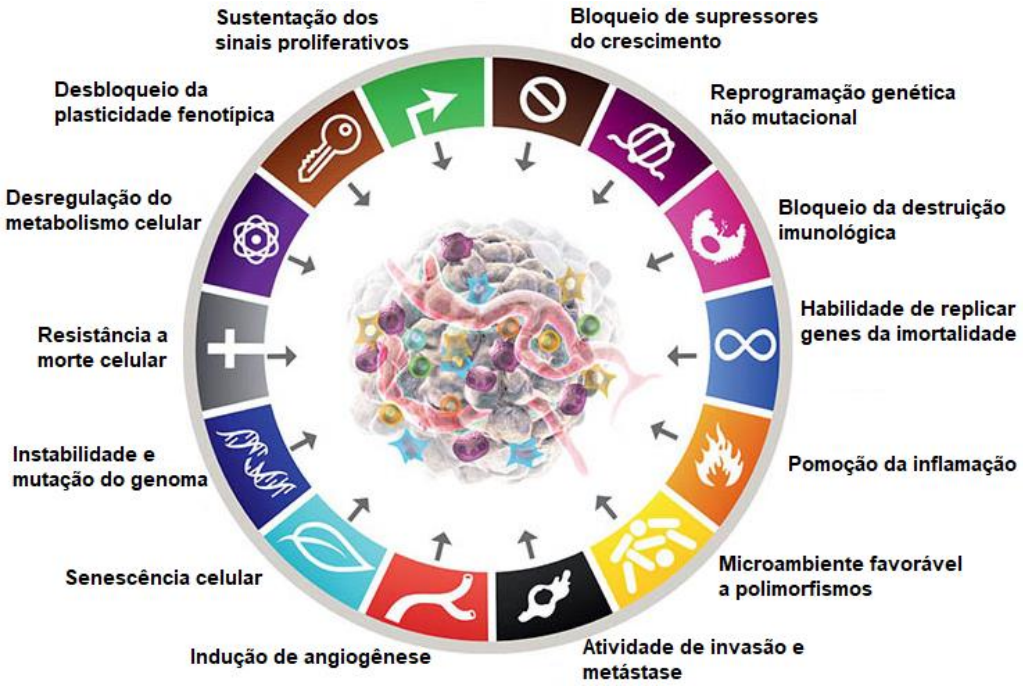
A etapa de promoção representa o estágio de crescimento tissular, levando a formação do tumor, onde células alteradas sofrem os efeitos de agentes promotores ou oncopromotores (SHALAPOUR; KARIN, 2015; DOWLATH et al., 2021). O processo de malignidade iniciado na célula ocorre de forma lenta e gradativa, nesse período o contato continuo com o agente oncopromotor é necessário (CHEN; DESMARAIS; COSTA, 2019). A forma como cada agente atua é variada, pois depende do tipo de agente, estímulo a síntese de DNA, aumento da quantidade de cópias de genes em particular e alterações na comunicação intercelular (DE BONO et al., 2020b).

Moléculas como hormônios, peptídeos conhecidos como fatores de crescimento, por exemplo, o fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento neuronal (NGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), e outras substâncias como a nicotina e o álcool podem atuar como promotores oncogênicos (BAJAJ; DIAZ; REYA, 2020; DE BONO et al., 2020b). A interrupção do contato dos promotores tumorais e as células iniciadas, de modo geral, suspende o processo neste estágio, logo sendo considerado um processo dose-dependente e reversível (DICK, 2008, BAJAJ; DIAZ; REYA, 2020;).

Hanahan e Weinberg (2000) propuseram o conjunto de seis características fenotípicas e genotípicas comuns e necessárias para a transformação de células normais e neoplásicas, características estas importantes na evolução e progressão do câncer, sendo elas: sinalização proliferativa, fuga dos supressores tumorais, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, estímulo a angiogênese e capacidade de invadir tecidos e promover metástases. Essas características são comuns a maioria dos tumores humanos, mas, posteriormente, foram ditas como dependentes da manutenção de quatro habilidades: evasão do sistema imune, instabilidade genômica, manutenção da inflamação e desregulação do metabolismo energético, habilidades estas que foram propostas por Hanahan e Weinberg (2011).

Além das características e habilidades mencionadas, no ano de 2022 foram acrescidos na literatura novas características, como senescência celular, desbloqueio de plasticidade fenotípica, reprogramação genética não mutacional e microambiente favorável a polimorfismos. Tais características acrescidas são importantes por considerar o microambiente tumoral, o qual é formado por células tumorais e células não transformadas de acordo com a figura 5 (HANAHAN; WEINBERG, 2011; HANAHAN; WEINBER, 2000; HANAHAN, 2022).

Figura 5 – Marco das principais características do câncer apresentadas por células transformadas



Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2022.

Como já descrito, o processo de transformação inicia-se com a atividade de agentes carcinogênicos que possam interagir com os receptores celulares e iniciar um conjunto de reações que culminem em mutações e/ou deleções das informações gênicas, relacionados por gerir processos celulares vitais, incluindo as ligadas à proliferação e apoptose (HANAHAN; WEINBERG, 2011; MOSES et al., 2018). Deste modo, alterações em genes responsáveis pela indução de proliferação celular, denominados protooncogenes, como reguladores de ciclo celular e genes supressores tumorais, podem levar a desregulação do ciclo e permitir a multiplicação descontrolada. As mutações ocorrendo em protooncogenes, faz com que estes se tornem oncogenes e acabem por superexpressar proteínas que estimulam o ciclo celular (CHEN; DESMARAIS; COSTA, 2019; DE BONO et al., 2020b).

3.4 Ciclo celular

O ciclo celular corresponde a um complexo processo necessário para a formação de uma célula e até a multiplicação desta, ou seja, o processo no qual uma célula diploide (2n) dá origem a outras duas semelhantes (Aravena & P, 2019). Nas células eucariontes o ciclo celular é organizado em três grandes momentos: a interfase, que corresponde ao intervalo entre duas divisões sucessivas, a mitose e a citocinese, que correspondem as

divisões do núcleo e do citoplasma, respectivamente (Mills et al., 2018; Panagopoulos & Altmeyer, 2021).

A interfase é um momento complexo, logo dividido em três fazes: a) G1, fase marcada pelo aumento intenso da síntese de RNA e de proteínas necessárias a fase seguinte, chamada fase S; b) a fase S, também conhecida como fase de síntese, é o período de replicação do DNA; c) a fase G2, por sua vez, é onde ocorre a síntese de novas proteínas que serão necessárias para a divisão celular (SIGMAN; MAZUMDER; PERRIN, 1993, DELGADO et al., 2018; PANAGOPOULOS; ALTMEYER, 2021).

Alguns tipos celulares não seguem esta sequência na ordem descrita acima, logo a fase G1 pode não ocorrer antes da fase S, e então a célula é encaminhada a fase G0, podendo ainda estacionar nesta fase por longos períodos e deste modo dificilmente sofrerá divisão. No término da interfase as células irão possuir o dobro de DNA que apresentaram no início da fase G1 e a mitose (fase M) estará prestes a se iniciar. Esta fase será subdividida em prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase, estando cada uma destas subdivisões relacionada a eventos celulares específicos (SIGMAN; MAZUMDER; PERRIN, 1993; PANAGOPOULOS; ALTMEYER, 2021;).

O desenvolvimento do ciclo celular é coordenado por estímulos externos, os quais ativam mecanismos regulatórios internos e induzem o início do ciclo. No entanto, antes da célula avançar de uma fase a outra do ciclo, a célula passará por uma série de inspeções em pontos específicos conhecidos como pontos de restrição ou "*checkpoints*" (NEPOMUCENO et al., 2017). Dentre esses *checkpoints* pode-se destacar a proteção do material genético da célula, bem como a prevenção do acúmulo de erros nos seus genes durante o processo de divisão celular (BURGER, 1998; DE ALMEIDA et al., 2017).

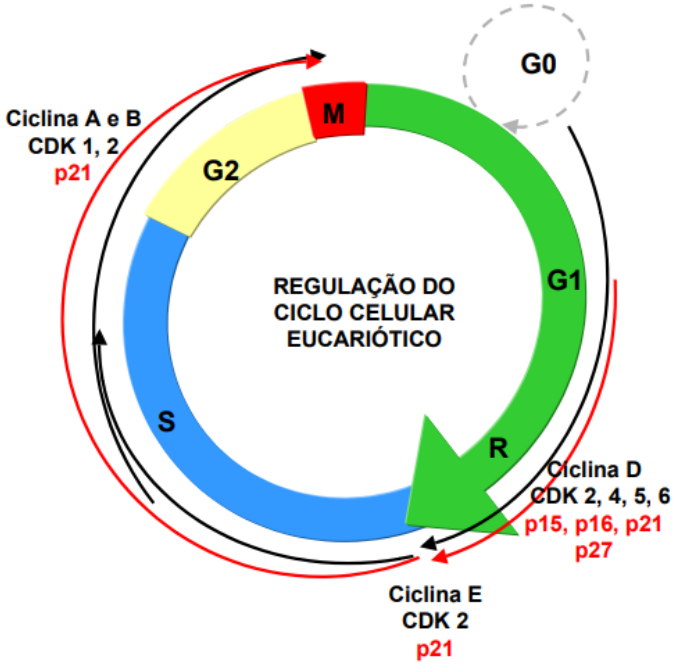
São vários os fatores extrínsecos que irão influenciar na progressão do ciclo celular, tais como fatores de crescimento que podem se acoplar a receptores específicos e ativar cascatas de sinalização, as quais irão resultar na formação de complexos constituídos por proteínas chamadas de ciclinas e quinases dependentes de ciclinas (CDKs), as quais podem ainda ser do tipo 1 (CDK1) ou 2 (CDK2) (NEPOMUCENO et al., 2017; Panagopoulos & Altmeyer, 2021). Estes complexos podem, através de reações de fosforilação, ativar outros complexos proteicos denominados pRbE2F, o que acarretará na liberação do fator E2F, o qual irá atuar no progresso do ciclo celular (ciclina E/CDK2)

para permitir a passagem da célula da fase G1 para a fase S (PIAZZA MJ; URBANETZ; CARVALHO NS, 2010).

Nesta última, a ação da ciclina A em conjunto com a CDK2 irá promover a formação do fator de promoção de fase S, conhecido no inglês como “phase promoting factor" (SPF). Em sequência, o SPF irá atuar através do complexo pré-replicação (pré-RC), o qual irá iniciar a ativação de moléculas responsáveis pela replicação do DNA. Por seguinte, o fator promotor da fase M, já no término da fase G2 (ciclina/CDK1), irá promover a sequência do ciclo no sentido da fase M (DAVID LOMANTO DÍAZ et al., 2003; NEPOMUCENO et al., 2017).

Diferentemente da promoção do ciclo celular que está relacionada a complexos ciclinas-CDKs, a inibição da evolução do ciclo é realizada por um grupo de proteínas denominado de inibidores de quinases dependentes de ciclinas (CKIs) (Figura 6) (GOEL et al., 2018). Este segmento de proteínas pode intervir em possíveis falhas no processo de divisão da célula, como por exemplo, aqueles ocasionados por danos ao DNA, mediando a parada do ciclo, reparo do material genético e até mesmo a morte da célula. As CKIs são classificadas em dois grupos, o grupo das proteínas específicas, como a p15, p16, p18 e p19, que atuam em CDKs pré-estabelecidas. Por sua vez, as CKIs ditas como inespecíficas atuam em diversos complexos ciclina-quinases, sendo as mais conhecidas a p21, p27, p53 e p57 (GOEL et al., 2016; DING et al., 2020).

Figura 6 – Fases do ciclo celular e a interferência das quinases dependentes de ciclinas (CDKs).



CDK – Ciclinas dependentes de quinases tipo 1 (CDK1) e tipo 2 (CDK2); p – Proteínas inibidoras de ciclinas dependentes de quinases, tipo 15 (p15), tipo 16 (p16), tipo 21 (p21) e tipo 27 (p27).

Fonte: Adaptado de Forti, 2001.

A CKI mais estudada é a p53, proteína que tem como função a busca de danos ao DNA durante o ciclo celular. Quando danos são identificados, essa proteína pode interromper o ciclo celular no intuito de promover o reparo do material genético ou iniciar um processo morte celular. A p53 interage também com outras proteínas do mesmo grupo, como a p21, p73, Bax e Bcl-2, em diferentes vias de sinalização, principalmente aquelas relacionadas a parada do ciclo celular (ARAVENA; P, 2019; GOEL et al., 2016).

Alterações no gene que codifica a proteína p53 são bastante relatados na literatura como relacionados a neoplasias malignas, logo, a presença de mutações da p53 em células, plasma ou material de origem tecidual pode indicar sinais de mau prognóstico para pacientes, pois demonstra desequilíbrio no processo de controle regular do ciclo celular (GOEL et al., 2016; HANAHAN, 2022; PIAZZA MJ; URBANETZ; CARVALHO NS, 2010).

Em condições comuns, se ocorrer alguma alteração no material genético ou no ciclo como um todo, a evolução do ciclo celular é interrompida até que seja realizado o

reparo devido e o ciclo possa ser retomado, caso contrário, são ativadas vias de sinalização para a indução da morte celular por apoptose (DE ALMEIDA et al., 2017; GOEL et al., 2016; NEPOMUCENO et al., 2017). Deste modo pesquisas científicas veem o ciclo celular como um importante alvo para o desenvolvimento de novas terapias anticâncer. Muitos dos agentes quimioterápicos utilizados em tratamentos clínicos apresentam como mecanismo de ação a interferência no ciclo celular, como por exemplo, gemcitabina, paclitaxel, doxorrubicina, citarabina, entre outros (BOUMAHDI; DE SAUVAGE, 2020; LÚCIA DE ALMEIDA et al., 2005).

3.5 Mecanismos de morte celular

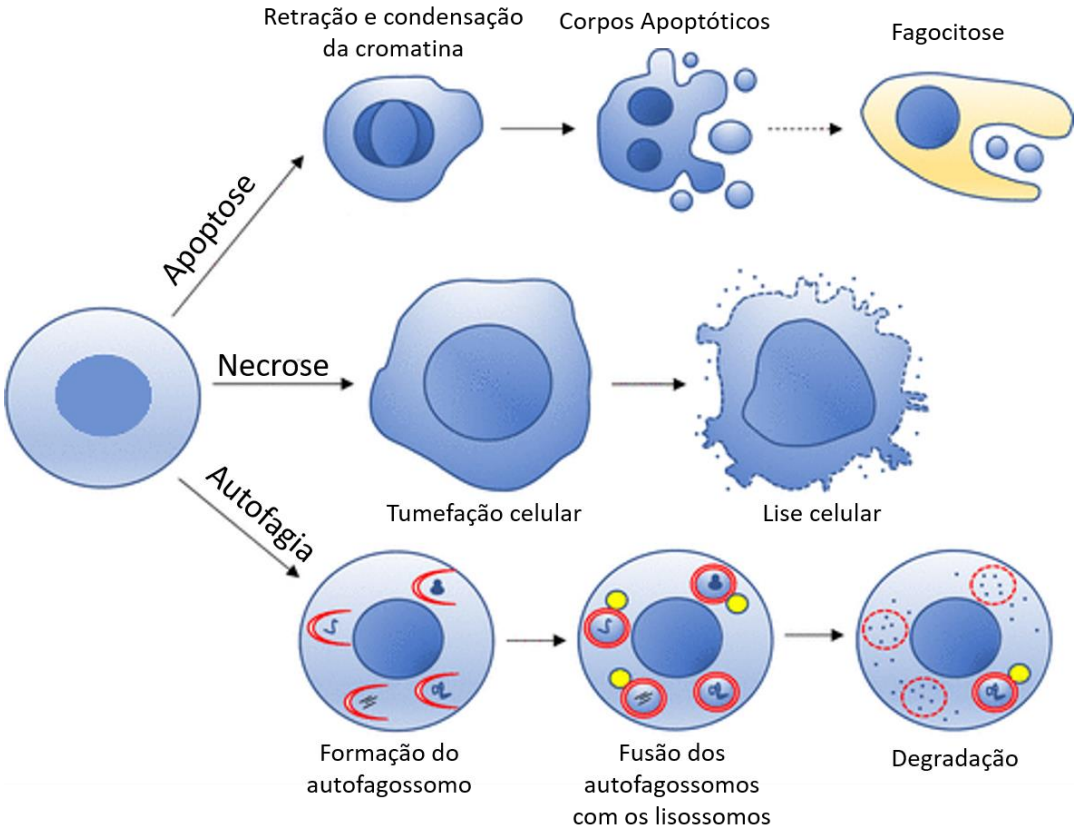
A morte celular, em especial a apoptose é um processo complexo e que norteia as informações mais importantes sobre as vias de proliferação celular desordenada, logo compreender a apoptose, outros tipos de morte e seus mecanismos nas condições fisiológicas e patológicas, é de grande importância, pois além de ser possível compreender como se dá processos patológicos é possível também compreender quais alvos podem ser melhor investigados como alvos terapêuticos (SUVARNA; SINGH; MURAHARI, 2019; TETTAMANTI; CASARTELLI, 2019).

Há diversos tipos de mortes, de acordo com o mecanismo como ocorrem, mas de modo geral pode-se classificar a morte celular como acidental ou regulada. A morte regulada necessita de complexas vias moleculares nas quais ocorre diversos fenômenos de ativação e desativação de moléculas biológicas, vias estas que podem ser moduladas e são passíveis de interferência genética ou farmacológica (ANIFOWOSE et al., 2020).

Um dos tipos de morte celular regulada bastante conhecida é a apoptose, o qual é definido como uma morte programada. Outros tipos de morte são consideradas não programadas, tais como: a) Ferroptose: seu mecanismo é iniciado por agressões oxidativas do microambiente intracelular, o qual é regulado constitutivamente pela enzima antioxidante glutationa peroxidase 4, esta que pode ser inibida por agentes quelantes de ferro e antioxidantes lipofílicos; b) Piroptose: processo que envolve obrigatoriamente a formação de poros na membrana plasmática por membros da família das proteínas de gasderminas, que ao serem ativadas por muitas vezes podem levar a ativação também de caspases inflamatória como a caspase 1; c) necroptose que consiste em um processo de morte celular inflamatório regulado, o qual será aprofundado mais a frente (GALLUZZI et al., 2018; LIU; JIAO, 2020).

Além das classificações descritas acima, podem se tomar como critério as alterações morfológicas sofridas pelas células e assim as mortes podem ser definidas por apoptose, por autofagia ou por necrose (Figura 7) (GALLUZZI et al., 2018; BERTHELOOT; LATZ; FRANKLIN, 2021; KIST; VUCIC, 2021).

Figura 7 – Vias de morte celular: necrose, apoptose e autofagia



Fonte: Adaptado de Carella et al., 2015.

A apoptose é uma morte programada e silenciosa, a qual é mediada por caspases de características anti-inflamatórias. Esse mecanismo de morte pode ocorrer por duas vias principais, a via extrínseca, que está relacionada a ativação de receptores de membrana, e a intrínseca, que ocorre a nível de mediadores mitocondriais. Além destas principais, há uma outra via conhecida como via das perforinas ou granzima, a qual envolve a mediação de células T citotóxicas e a morte celular necessita de perforina-granzima (CARELLA et al., 2015). Cada via ativa sua caspase de iniciação específica, sendo na via extrínseca ativada a caspase 8, na via intrínseca a caspase 9 e na via da perforina/granzima é ativada a caspase 10, caspases essas que ativarão posteriormente a caspase executora 3 (TUMMERS; GREEN, 2017; TANG et al., 2019). Independente da via que ocorra, há a

presença de características celulares incomuns, como manutenção da integridade de membrana, protusões de membrana, picnose, clivagem internucleossomal do DNA e redução do tamanho celular e nuclear. Tardiamente pode ocorrer a formação de corpos apoptóticos (GALLUZZI et al., 2015a; TUMMERS; GREEN, 2017).

A autofagia, compreende um processo de degradação de seu próprio material citoplasmático, logo esse mecanismo de morte se caracteriza pela produção de vacúolos em grande quantidade e degradação do conteúdo citoplasmático, sendo esse processo corresponde a uma resposta de tentativa de sobrevivência da própria célula. Quando a autofagia ocorre de maneira desregulada, a mesma pode progredir a patologias (GENIN et al., 2015; TETTAMANTI; CASARTELLI, 2019). A regulação molecular da autofagia ocorre por ativação dos genes Atg e envolve moléculas como a PI3K III (fosfatidilinositol 3-cinase de classe III; também chamada Vps34), beclina 1 (mAtg6), p150 (subunidade reguladora da Vps34) (COOPER, 2018) e mAtg14L, entre outras (JOVANOVIĆ GALOVIĆ et al., 2022).

A necrose, em linhas gerais, é mencionada como um tipo de morte inespecífica, que pode atingir grupos de células e evoluir para extensão do tecido histológico ou até mesmo do órgão inteiro. Na necrose a morte é iniciada através de vias de déficit energético, os quais podem ocorrer por obstrução vascular, inibição de processos respiratórios, geração de radicais livres e agressão direta a membrana celular. Do ponto de vista morfológico as células em processo de necrose apresentam aumento do volume celular, vacuolização citoplasmática, lise da membrana celular, lise de organelas como mitocôndria e lisossomos e condensação da cromatina citoplasmática (GALLUZZI et al., 2015b; YAN; ELBADAWI; EFFERTH, 2020).

O processo de necrose foi por muitas vezes associado a respostas inflamatórias, pelo fato de haver liberação de material intracelular para o espaço da matriz extracelular, o que pode alterar as condições fisiológicas e levar a morte de células saudáveis, logo todo esse processo era mencionado como desregulado e acidental. Porém, foi cientificamente comprovado que este processo pode ocorrer de maneira regulada, sendo descrita como a via da necroptose por Degterev (2005), o qual a definiu como uma via com características pró-inflamatórias que pode ser ativadas por diversos receptores e estímulos de maneira regulada (DEGTEREV et al., 2005; KHAN et al., 2021; JOVANOVIĆ GALOVIĆ et al., 2022).

3.6 Apoptose

O processo de apoptose é realizado através de uma complexa e delicada cascata de proteínas reguladas por distintos sinais de vias de indução da morte(Bajaj et al., 2020; Elmore, 2007). Como já citado anteriormente, a apoptose pode ser ativada por duas vias distintas, a via intrínseca (ou via mitocondrial) e a via extrínseca (ou via do receptor de morte). Embora estas sejam iniciadas e ocorram em locais distintos, ambas convergem em uma mesma causa final, a morte da célula. Além disso, é importante ressaltar que proteínas de uma via de sinalização podem influenciar no funcionamento da outra (GALLUZZI et al., 2018).

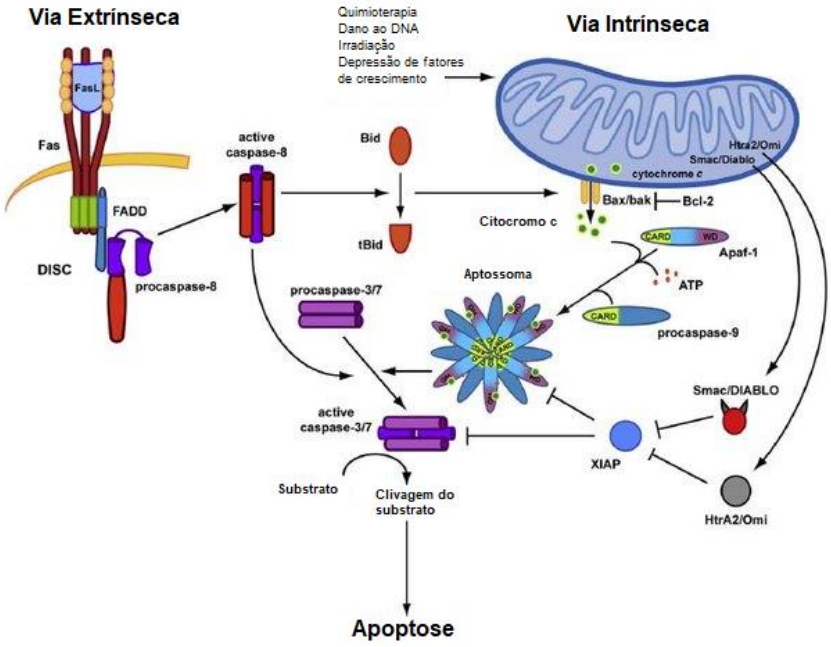
As caspases são as principais proteínas envolvidas na regulação da via de morte, atuando como enzimas proteolíticas que apresentam em seu sítio catalítico a cisteína, esta última que é capaz de fragmentar proteínas a resíduos menores. Geralmente as caspases são inicialmente sintetizadas na forma de pró-caspases, de caráter monomérico e inativas, sendo consideradas ativas após sofrerem dimerização e clivagem por outras caspases ou enzimas correspondentes. As caspases reguladoras da morte celular podem ser organizadas em dois grupos principais: as iniciadoras, que corresponde as caspases 2, 8, 9 e 10, agem na forma de pró-caspases inativas de efetoras e quando ativas irão atuar de acordo com sua especialidade; e as efetoras, que são as caspases 3, 6 e 7, são responsáveis por clivar outros substratos protéicos da célula resultando no processo apoptótico (Carneiro & El-Deiry, 2020; Negi & Murphy, 2021; Tummers & Green, 2017).

A via do receptor de morte (via extrínseca) é iniciada por ligantes específicos de grupos de receptores de membrana, pertencente a grande família de receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF), entre eles, destacam-se o receptor de antígeno de apoptose – 1 (Fas), o TNFR1 e os receptores de morte 3,4 e 5 (DR-3, -4 e -5). Os receptores possuem um subdomínio extracelular, característica que lhes possibilita reconhecerem seus ligantes, tais como TNF, Fas-L, Apo3L e Apo2L (CHAUDHRY et al., 2019; RAJABI et al., 2021).

A região de “domínio de morte”, assim denominada por corresponder a região onde o receptor reconhece e se liga ao seu ligante específico, pode interagir com moléculas adaptadoras, como a FADD (Fas-Associated Death Domain Protein), que são capazes de recrutar a pró-caspase 8 e em seguida se autodimerizar, assim tornando-se ativa e capaz de clivar as pró-caspases 3, 6 e 7. Essa sequência de eventos fará com que as caspases 3, 6 e 7, agora ativas, atuem em substratos celulares e promovam a apoptose

(CARNEIRO; EL-DEIRY, 2020; ELMORE, 2007; PATRA et al., 2019; QUIJANO; VELÁSQUEZ, 2016) (Figura 8).

Figura 8 – Representação das cascatas das vias intrínseca e extrínseca da apoptose.



Fonte: Adaptado de Quijano; Velásquez, 2016.

A via mitocondrial ou intrínseca de indução de morte por apoptose normalmente é iniciada pela desregulação homeostática provocada por estresses celulares, por exemplo, redução ou indisponibilidade de fatores de crescimento, formação de espécies oxidativas de oxigênio (ROS), hipóxia, variação bruscas de temperatura ou pH do microambiente, danos ao DNA, e outros. Logo, sinais gerados como *feedback* a essas alterações são direcionados as mitocôndrias e consequentemente irá provocar alterações no interior da célula, como a perda do potencial de membrana mitocondrial, o que leva ao aumento da sua permeabilidade e, por conseguinte, promove a liberação de moléculas pró apoptóticas para o citosol (LIU et al., 2018; MORRISH; BRUMATTI; SILKE, 2020).

No momento em que as proteínas pró-apoptóticas formadas pelo citocromo-c, Smac/DIABLO e a Omi/HtrA2 alcançam o citosol, estas moléculas irão seguir caminhos distintos. O citocromo-c irá formar um complexo de proteínas adaptadoras, conhecido como Apaf-1. O complexo formado poderá dimerizar a pró-caspase 9, gerando o apoptossomo, que é um importante agente para a liberação da caspase 9 iniciadora, que, por sua vez, promove a ativação da caspase 3 efetora, levando ao desencadeamento das

demais etapas, semelhantes às da via extrínseca. As proteínas Smac/DIABLO e Omi/HtrA2 seguirão inibindo as IAPs (do inglês Inhibitor Apoptosis Proteins) e assim continuarão induzindo o processo de apoptose. Em paralelo, nas mitocôndrias, o Fator de Indução de Apoptose (AIF) é liberado para o citosol e direcionado ao núcleo celular no intuito de induzir a fragmentação e condensação do DNA, independente da influência de caspases (GALLUZZI et al., 2015b; PATRA et al., 2019; CARNEIRO; EL-DEIRY, 2020).

A relação entre as proteínas pró ou antiapoptóticas na célula são muito importantes para a regulação da morte celular, além disso tem-se verificado que a hiper ou sub – expressão de genes favorece a carcinogênese através da redução da apoptose (Singh, 2007; Wong, 2011). O grupo de proteínas da família da Bcl-2 é formado por proteínas pró e antiapoptóticas que são importantes para a regulação dessa via de morte, principalmente através da via intrínseca. A família das Bcl-2 desempenham papel importante na regulação da permeabilidade mitocondrial, logo tomando como referência a homologia de seus domínios e suas funções, podemos classificar a família da Bcl-2 em: antiapoptóticas, que protegem a célula de estímulos apoptóticos, como a Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1, Bcl-w, A1/Bfl-1 e Bcl-B/Bcl2L10; e as pró-apoptóticas, que conduzem a célula ao processo de apoptose como as proteínas Bid, Bad, Noxa, Bax e Bak (JOVANOVIĆ GALOVIĆ et al., 2022; YAN; ELBADAWI; EFFERTH, 2020; NEGI; MURPHY, 2021).

3.7 Necroptose

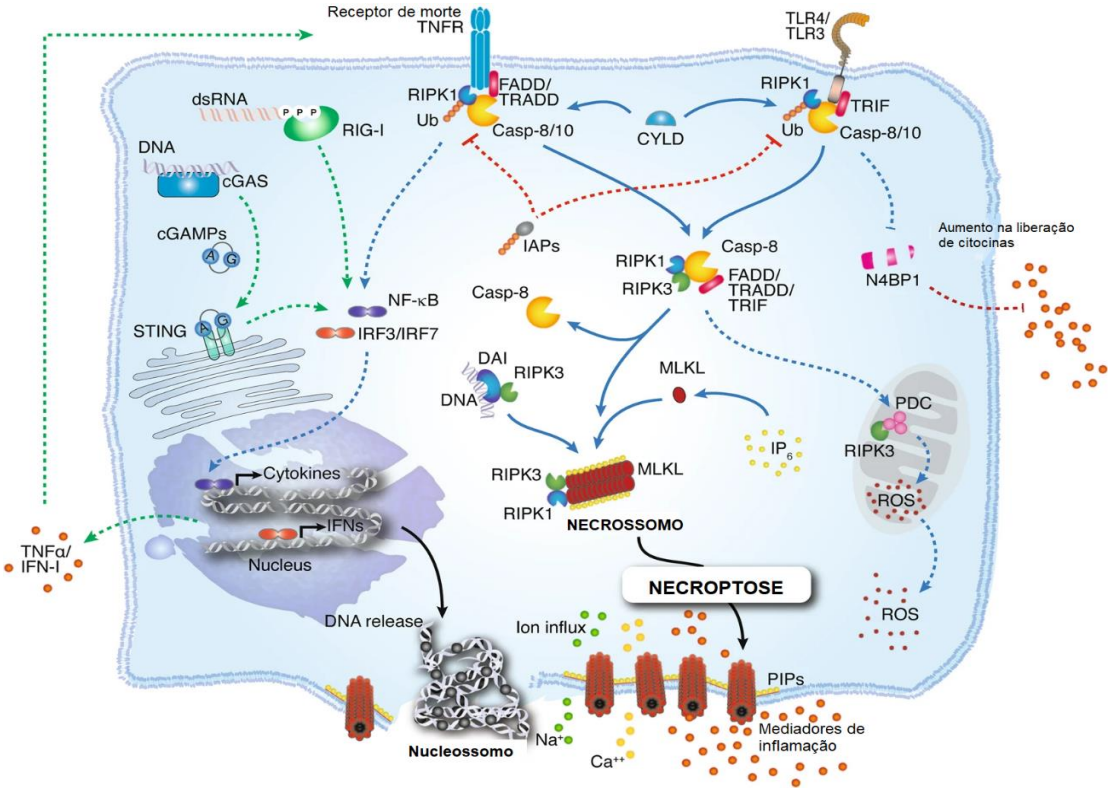
A necroptose é uma via de morte com ativação de moléculas pró-inflamatórias de forma regulada por diversos receptores e estímulos. Um dos receptores mais estudados é o TNFR1, o qual é ativado pelo ligante TNF-α (DEGTEREV et al., 2005). Outros receptores ditos como envolvidos na necroptose são o FS7 associado ao antígeno de superfície celular (faz), receptores 1 e 2 de ligantes indutores de apoptose, estes também relacionados ao TNF (TRAILR1 e TRAILR2), e os receptores do tipo Toll 3 e 4 (TLR3 e TLR4) (SCHWARZER; LAURIEN; PASPARAKIS, 2020).

Alguns estudos conduzidos por He et al. (2009), afirmaram que estresses químicos também são iniciadores para necroptose. O estudo foi realizado através de ensaios *in vitro* com as seguintes linhagens celulares tumorais imortalizadas: células de adenocarcinoma de cólon (HT29); células T leucêmicas (Jukart); células de leucemia linfoblástica aguda (CCRFCEM); células humanas monocíticas leucêmicas (U937); células de camundongos

com fibrosarcoma (L929); e fibroblastos embrionários de camundongos (MEFs) (HE et al., 2009; KHAN et al., 2021).

A morte por necroptose ocorre pela formação do complexo de proteínas contendo RIPK1 (Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1), RIPK3 (Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3) e MLKL (Mixed Lineage Kinase Domain-Like), também chamado necrossomo (REMIJSEN et al., 2014). Fenômenos como a ligação do TNF-α à região extracelular do TNFR1 provoca modificações em sítios alostéricos na região intracelular do receptor, que por consequência provoca o silenciamento do domínio de morte e culmina na formação do complexo I. Por sua vez, tal complexo possui um domínio de morte associado ao receptor do TNF-α (TRADD), um domínio de morte associado ao Fas (FADD), uma proteína de interação com o receptor 1 (RIPK1) e várias ubiquitina ligases E3. Após a formação do complexo I, formado pelas proteínas citadas acima, a via a ser ativada, se apoptose ou necroptose, dependerá dos eventos intracelulares (Figura 9) (BARBOSA et al., 2018; ZHANG et al., 2018).

Figura 9 – Cascata de sinalização e formação de complexos da via de morte da necroptose.



Fonte: Adaptado de Bertheloot; Latz; Franklin, 2021.

Nesse contexto um momento importante é o recrutamento da RIPK1 para o complexo I, quando isso ocorre a RIPK1 pode ser ubiquitinada pelas IAPs, fato este que está relacionado como a tentativa de sobrevivência celular e por sua vez irá ativar o NF-kB. No entanto, na ausência de c-IAP, a RIPK1 não será ubiquitinada, o que permite a translocação desta quinase para um complexo citoplasmático secundário, chamado de complexo II, formado pelo FADD de domínio de morte, caspase 8 e cFLIP. O complexo II é capaz de ativar tanto a via de apoptose como necroptose, sendo a caspase 8 um fator determinante, visto que quando ativada ela direciona à via de apoptose por divisão de RIPK1 e RIPK3, mas caso a caspase 8 esteja ausente, a via é direcionada para a necroptose (YOON et al., 2016; BARBOSA et al., 2018).

A RIPK1 interage com a RIPK3 e formam um complexo essencial para sinalização do recrutamento da MLKL, a qual também será fosforilada pelo complexo. Deste modo, MLKL se torna ativada e irá desestabilizar direta ou indiretamente a integridade da membrana celular, o que irá induzir uma tumefação celular, ruptura da membrana e liberação de Padrões Moleculares Associados a Danos (do inglês "Damage-associated molecular patterns" – DAMPs) (WEBER et al., 2018).

O mecanismo exato pelo qual a MLKL induz a lise da membrana celular ainda não está totalmente elucidado, mas pesquisas indicam que a lise pode estar associada a alteração na concentração de íons de sódio (Na+) entre os meios intra e extracelular. Logo, com a formação de poros na membrana há a uma tendência na entrada de íons Na+ na célula e consequente aumento da osmolaridade, devido a esse excesso de sódio e outros íons no meio intracelular (CHEN et al., 2016; XIA et al., 2016; HUANG et al., 2017) (Figura 10). Além da caspase 8 ativada, outras proteínas podem inibir a via necroptótica, tais como: a Necrostatina 1 (Nec-1, que inibe a RIPK1), GSK'872 (inibidor de RIPK3) e Necrosulfonamida (NSA, inibidor de MLKL) (CHEN et al., 2016; HUANG et al., 2017).

Na necroptose, com a perda da integridade da membrana celular, ocorre a passagem de moléculas pró-inflamatórias endógenas como de DAMPs para o espaço intercelular, visto que estes são liberados por células mortas devido a danos, traumas, isquemia e necrose infecciosa, o que colabora para o início de resposta imune (RODRIGUEZ et al., 2016; XIA et al., 2016; MENG et al., 2021). A Lactado desidrogenase (LDH) e as EROs são exemplos de DAMPs que possui associação com a via de morte. A LDH é uma enzima presente no citosol das células, sendo liberada para o meio extracelular quando ocorrer lesões graves a membrana citoplasmática, logo sendo

considerado um bom marcador de dano celular e morte pró-inflamatória (BARBOSA et al., 2018; KARKI; KANNEGANTI, 2021).

No processo de morte por necroptose ocorre também a produção de EROs, o qual contribui para a via da necroptose, realizando a peroxidação de lipídeos, proteínas e material genético ou funcionando como segundo mensageiro na via de sinalização de receptores de morte (CHALLA; CHAN, 2010; LEE et al., 2017). A necroptose tem sido estudada em várias doenças e seus desenvolvimentos, tais como pancreatite aguda (HE et al., 2009; LEE et al., 2017), aterosclerose (BATISTA NAPOTNIK; POLAJŽER; MIKLAVČIČ, 2021), doenças inflamatórias imunomediadas (como doenças inflamatórias intestinais e artrite reumatoide) e entre outras (CHALLA; CHAN, 2010; VANDEN BERGHE; HASSANNIA; VANDENABEELE, 2016).

3.8 Microambiente tumoral e metástase

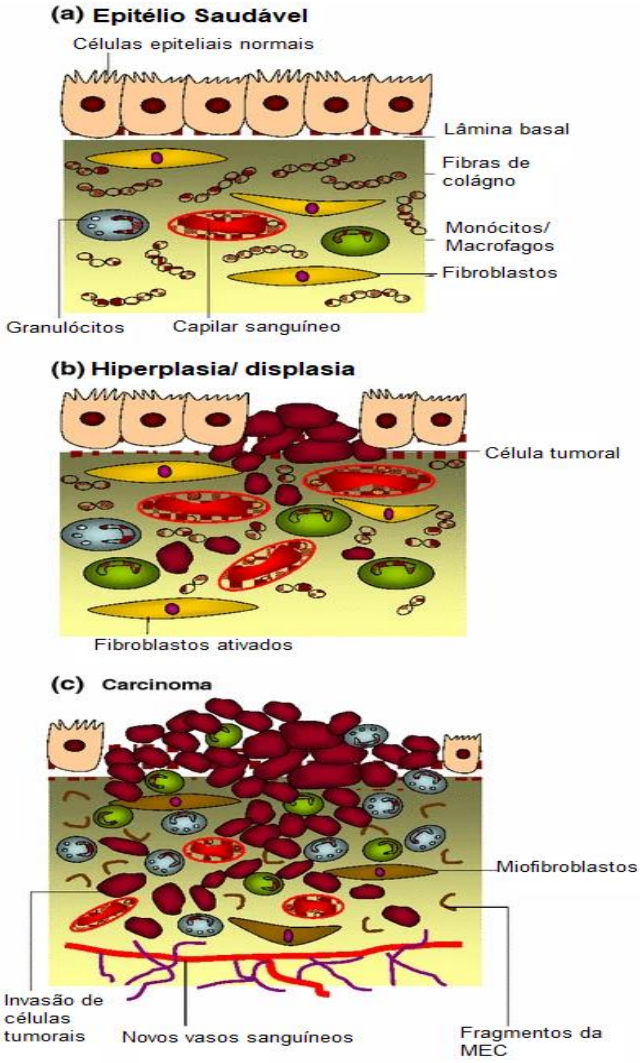
O câncer por muito tempo foi compreendido como um processo patológico onde células alteradas geravam novas células com características diferentes do tecido saudável e se organizavam de forma aglomerada, as quais perdem gradativamente a capacidade de serem reguladas por seu tecido de origem, porém esta compreensão se tornou obsoleta com o passar do tempo. Na atualidade o câncer é compreendido como um processo patológico complexo que possui autorregulação, mesmo em coexistência com outras células não tumorais, esse conjunto de células alteradas e não alteradas no tecido formam o microambiente tumoral (Mbeunkui & Johann, 2009; Arneth, 2020).

O microambiente tumoral possui grande contribuição para o avanço dos cânceres e desenvolvimento de resistência a terapias, por isso se torna material de incessante busca por novas terapias mais efetivas (OCAÑA et al., 2018; GREENLEE et al., 2021b). Logo, os tumores, independentemente se sólidos ou leucêmicos, devem ser compreendidos como tecidos que possuem células tumorais e estromais estáveis, como por exemplo células endoteliais, células de defesa, fibroblastos e outras células dos respectivos tecidos adjacentes, além da matriz extracelular (MEC), um outro elemento de grande importante onde as células estão inseridas (YANOFSKY et al., 2013; EBLE; NILAND, 2019a;).

A MEC está em constante manutenção fisiológica, regulando para mais ou menos a quantidade de fibras de colágeno, para aumentar a resistência do tecido e a proliferação de células de reparo. Estes fenômenos que fazem parte do estado de homeostasia do tecido acabam também por gerar dificuldade na entrada e entrega de medicamentos antitumorais ao tecido doente, logo o microambiente tumoral tem grande importância nos processos

de oncogênese (Figura 10**)** (THOMAS; RADHAKRISHNAN, 2019b; WEBER et al., 2021).

Figura 10 – Microambiente tumoral, carcinogênese e metástase.



Fonte: Adaptado de Mbeunkui; Johann, 2009.

As células tumorais interagem direta e indiretamente com as células saudáveis do microambiente tumoral, principalmente através da expressão de proteínas de superfície do tumor (GUN et al., 2019). Tal estratégia irá dificultar o reconhecimento e a fagocitose por células dendríticas (CDs), além disso irá ocorrer a liberação de citocinas, o que irá promover ainda mais a disfunção das CDs e a inibição da ativação de células T tumorais específicas, favorecendo o crescimento tumoral (GANGULY; LI; MIRANTI, 2014; QUIJANO; VELÁSQUEZ, 2016).

A condição imunológica do próprio microambiente tumoral pode ainda ser influenciada por padrões de imunidade através das células T auxiliares tipo 1 (Th1) e tipo 2 (Th2), desta forma se torna fácil compreender que, por exemplo, indivíduos

imunocomprometidos tendem a apresentar maior produção de Th1 e Th2 e o contrário ocorre com os imunossuprimidos, pois estes irão apresentar predomínio de imunidade apenas para Th2 relacionado à infiltração celular e evolução do tumor (MBEUNKUI; JOHANN, 2009; QUIJANO; VELÁSQUEZ, 2016; TAM et al., 2020).

A partir destas alterações estromais a iniciação e a progressão tumoral irá incluir células endoteliais (vasculares ou linfáticas), células mesenquimais indiferenciadas associadas ao tumor, principalmente nos processos de angiogênese, fibroblastos associados a câncer (CAFs) e células do sistema imune (linfócitos infiltrantes de tumor-TILs, células T, células B, células NK), macrófagos associados (TAMs) e mastócitos. Todas estas células junto à MEC estão unidas no objetivo de favorecer o crescimento tumoral, logo de modo geral não apresentam índices de proliferação celular desregulados ou instáveis (OCAÑA et al., 2018; ARNETH, 2020b).

A MEC tem papel importante na progressão tumoral, pelo fato de reunir elementos teciduais como fibras, proteínas e polissacarídeos disponíveis para as células do tecido (KLEMM; JOYCE, 2014; EBLE; NILAND, 2019b). A destruição da MEC culmina na transição epitélio-mesenquimal, a qual irá promover a clivagem do colágeno e rompimento da lâmina basal que delimita o tecido. Somado a isso, os fragmentos de colágeno são biologicamente ativos e irão regular a migração, proliferação e sobrevivência das células tumorais em outros tecidos, o que irá caracterizar a metástase. O processo de degradação da MEC pode ainda liberar Fator de Crescimento tumoral beta (TGF-β) e Fator de Crescimento de Fibroblasto (FGF), os quais irão regular a angiogênese (THOMAS; RADHAKRISHNAN, 2019a; LIU et al., 2022)

3.9 Terapêutica do câncer e suas estratégias

Atualmente há diversos tipos de tratamentos para o câncer disponíveis na clínica, dentre os quais, os principais são: remoção cirúrgica de tecidos afetados e áreas anatômicas adjacentes, radioterapia para tratamento local da neoplasia acuminada, quimioterapia que consiste em tratamento sistêmico, com protocolos individualizados ou com a combinação de diferentes agentes químicos, tratamento como fototerapia, imunoterapias e outros (KALIKS et al., 2017; KEPP et al., 2020).

A radioterapia consiste em um modelo de tratamento capaz de destruir células tumorais, com a utilização de feixes controlados de radiação ionizante. Neste modelo uma

dose de radiação é calculada previamente considerando o volume da massa tumoral, tempo de exposição do doente no intuito de erradicar as células tumorais e também considerando a dose capaz de causar o menor dano possível em células normais adjacentes, estas últimas que irão auxiliar no processo de reparo tecidual após irradiação (SARKARIA; BRISTOW, 2008; THAKKAR et al., 2020).

Outro tipo de tratamento do câncer, a hormonioterapia, consiste no uso de substâncias semelhantes aos indutores de crescimento de tumor, que, por sua vez, tem como objetivo inibir o desenvolvimento do tumor tratado. Estudos relatam que tal terapia proporciona melhoria da sobrevida do doente e reduz as taxas de mortalidade. Porém, esta terapia ainda apresenta riscos, como a utilização de hormônios que induzem/auxiliam o crescimento de células tumorais diferenciadas que possuem receptores para o mesmo, o que poderia contribuir para o desenvolvimento de novas células tumorais (MILLS; KOLB; SAMPSON, 2018; SHAH et al., 2018).

Os tratamentos quimioterápicos são os mais escolhidos e importantes nas condutas clínicas para o combate ao câncer. A quimioterapia se caracteriza como tratamento antineoplásico com o uso de agentes químicos que interferem no processo de divisão e ciclo celular de células cancerígenas. Porém, mesmo com a constante descoberta e utilização de novos agentes quimioterápicos, ainda há a necessidade de maior eficácia dessas drogas, menor toxicidade e capazes de evitar metástases e recidivas de tumores (KALIKS et al., 2017; OLVER et al., 2018; KEPP et al., 2020).

Uma das principais vantagens no uso de quimioterápicos é a possibilidade do desenvolvimento de novas moléculas com alta seletividade, capaz de causar maior danos apenas a células específicas, se ligando a receptores presentes apenas na maquinaria de células alteradas e que podem ainda controlar casos com alto risco de evolução de metástases e estágios avançados dos canceres, o que possibilidade a maior sobrevida dos pacientes (CRUCERIU et al., 2020; KEPP et al., 2020).

A maioria dos agentes anticâncer utilizados na rotina clínica envolvem mecanismos de ação de modulação da autofagia, a exemplo do bevacizumab, que é formado por anticorpos monoclonais capazes de internalizar e neutralizar o fator de crescimento do endotélio vascular humano (VEGF); o tamoxifeno, que atua como modulador de angiogênese, e os próprios agentes anticâncer clássicos: agentes túbulos-afins, antimetabólicos, alquilantes, intercalantes de DNA, inibidores de topoisomerase I

e II, modelos com utilização de vírus, entre outros (ALDEA et al., 2021; FUKUNAGA et al., 2021).

Nos últimos tempos, tratamentos quimioterápicos com alvos específicos tem se tornado um dos principais focos de pesquisas anticâncer (Fardi et al., 2018). Principalmente a busca por moléculas capazes de interferir em alvos envolvidos na angiogênese, interferência no DNA, ciclo celular e indução de morte celular apenas, ou majoritariamente, de células tumorais (Rühle et al., 2018). É sabido que a angiogênese é um processo importante para várias doenças, incluindo o crescimento de tumores e o desenvolvimento de metástase (Sanphanya et al., 2013; Mourad et al., 2021).

A inibição seletiva de receptores envolvidos na angiogênese em tumores é considerada um dos alvos mais eficazes nas terapias anticâncer (Riggio et al., 2021; Almog et al., 2009). Várias são as proteínas de sinalização que regulam o processo de angiogênese tumoral, dentre estas pode-se citar o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) (Sun et al., 2018). O VEGFR é o principal regulador da angiogênese fisiológica e patológica. A ligação do VEGF ao seu receptor, o VEGFR-2, aciona o receptor tirosina quinase e promove a proliferação e migração de novos vasos (Zhao et al., 2019; Ahmed et al., 2020).

A literatura relata que há a super expressão de tirosinas quinases em casos de câncer, em especial da VEGFR-2, a qual está fortemente presente no processo de angiogênese atrelado a muitos tipos de cânceres humanos, incluindo carcinoma de mama e carcinoma pancreático (Yuan et al., 2019). Logo, o bloqueio da via de sinalização do VEGF por meio da inibição da atividade de receptores de tirosina quinases por pequenas moléculas é considerado uma estratégia interessante para a inibição da angiogênese e, portanto, para o desenvolvimento de novas drogas anticâncer (Ahmed et al., 2020; Zaki et al., 2020).

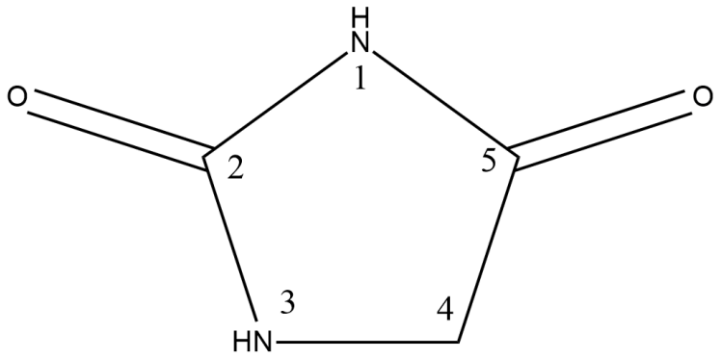
3.10 Imidazolidinas

As imidazolidinas são também conhecidas como hidantoínas e foram descobertas pelo pesquisador Bayer em 1861, quando realizava estudos com ácido úrico e identificou a molécula imidazolidina-2,4-dionas a partir do isolamento do produto da redução (hidrogenação) da alantonína, motivo pelo qual foi denominada hidantoína. Esse núcleo constitui um importante grupo de compostos heterocíclicos orgânicos de conformação

pentamérica, sendo considerada um scaffold bastante versátil devido às suas inúmeras aplicações clínicas, o que lhe permite ser utilizado em diversos produtos farmacêuticos e, até mesmo, ser identificado em produtos naturais (LIU; YANG; PAN, 2014; ŠMIT; PAVLOVIĆ, 2015).

De acordo com a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) os análogos da hidantoína apresentam como núcleo principal um anel imidazolidínico compostopore duas carbonilas nas posições 2 e 4 somado a dois átomos de nitrogênio nas posições 1 e 3 (Figura 11) (CASTRO; MARÇAL, 2018). Por esta ser considerada uma estrutura bioativa por si só, também chamada de núcleo farmacofórico, qualquer alteração em seu arcabouço pode gerar mudanças em suas propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas.

Figura 11 - Representação molecular do arcabouço estrutural de imidazolidinas e algumas possibilidades de variações de ligantes.



Fonte: Adaptado de Castro, Marçal, 2018.

Análogos de imidazolidinas são potenciais agentes químicos de interesse farmacológico devido a características de bioatividade, natureza hidrofílica e capacidade de aumentar biodisponibilidade de precursores biológicos ativos, o que permite ainda que possam ser empregadas como veículos de síntese de outras moléculas (CATERINA et al., 2008).

A capacidade de sofrer modificações e arranjos químicos no núcleo imidazolidínicos e a infinita versatilidade de substituintes, possibilita a funcionalização do esqueleto chave nos ligantes de nitrogênio 1 e 3, o que permite fornecer derivados N,N-dissubstitutivos, bem como a presença de radicais acoplados ao carbono 5 (CATERINA et al., 2008; ŠMIT; PAVLOVIĆ, 2015; CASTRO; MARÇAL, 2018). Tais características permitem atribuir as imidazolidinas ação farmacológica com várias aplicações, como: anticonvulsivante (ROGAWSKI; LÖSCHER, 2004), antitumoral

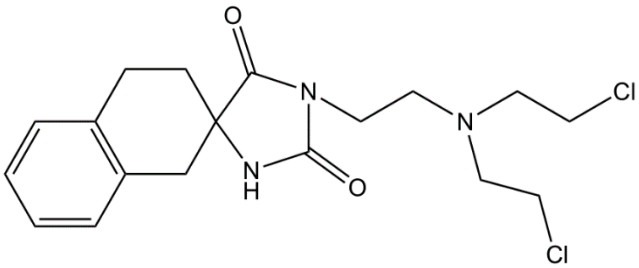
(MOGUILEWSKY; BERTAGNA; HUCHER, 1987), antiparasitário (MATOS-ROCHA et al., 2017), antiarrítmico (LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2018), anticâncer, dentre outras(CASTRO; MARÇAL, 2018).

Um dos principais mecanismos relatados em estudos como efeito anticâncer de derivados imidazolidínicos é a capacidades destes afetarem a replicação do DNA através da inibição do ciclo celular, ativação e clivagem da caspase 9, ativação da pró-caspase 3 e a clivagem do receptor poli (Adenosina Difosfato-ribosil) polimerase, responsável pela inibição/bloqueio de receptores de quinases, o que fortalece a hipótese de ativação da caspase (Kavitha et al., 2009; Yuan et al., 2019; Zaki et al., 2020).

3.11 Derivados de imidazolidinas com atividade anticâncer

Nos estudos de Ghosh et al., (1997), os autores avaliaram a atividade anticâncer da molécula de l-[2-{bis(2’-cloroetil)amino)etil]espiro[imidazolidina-4,2’-(I’H),3’,4’-dihidronaftalenel-2,5-diona, (4, β – tetimurtina) (Figura 12), através de experimentos realizados com fêmeas de ratos da espécie Swiss albino, nos quais foram realizados xenoenxerto com células de carcinoma de Erlich 54scético, sarcoma-180 e linfoma Hodgkin. Os animais foram separados por grupos testes e controle, onde foi possível determinar a dose letal a ser utilizada para tratamento.

Figura 12 – Representação da estrutura química do 4, β- tetimurtina.



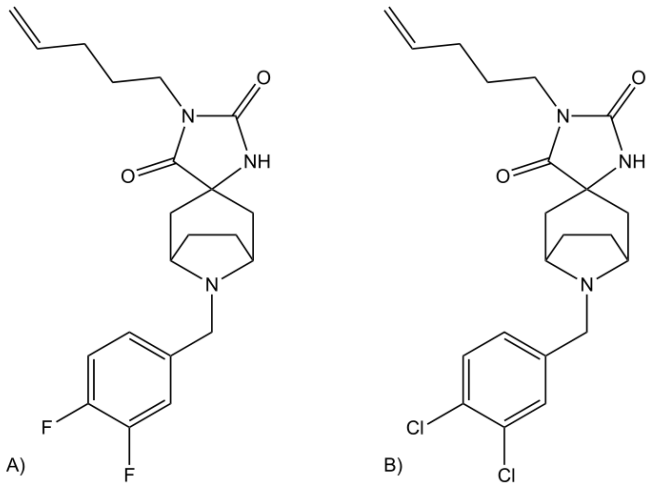
Fonte: Próprio autor, 2023.

Nos testes foi possível identificar a faixa de dose ideal que correspondeu de 4 a 8 mg/kg, sendo realizado aplicações de concentrações crescentes com intervalos 7 a 7 dias. Dessa forma, a molécula estudada apresentou resultados em ambos os tumores de redução superior aos dos respectivos grupos controle positivo, utilizando ciclofosfamida e S-fluorouracil. Os autores descreveram apenas a realização de ensaios com animais em sua publicação, não descrevendo realização de testes *in vitro*, o que inviabilizou, portanto, a

elucidação do mecanismo de ação da 4, β- tetimurtina. Porém, pode-se concluir que o derivado da imidazolidina avaliado apresentou potencial para a terapêutica anticâncer (GHOSH et al., 1997).

Em 2009, Kavitha e colaboradores., avaliaram a capacidade de inibição de crescimento celular e apoptose de células de leucemia utilizando derivados de espiro-hidantoínas, sendo avaliadas neste estudo duas moléculas: a 8-(3,4-difluorobenzil)-10-(pent-4-enil)-8-azaspiro[biciclo[3.2.1]octano-3,40-imidazolidina]-20,50-diona (DFH) e 8-(3,4-diclorobenzil)-10-(pent-4-enil)-8-azaspiro[biciclo[3.2.1]octano-3,40-imidazolidina]-20,50-diona (DCH) (Figura 13).

Figura 13 – Estrutura química do DFH (A) e DCH (B).



Fonte: Próprio autor, 2023.

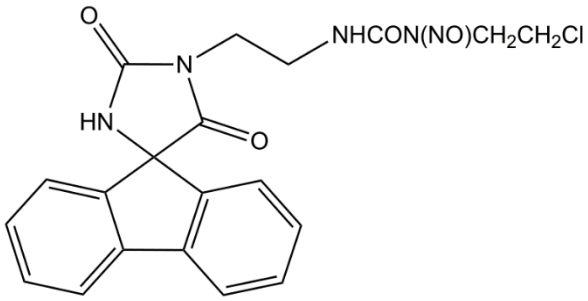
Nos seus estudos, Kavitha e colaboradores (2009), demonstraram que os derivados de imidazolidinas avaliados em seus estudos, possuem efeitos citotóxicos em muitas linhagens celulares leucêmicas, incluindo células de leucemia mieloide crônica. Os pesquisadores explicam em seus experimentos que os compostos testados afetam a replicação do DNA, levando a inibição do ciclo celular. Tal fenômeno foi percebido pela presença do efeito da translocação da fosfatidil serina, observação de DNA nuclear fragmentado, aumento dos níveis de proteínas pró-apoptóticas e o surgimento de proteínas de reparo.

Segundo o autor, sugere-se que ocorre a indução de apoptose por ação da molécula DFH, a qual está comprovadamente associada a ativação e clivagem da caspase 9, ativação da pró-caspase 3 e a clivagem do receptor poli (Adenosina Difosfato-ribosil)

polimerase, o que fortalece a hipótese de ativação da caspase 3 e permite afirmar que as moléculas de imidazolidinas estudadas tem potencial anticâncer e que poderiam ser exploradas para tratamento de leucemias (KAVITHA et al., 2009).

Em 2009, Mukherjee et al., realizaram estudos com a molécula 3-[2-{3-(2-cloroetil)-3-nitrosouriedo}etil]-espiro[5,9′-fluorenil]imidazolidina-2,4-diona (Figura 14), denominada de Fluoren-NU. O estudo revelou que a molécula tinha capacidade alquilante se ligando a regiões que possuíam presença de grupos piridinas.

Figura 14 - Estrutura química do Fluoren-NU.



Fonte: Próprio autor, 2023.

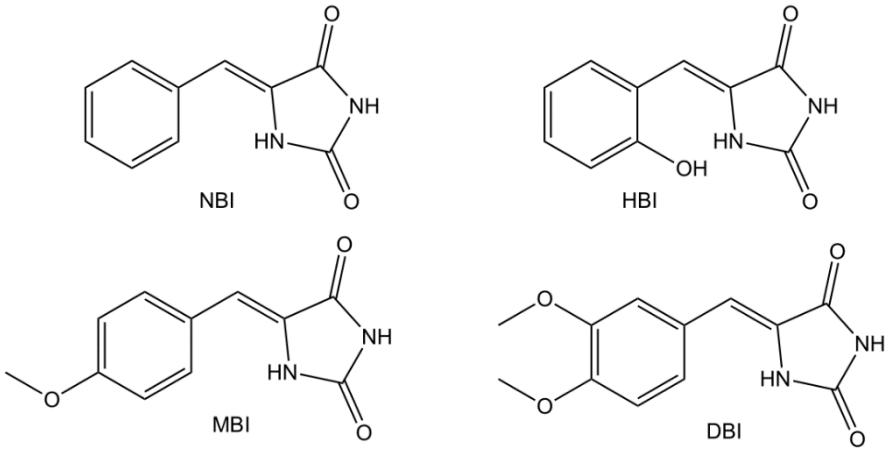
Foram realizados testes *in vitro* em seis linhagens de células tumorais, como: neuroblastoma humano (SK-N-SH e IMR-32), câncer de pulmão (A549), câncer de próstata (DU-145), leucemia aguda (HL-60) e linfoma (U-937). Pôde ser observado pelos pesquisadores que houve efeito citotóxico significativo na linhagem de neuroblastoma (SK-N -SH) e ainda que concentrações de 8 µM foram capazes de inibir a síntese de DNA e RNA contribuindo para a o processo de indução de morte celular.

Os pesquisadores ainda realizaram testes *in vivo* com utilização de fêmeas de ratos da espécie Swiss, os quais receberam enxerto com células de câncer hepático e sarcoma-180. Após ensaios com a molécula estudada foi observado aumento do tempo de vida dos animais e regressão de ambos os tumores, sendo a dose ideal para o tratamento igual a 40mg/kg durante 7 dias, a via de administração não foi explicitada. Os pesquisadores relataram que não houve danos a hematopoiese e a molécula não foi hepatotóxica ou nefrotóxica (MUKHERJEE et al., 2009).

Shah et al., realizaram em 2013 estudos de caracterização de quatro moléculas de imidazolidinas e sua interação com estruturas de DNA, as moléculas foram: 5-benzilideno-imidazolidina-2,4-diona(NBI),5-(2-hidroxibenzilideno)imidazolidina-2,4-

diona(HBI),5-(4-metoxibenzilideno)imidazolidina-2,4-diona (MBI) e 5-(3,4-di-metoxibenzilideno)imidazolidina-2,4-diona (DBI) (Figura 15), sendo a sua respectiva caracterizaçãorealizada através de ensaios de variação de pH e observação por técnicas de UV-Vis, além da realização de ensaios eletroquímicos para avaliar a variação eletrônica e excitatória das moléculas.

Figura 15 – Estrutura química de Imidazolidinas: NBI, HBI, MBI e DBI.

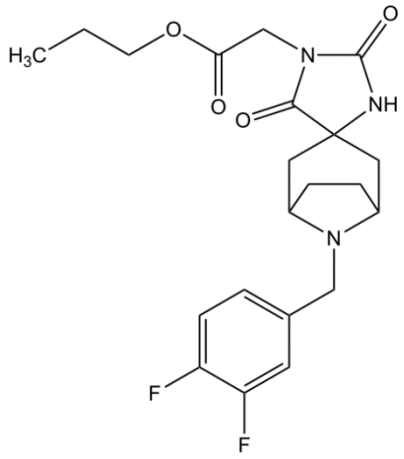


Fonte: Próprio autor, 2023.

Nas análises de interação das imidazolidinas e DNA através de ensaios eletroquímicos em ph 4,5, observou-se o surgimento de novos picos voltamétricos em altas concentrações de DNA, que ocorreram devido a formação de 8-oxoguanina a partir de danos a base da guanina, o que configura a presença de interação entre as imidazolidinas e as fitas de DNA. Nos ensaios eletroquímicos em ph 7,4, mimetizando o pH sanguíneo, houve redução dos picos eletroquímicos proporcional a adição de moléculas de DNA e com ligeira variação anódica e catódica, o que indica interação entre a molécula e a dupla hélice de DNA, possivelmente devido a formação de adutos de ligação com o DNA (SHAH et al., 2013).

Segundo estudos de Kavitha et al., 2013, que avaliaram a atividade anticâncer e o mecanismo de ação do derivado de imidazolidina denominado de propil-2-(8-(3,4-Difluorobenzil)-29,59-Dioxo-8-Azaspiro[Biciclo[3.2.1]Octano-3,49-Imidazolidina]-19-il)Acetato, esta molécula foi denominada de ASHD (Figura 16). OS efeitos biológicos da molécula ASHD foi avaliada utilizando ensaios de citotoxicidade (MTT), análise de ciclo celular, imunohistoquímica e Western Blot.

Figura 16 - Representação química da azaspiro hidantoína, ASHD.



Fonte: Próprio autor, 2023.

A molécula de ASHD, com seu grupamento éster alquilico, apresentou potente citotoxicidade contra as células leucêmicas de linhagem K562 testadas, sendo capaz de promover a inibição da replicação do DNA e do ciclo celular. Logo, confirmou-se a presença de células apoptóticas diante da presença de grupo de células em fase G1, bem como foi possível perceber alterações de apoptose (fragmentação do DNA, condensação da cromatina e presença de corpos apoptóticos) nas células tratadas (KAVITHA et al., 2013).

Percebeu-se ainda aumento da expressão da proteína pró-apoptótica BAD e a redução da proteína antiapoptótica BCL2, bem como a ativação da caspase 9, que por sua vez ativa a caspase 3, responsável pela clivagem do PARP(Polimera Adenosil Difosfato Ribose), proteína que dificulta reparos ao DNA danificado, induzindo a apoptose. Tais observações corroboram com os estudos (KAVITHA et al., 2013).

3.12 Ensaios *in silico*

No processo de prospecção e pesquisa de novas moléculas com propriedades bioativas, diversas aplicações são possíveis. Desde ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo* a ensaios in *silico* (KATSILA et al., 2016; SINGH et al., 2009). O termo "*in silico*" faz menção ao silício, componente químico dos chips que são responsáveis pelo processamento de equipamentos de informática, logo, que remete a pesquisas realizadas através de métodos computacionais (LIN; LI; LIN, 2020).

Métodos computacionais tem sido cada vez mais aplicados no desenvolvimento de novos medicamentos, uma vez que os ensaios *in silico* permitem realização de triagem

de moléculas em grande número, sem haver a necessidade de síntese ou avaliações *in vitro* das mesmas, algo que contribui na redução de gastos relacionados a experimentos, quando comparado a pesquisas *in vitro* e/ou *in vivo* além de evitar a necessidade de testes em animais e/ou humanos (KATSILA et al., 2016; LIU et al., 2013).

Outras aplicações possíveis de serem realizadas pelos ensaios *in silico* é a reutilização (ou reposicionamento) de drogas. Nesse tipo de abordagem são investigadas aplicações biológicas diferentes para drogas já conhecidas, desenvolvidas e utilizadas para tratamentos diversos, um modelo de "reciclagem ou reuso", podendo ser centrada em diferentes paradigmas. Geralmente as drogas utilizadas para métodos de reutilização são medicamentos já comercializadosou que foram descontinuados por algum critério científico, como por exemplo a cibutramina e o sildenafil (CHORTANI et al., 2022; MASSAROTTI et al., 2012; NEWMAN et al., 2019; WÜRTH et al., 2016).

A possibilidade de reposicionamento de medicamentos é importante no desenvolvimento de estratégias terapêuticas de doenças como o câncer, doenças negligenciadas e outras, pois oportuniza a entrega de medicamento nas redes de saúde de maneira rápida e barata (GHOLIVAND et al., 2022ª; LAFAYETTE et al., 2017; LEELANANDA; LINDERT, 2016; NOWAK-SLIWINSKA; SCAPOZZA; ALTABA, 2019). Algumas doenças como o câncer possuem características bastante complexas, o que dificulta o tratamento, sendo este muitas vezes realizado por agentes quimioterápicos disponíveis, mas de eficácia limitada, o que gera a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos de maneira rápida, segura e de baixo custo (GHOLIVAND et al., 2022a, 2022b).

O número de estudos de reposicionamento de drogas no tratamento de diversos tipos de câncer tem sido crescente e com quantidade significativa de casos de sucesso. As abordagens *in silico* são muito úteis, pois permitem uma alta velocidade de reposicionamento, quando comparado ao ritmo de produção de drogas já existentes (CHORTANI et al., 2022; DAR; SHAMSUZZAMAN; KHAN, 2016; LEELANANDA; LINDERT, 2016).

Outras aplicações, cada vez mais fidedignas a realidade e confiáveis dos estudos in *sílico*, é a predição de características físico-químicas, farmacodinâmicas, farmacocinéticas, atividades biológicas e identificação de alvos biológicos (NEWMAN

et al., 2019; WÜRTH et al., 2016). Estes tipos de abordagens de estudo foram utilizados neste trabalho com objetivo de corroborar os resultados encontrados nos testes *in vitro*.

Uma ampla quantidade de técnicas computacionais e softwares podem ser empregadas no planejamento, desenvolvimento e triagem de novas moléculas com características terapêuticas. No ensaio denominado ancoragem molecular ou do inglês "*molecular docking*", que significa encaixe molecular, são utilizadas duas moléculas em que uma será denominada de ligante e a outra de receptor, podendo estas serem "encaixadas" e levar ao cálculo de diferentes probabilidades de interação a serem preditas *in silico,* (KATSILA et al., 2016; LIN; LI; LIN, 2020).

O método de *docking* molecular pode ser aplicado na avaliação de acoplamento (encaixe) de diversos tipos de moléculas: proteínas, carboidratos, enzimas e ácidos nucléicos, logo, o docking realiza uma predição que aumenta as possibilidades de orientação das interações moleculares (LEELANANDA; LINDERT, 2016). Deste modo é possível identificar na literatura a aplicação de docking molecular para diversas finalidades (CHORTANI et al., 2022; GHOLIVAND et al., 2022b; LIU et al., 2013; MASSAROTTI et al., 2012; NEWMAN et al., 2019; SINGH et al., 2009).

Para execução do método de ancoragem do docking é necessário possuir a estrutura do receptor no formato tridimensional, esses modelos são comumente obtidos experimentalmente por métodos cristalográficos de raios-x e então depositados em bancos de dados científicos, como por exemplo o Protein Data Bank (PDB), que é um banco de dados de estruturas moleculares de proteínas e diversas outras moléculas, já identificadas e depositadas. Essa plataforma é de acesso aberto e juntamente às estruturas o banco oferece várias informações (RICHARDSON; RICHARDSON; GOODSELL, 2021).

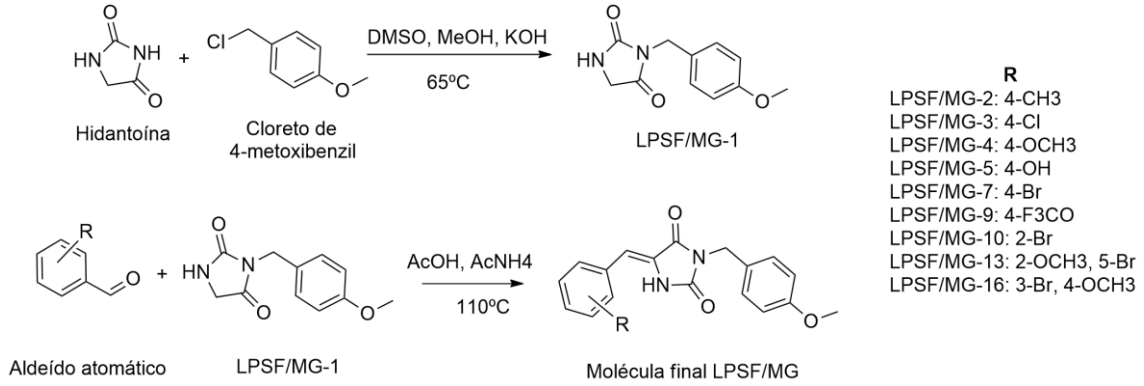
4. METODOLOGIA

4.1 Derivado Imidazolidínicos

4.1.1Síntese dos derivados de imidazolidina

O intermediário LPSF/MG-1 (3-(4-metoxibenzil)-imidazolidina-2,4-diona) foi produzido solubilizando a hidantoína e o cloreto de 4-metoxibenzil em dimetilsulfóxido (DMSO) e então misturados à base hidróxido de potássio (KOH) solubilizada em MeOH. A mistura foi aquecida a 65ºC e mantida sob agitação por duas horas. Depois a reação foi resfriada em geladeira, formando um precipitado que foi filtrado e seco, para utilização nas próximas etapas. Para produção dos compostos finais da série LPSF/MG, o LPSF/MG-1, e os aldeídos correspondentes foram solubilizados em ácido acético (AcOH) juntamente com o promotor acetato de amônio (AcNH4) (Figura 17), seguido de aquecimento a 110ºC, por tempos diferentes. Ao final de cada reação as soluções foram resfriadas em geladeira, obtendo-se, ao fim, um total de 10 moléculas do tipo LPSF/MG (LPSF/MG-1; -2; -3; -4; -5; -7; -9; -10; -13; -16). Os precipitados foram filtrados, secos e então analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Ressonância Magnética de hidrogênio e carbono, Infravermelho por Transformada de Fourier e Espectrometria de Massas. Todas as reações foram acompanhadas por Cromatografia em Camada Delgada e, quando necessário, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Figura 17 - Esquema de rota de síntese de imidazolidina-2,4-diona e seus derivados



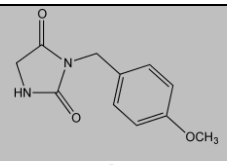
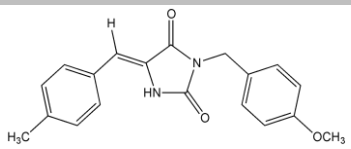
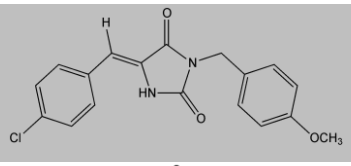
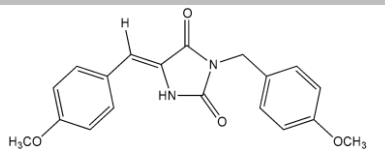
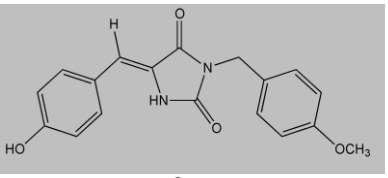
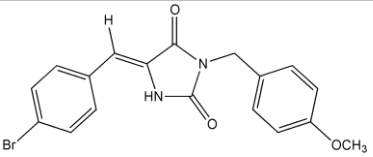
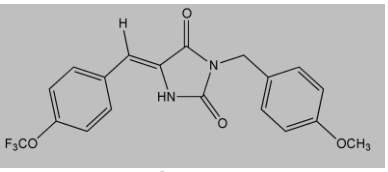
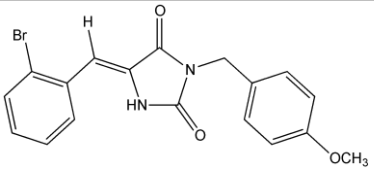
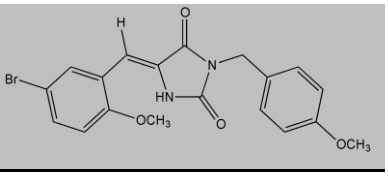
Fonte: Próprio autor, 2023.

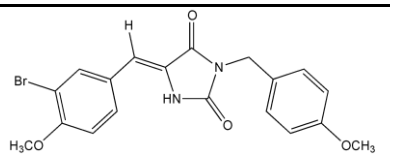
4.2 Compostos estudados

Os derivados imidazolidínicos testados, pertencentes a série LPSF/MG, foram sintetizados no Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF-UFPE), o qual faz parte do Laboratório de Inovação Terapêutica do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, sendo gentilmente cedidos pela Dra. Marina

Galdino da Rocha Pitta. Na Tabela 1 encontram-se as estruturas químicas dos derivados imidazolidínicos avaliados.

Tabela 1 - Derivados imidazolidínicos potencialmente anticâncer.

Sigla	Nome químico	Fórmula molecular	Estrutura química
MG-1	3-(4-metoxibenzil)-imidazolidina-2,4-diona	**$C_{11}H_{12}N_2O_3$**	
MG-2	3-(4-metoxibenzil)-5-(4-metilbenzilideno)imidazolidina-2,4-diona	**$C_{19}H_{18}N_2O_3$**	
MG-3	5-(4-clorobenzilideno)-3-(4-metoxibenzil)imidazolidina-2,4-diona	**$C_{18}H_{15}ClN_2O_3$**	
MG-4	3-(4-metoxibenzil)-5-(4-metoxibenzilideno)imidazolidina-2,4-diona	**$C_{19}H_{18}N_2O_4$**	
MG-5	5-(4-hidroxibenzilideno)-3-(4-metoxybenzil)imidazolidina-2,4-diona	**$C_{18}H_{16}N_2O_4$**	
MG-7	5-(4-bromobenzilideno)-3-(4-metoxibenzil)imidazolidina-2,4-diona	**$C_{18}H_{15}BrN_2O_3$**	
MG-9	3-(4-metoxibenzil)-5-(4-(trifluorometoxi)benzilideno)imidazolidina-2,4-diona	**$C_{19}H_{15}F_3N_2O_4$**	
MG-10	5-(2-bromobenzilideno)-3-(4-metoxibenzil)imidazolidina-2,4-diona	**$C_{18}H_{15}BrN_2O_3$**	
MG-13	5-(5-bromo-2-metoxibenzilideno)-3-(4-metoxibenzil)imidazolidina-2,4-diona	**$C_{19}H_{17}BrN_2O_4$**	

MG-16	5-(3-bromo-4-metoxibenzilideno)-3-(4-metoxibenzil)imidazolidina-2,4-diona	**$C_{19}H_{17}BrN_2O_4$**	

Todos os compostos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) à 50 mmol/mL. As diluições mais baixas foram feitas diretamente no meio de cultura. A concentração final de DMSO, em todos os testes, incluindo os controles, foi de até 0,1 %.

4.3 Análise *in silico*

4.3.1 In *silico* ADMET prediction

A maioria dos compostos químicos falha em ensaios clínicos devido a aspectos farmacodinâmicos, baixa biodisponibilidade e alta toxicidade, portanto, avaliar a previsão *in silico* de ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) tornou-se uma parte importante do processo de descoberta de medicamentos porque reduz a possibilidade dos medicamento selecionados falharem em ensaios clínicos. No presente estudo foi realizado a predição de propriedade de semelhança dos compostos estudados, utilizando as plataformas: PreADMET, Molinspiration e SwissADME. A regra dos cinco de Lipinski e a regra de Veber foram usadas para determinar se os compostos sob investigação eram eficazes para biodisponibilidade oral ou não. A toxicidade dos derivados sintetizados foi prevista usando o servidor ProTox-II (BANERJEE et al., 2018) e pkCSM (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015), servidores web gratuitos para previsão de toxicidade *in silico*.

4.3.2 Molecular docking study

4.3.2.1 Preparação dos ligantes

Os isômeros *Z* e *E* dos derivados imidazolidínicos foram inicialmente desenhados em duas dimensões no ChemDraw Ultra versão 12.0, as quais foram convertidas em estruturas tridimensionais através do software Avogadro (versão 1.2.0) e então submetidas a otimização estrutural, utilizando o AutoOptimizate Tool com o campo de força MMFF94s e algoritmo Steepest Descent. Esse processo de otimização energética se faz importante para que os ligantes a serem analisados apresentem estruturas químicas

na sua conformação mais estável, ou seja, mais próxima daquela que seria observada em experimentos empíricos.

4.3.2.2 Obtenção e preparação dos alvos

A proteína VEGFR-2 foi escolhida como alvo diante da sua importância como agente responsável no crescimento de células endoteliais e crescimento de tumores, logo, sua inibição ou interações negativas são de interesse terapêutico. A estrutura cristalográfica da proteína VEGFR-2 foi retirada da plataforma Protein Data Bank (PDB) com o código PDB ID 4ASD, a qual foi obtida por difratometria de raios X com resolução de 2,03 Å. A estrutura proteica foi plotada no software Discovery Studio Visualizer 2020, onde moléculas de água e ligantes cocristalizados foram retirados. Possíveis irregularidades no estado de protonação da estrutura foram corrigidas utilizando a ferramenta online PDB2PQR (https://server.poissonboltzmann.org/pdb2pqr) (Jurrus et al., 2018), onde foram adicionados hidrogênios no pH 7 através do campo de força PARSE.

4.3.2.3 Docking molecular

O docking molecular dos derivados imidazolidínicos foi realizado através do software DockThor-VS (https://dockthor.lncc.br/v2/) (MAGALHÃES et al., 2014; SANTOS et al., 2020; GUEDES et al., 2021), utilizando as configurações de algoritmo genético do Virtual Screening que consiste no Number of Evaluations 500000, Population Size 750, Initial Seed -1985, Number of runs 12 e Soft Docking, com discretização de 0.25 e Total Grid Points 226981. O campo de força MMFF94 foi utilizado como função de pontuação. As coordenadas do centro do gridbox para VEGFR-2 foram definidas baseado no centro dos seu ligante cocristalizado, chamado BAX, o qual atua como inibidor desse alvo. As coordenadas utilizadas para o VEGFR-2 foram X = -24,226, Y = -1,29, Z = -12,93. O *grid size* utilizado para o alvo foi de 15Å para cada aresta. A presente metodologia foi previamente submetida a validação por redocking do BAX no seu respectivo sitio ativo, o qual apresenta RMSD de 0,407Å. A representação gráfica da ancoragem de cada estrutura avaliada e a análise das suas interações ligante-receptor foram feitas por meio do Discovery Studio Visualizer 2020.

4.4 Linhagens celulares

O estudo da atividade antitumoral foi realizado com linhagens tumorais humanas adquiridas no BCRJ (Banco de Células do Rio de Janeiro).

Tabela 2 - Linhagens celulares

Linhagens	Características
DU145	Adenocarcinoma de Próstata
PANC1	Adenocarcinoma de pâncreas
MIA PACA 2	Adenocarcinoma de pâncreas

Fonte: Autor, 2023.

4.5 Manutenção das células neoplásicas

As linhagens celulares foram mantidas em garrafas de poliestireno em estufa úmida à temperatura de 37 ºC e atmosfera de 5% de CO_2, sendo acompanhadas diariamente com o auxílio de um microscópio invertido. A troca do meio foi realizada diariamente. As linhagens aderidas Du145 e Panc1 foram cultivadas em meio DMEM baixa glicose suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 10 mM de HEPES e 1% de penicilina/estreptomicina. A linhagem MiaPaca2 foi cultivada em meio DMEM high glicose suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 2,5% de soro fetal equino, 10 mM de HEPES e 1% de penicilina/estreptomicina. Durante a manutenção das células aderidas foi utilizado tripsina (0,25 %) e EDTA (1 mM) para deadesão das linhagens.

4.6 Obtenção e manutenção das células mononucleadas do sangue periférico (PBMCs)

Para este estudo foi necessário coletar amostras do sangue periférico do total de 10 voluntários sadios, os quais foram selecionados baseados nos seguintes critérios de inclusão: idade maior ou igual a 18 anos de idade, de ambos os gêneros e que não possuíam doenças crônicas declaradas até o momento da pesquisa; Além destes, os seguintes critérios de exclusão foram aplicados: indivíduos que possuíam doenças crônicas, mulheres grávidas, ou indivíduos que declarem no ato da coleta ter manifestado sinais e sintomas como: febre, espirro, rinorreia, dor de garganta, diarreia, náuseas, mialgia ou fadiga e ou qualquer sintoma sugestivo de infecções de origens bacterianas, fúngicas, virais e/ou autoimunes. As amostras foram coletadas na sala de coleta do Laboratório de Imunomodulação e novas abordagens terapêuticas (LINAT) da Universidade Federal de Pernambuco, localizado no 1º andar do Prédio da Diretoria de Inovação e Empreendedorismo (DINE). Dos voluntários foram coletadas amostras no

volume de 10-15 ml de sangue em tubos à vácuo contendo o anticoagulante heparina. As coletas foram feitas por profissionais competentes e devidamente treinados para reduzir os riscos para o paciente. Nenhuma coleta foi realizada sem a autorização prévia dos voluntários. Para isso, primeiramente, eles foram apresentamos ao objetivo do estudo e então questionados sobre o interesse em participar da pesquisa. O Projeto foi submetido ao COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS - Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal de Pernambuco e aprovado sob o parecer nº 4.322.331 em 08.10.2020 (Anexo I).

As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram isoladas a partir do método de separação por gradiente de densidade através de centrifugação com Ficoll PaqueTM Plus (GE Healthcare BioSciences). Após obtenção das PBMCs as mesmas foram diluídas em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 10 mM de HEPES e 1% de penicilina/estreptomicina em estufa úmida à temperatura de 37 ºC e atmosfera de 5% de CO2 (Okumura et al., 2010; Roland et al., 2013) e em seguida as células foram distribuídas em poços de placas de 96 poços para avaliação de ensaio de citotoxicidade.

4.7 Ensaio de citotoxicidade em células neoplásicas, não tumorais e normais: método MTT

O teste de citotoxicidade *in vitro* foi realizado nas células neoplásicas e normais (PBMCs) com diferentes concentrações dos derivados imidazolidínicos. A citotoxicidade celular foi quantificada pelo método colorimétrico 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-Hbrometo de tetrazolium (MTT). Este consiste em um método sensível que possui a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas desidrogenases mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas (Sylvester, 2011).

As células foram distribuídas em placas de 96 poços onde cada poço recebeu a quantidade de 1 x 10^4 de células e em seguida as mesmas foram submetidas à diferentes concentrações dos 10 derivados imidazolidínicos testados (LPSF/MG-1, -2, -3, 4, -5, -7, -9, 10, -13, -16, sendo as concentrações finais de tratamento por poço de 3,125µM; 6,25 µM; 12,5 µM; 25 µM; 50 µM e 100 µM e então incubadas em estufa úmida à 37 ºC e 5% de CO_2 por 48h e 72h para as células normais e neoplásicas, respectivamente. Passado o período de incubação foram adicionados 20 µL da solução de MTT na concentração de 5

mg/mL diluída em PBS em cada poço das placas, as quais foram então protegidas da luz e incubadas mais uma vez em estufa úmida a 37 ºC e 5% de CO_2 por um período de 3h. Ao fim desse período, a reação foi interrompida pela adição de 130 µL de SDS 20% e a densidade óptica foi medida após 24 horas no comprimento de onda de 570 nm. A leitura foi realizada em um leitor de microplacas (EL808 - Biotek®) (Rêgo et al., 2014).

A determinação do potencial citotóxico dos compostos testados foi calculada em relação ao controle tratado com o veículo DMSO a 0,01%. Para determinação da concentração de composto necessária para 50% de inibição in vitro (CI50) foram realizados três ensaios independentes de redução do MTT. O CI50 de cada ensaio foi calculado através da fórmula: % viabilidade celular = 100 – (média viabilidade célula tratada – média viabilidade branco) x 100 / (média viabilidade DMSO – média viabilidade branco). Com o valor do CI50 foi calculado o índice de seletividade, utilizando a seguinte fórmula: Indice de seletividade (IS) = CI50 das células normais / CI50 das células tumorais, sendo considerado seletivo quando o score ≥ 3. Para a elaboração dos gráficos e cálculo da CI50, foram utilizados os programas GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) e o programa OriginPro 8 (Originlab Corporation®, Northampton, MA, EUA).

4.8 Análise do ciclo celular

As linhagens teste foram distribuídas em placas de 6 poços numa densidade de 2,5 x 10^5 células por poço e incubadas à 37 °C sob atmosfera de 5% de CO_2 por 24 horas. Em seguida as células foram tratadas com concentrações CI50 e 2xCI50 dos derivados LPSF/MG-2 na linhagem de MiaPaca2, LPSF/MG-3 na linhagem de Panc1 e LPSF/MG-7 nas linhagens MiaPaca2 e Panc1. Como controle positivo foi utilizado a gemcitabina e células tratadas com a concentração de 0,1% de DMSO foram utilizadas como controle negativo. As células tratadas e não tratadas foram incubadas por 48 e 72 horas. Após esse período, o meio de cultura foi retirado dos poços e as células foram lavadas 2 vezes com PBS 1x. Em seguida, as células foram tripsinizadas, lavadas novamente com PBS e fixadas em álcool 70 % à 4-6 °C. Na sequência, as células foram incubadas por 24 horas à - 20 °C. Em uma segunda etapa, as células foram marcadas com solução de iodeto de propídeo (PI) (0,05 mg/mL) / RNAse A (0,025 mg/mL) em PBS por 30 minutos sobre o gelo (Solhaug et al., 2013). O conteúdo de DNA celular foi quantificado através de citometria de fluxo utilizando o citômetro de fluxo Accuri C6, através do programa BD

CSampler Software (Becton, Dickinson and Company, USA) e a porcentagem de DNA em cada fase do ciclo (SubG0, G0-G1, S e G2/M) foi obtida pelo software FlowJo v.10.

4.9 Análise da indução de morte celular: apoptose e necrose

As linhagens teste foram distribuídas em placas de 6 poços numa densidade de 2,5 x 10^5 células por poço e incubadas à 37 °C, sob atmosfera de 5% de CO_2 por 24 horas. Em seguida as células foram tratadas com concentrações de CI50 e 2xCI50 dos derivados LPSF/MG-2 na linhagem de MiaPaca2, LPSF/MG-3 na linhagem de Panc1 e LPSF/MG-7 nas linhagens MiaPaca2 e Panc1 e como controle positivo foi utilizado a gemcitabina, células tratadas com a concentração de 0,01% de DMSO foram utilizadas como controle negativo, as células tratadas e não tratadas foram incubadas por 48 e 72 horas. Após esse período, o meio de cultura foi retirado dos poços e as células foram lavadas 2 vezes com PBS 1x, sendo, então, tripsinizadas e lavadas 2 vezes com tampão (10 mM HEPES/NaOH, 140 mMNaCl, 2.5 mM CaCl2-pH 7.4,). Em seguida as células foram marcadas com 2,5 μM de PI (0,05mg/mL) e 5μM de Anexina V-FIT (0,5mg/mL) por 30 min protegido da luz. A marcação das células foi adquirida através de citometria de fluxo utilizando o citômetro de fluxo Accuri C6, através do programa BD CSampler Software (Becton, Dickinson and Company, USA) e a quantidade de 10.000 eventos foi quantificado e analisado pelo software FlowJo v.10.

4.10 Ensaio de migração

As células Panc1 e Mia-paca-2 foram distribuídas numa densidade de 1x10^6 por poço em placas de 24 poços e incubadas à 37°C sob atmosfera de 5% de CO_2 por 24 horas. Após atingir a confluência de 90%, o meio foi aspirado e duas lavagens com PBS 1X foram realizadas. Em seguida, foi feita em cada poço uma linha de marcação (estria) perpendicular utilizando uma ponteira de 200μl. Após o procedimento de marcação das estrias, as células foram tratadas com meio completo, DMSO 0,1% (controle) e com os derivados LPSF/MG-2, LPSF/MG3 e LPSF/MG-7 na concentração do CI50. Os poços foram fotografados com 0, 12 e 24 horas utilizando microscópio invertido (Nikon, Ts2). Os dados do ensaio de migração foram calculados utilizando as fotos para obter o tamanho da área final e da inicial do tamanho da estria feita com a ponteira. Para o cálculo da área utilizamos o programa ImageJ (Versão 1.49) (NIH, USA).

4.11 Ensaio da inibição de formação de clones

As células Panc1 e Mia-paca-2 foram distribuídas numa densidade 3 x10^4 por poço em placa de 24 poços. Após o período de 24 horas, as células foram tratadas com DMSO 0,1% (controle negativo), gemcitabina 1µM (controle positivo) e com os derivados LPSF/MG-2 e LPSF/MG-7 para a linhagem de Mia-paca-2 e os compostos LPSF/MG-3 e LPSF/MG-7 na linhagem de Panc1. Os LPSF/MGs citados foram avaliados na concentração do CI50, nos tempos de 24 e 48 horas. Após o tratamento, as células foram lavadas com PBS 1x e tripsinizadas, contadas e aproximadamente 300 células foram plaqueadas por poço em placas de 6 poços, as quais foram mantidas em condições ideias de cultivo por14 dias. Após este período, as células foram lavadas com PBS 1x, fixadas com metanol 100%, coradas com cristal violeta 0,1%, lavadas com PBS 1x e então mantidas a temperatura ambiente por 24 horas para secagem. Em seguida, foi realizada a contagem das colônias formadas e a análise estatística dos resultados.

4.12 Extração de RNA e Síntese de cDNA

Inicialmente na etapa de extração, as amostras foram expostas a temperatura ambiente durante 5 minutos para promover a completa dissociação do complexo de proteínas do núcleo. Após o degelo, foi adicionado as amostras 150ul de clorofórmio e em seguida foram homogeneizadas e submetidas a uma centrifugação de 12000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após a primeira centrifugação, a solução aquosa localizada no sobrenadante (onde encontra-se o RNA) foi transferida para um novo eppendorf no qual foi adicionado 375uL de isopropanol a 100%. A amostras foram incubadas em freezer a -80ºC por 2 horas. Em seguida as amostras foram descongeladas por 10min a temperatura ambiente e depois centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C para a precipitação do pellet. Depois o sobrenadante foi descartado, o pellet foi lavado com 750uL de etanol a 75% e então centrifugado a 7500rpm durante 5min a 4°C. Em seguida o sobrenadante foi descartado e os tubos colocados para secar durante pelo menos 3 horas. Depois as amostras foram ressuspendidas com 30uL de água RNAse free e incubadas em banho seco por 10-15 min a 55°C. O material obtido foi quantificado no Nanodrop® (Thermofisher) e armazenado a -80°C. Para a síntese do cDNA, foi utilizado a concentração de 500ng de RNA utilizando o kit de transcrição reversa cDNA Hight Capacity (AppliedBiosystems) seguindo as recomendações do fabricante.

4.13 Avaliação da expressão gênica por RT-qPCR

A expressão genética foi realizada pela reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR), utilizando o método TaqMan

(AppliedBiosystems) em um termociclador QuantStudio™ 5 (AppliedBiosystems). As condições de ciclagem foram de 95ºC por 5 min, seguidos de 40 ciclos de 95ºC a 3 seg e 60ºC por 20 seg. O gene 18S (Hs03003631_g1) foi usado como controle endógeno. A expressão relativa do RNA foi calculada pelo método 2-ΔΔCt. Os genes BAX (Hs00180269_m1), BID (Hs00609632_m1), CASP3 (Hs00234387_m1) e CASP7 (Hs00169152_m1) foram avaliados.

4.14 Análise Estatística

Os cálculos de média, desvio padrão e viabilidade foram realizados utilizando o programa Excel. O CI_{50} foi calculado a partir da média dos resultados da viabilidade celular dos compostos com o auxílio do programa OriginPro8 (Originlab Corporation®, EUA). Os resultados foram analisados por teste t (Student), Anova com pós teste de Bonferonin utilizando-se o programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software®, USA) considerado estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

Análise *in silico*

O princípio de Lipinski, conhecido também como regra dos cinco, consiste em comparar 4 princípios, estes que são características em comum com drogas já conhecidas de banco de moléculas. Os parâmetros considerados pela regra de Lipinski são: massa molecular menor ou igual a 500 Da, LogP menor ou igual a 5, número de doadores de ligação de hidrogênio deve ser menor ou igual a 5 e número de grupos aceptores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 10. Já a regra de Veber considera a área de superfície polar (TPSA) menor ou igual a 140 Å² e número de ligações rotacionáveis menor ou igual a 10 (LIPINSKI, 2000; MARTIN, 2018).

As propriedade físico-químicas e possíveis semelhanças dos derivados imidazolidínicos testados com drogas já conhecidas por meio da aplicação da regra de Lipinski e Veber foram analisadas utilizando o SwissADME (http://swissadme.ch/index.php#undefined). Além disto, a pontuação do modelo de semelhança com drogas já conhecidas foi mensurada com aplicação da plataforma web Molsoft (https://www.molsoft.com/mprop/). Os resultados obtidos estão detalhados na Tabela 3.

Tabela 3 - Propriedades físico químicas e predição de semelhança de imidazolidinas-2,4-diona com drogas conhecidas.

		Princípio de LIPINSKI				Princípio de Veber		
Composto	**Log P**	**Peso Molecular**	**Número de ligações de H**	**Nº de doadores de H**	**Lipinski**	**TPSA**	**Nº de ligações rotacionais**	**Veber**
LPSF/MG-1	0.75	220.22 g/mol	3	1	0 violation	58.64 Å²	3	Yes
LPSF/MG-2	2.77	322.36 g/mol	3	1	0 violation	58.64 Å²	4	Yes
LPSF/MG-3	2.97	342.78 g/mol	3	1	0 violation	58.64 Å²	4	Yes
LPSF/MG-4	1.99	338.36 g/mol	4	2	0 violation	78.87 Å²	5	Yes
LPSF/MG-5	2.03	324.33 g/mol	4	2	0 violation	78.87 Å²	4	Yes

LPSF/MG-7	3.04	387.23 g/mol	3	1	0 violation	58.64 Å²	4	Yes
LPSF/MG-9	2.74	326.32 g/mol	4	1	0 violation	58.64 Å²	4	Yes
LPSF/MG-10	3.05	387.23 g/mol	3	1	0 violation	58.64 Å²	4	Yes
LPSF/MG-13	3.06	417.25 g/mol	4	1	0 violation	67.87 Å²	5	Yes
LPSF/MG-16	2.57	417.25 g/mol	4	2	0 violation	78.87 Å²	5	Yes

Fonte: Próprio autor, 2023.

Com base nos resultados encontrados na Tabela 2, pode-se observar que todas os análogos da imidazolidina-2,4-diona testados não violam o princípio de Lipinski ou o de Veber.

As características preditas de bioatividade das imidazolidina-2,4-dionas demonstraram relevante pontuação em relação a sua possível atuação como ligantes de receptores acoplados a proteína G (GPCR), moduladores de canal iônico, inibidores de quinases, ligantes de receptor nuclear, inibidores de proteases e inibidor de enzimas, predições estas realizadas usando o Molinspiration bioactivity score v2018.03 web (https://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties), uma plataforma específica para avaliação de possíveis atividades biológicas (AYAR et al., 2021). Os resultados obtidos estão detalhados na tabela 4.

Segundo os estudos de Ayar e colaboradores (2021), a regra de bioatividade prevê que os valores utilizados como referência para de prever que uma molécula possui bioatividade deve ser quando a mesma apresentar score maior que 0,00, desta forma a molécula do estudo será considerada possivelmente ativa. No entanto, se o score de bioatividade estiver no intervalo de referência entre -0.50 e 0.00, este pode ser considerado moderadamente bioativo, e quando o valor de referência estiver inferior a -0.50 a molécula em estudo é considerada inativa (AL WASIDI; HASSAN; NAGLAH, 2020a; CHEN et al., 2018).

Tabela 4 - Predição de score de bioatividade das imidazolidina-2,4-diona.

COMPOSTO	**Ligante de GPCR**	**Modulação de Canal Iônico**	**Inibidor de Quinases**	**Ligante de receptor nuclear**	**Inibidor de Proteases**	**Inibidor de Enzimas**

LPSF/MG-1	**-0.31**	**-0.41**	-0.78	-1.37	-0.50	-0.38
LPSF/MG-2	**-0.32**	-0.96	-0.21	-0.71	-0.76	-0.38
LPSF/MG-3	**-0.28**	-0.90	-0.19	-0.70	-0.74	-0.35
LPSF/MG-4	**-0.18**	-0.78	-0.10	-0.52	-0.52	-0.18
LPSF/MG-5	**-0.22**	-0.84	-0.12	-0.54	-0.67	-0.26
LPSF/MG-7	**-0.38**	-0.97	-0.22	-0.79	-0.82	-0.40
LPSF/MG-9	**-0.26**	-0.91	-0.14	-0.65	-0.72	-0.34
LPSF/MG-10	**-0.43**	-0.99	-0.23	-0.86	-0.88	-0.40
LPSF/MG-13	**-0.44**	-0.90	-0.28	-0.77	-0.82	-0.39
LPSF/MG-16	**-0.30**	-0.83	-0.19	-0.60	-0.63	-0.26

Fonte: Próprio autor, 2023.

Pode-se descrever as seguintes características em torno das informações presentes na tabela 4, sobre as imidazolidina-2,4-diona: referente a ligação do receptor acoplado à proteína G (GPCR), todas as moléculas avaliadas demonstraram bioatividade moderada, com intervalos entre -0.18 e -0.44. Em relação à resposta de modulação do canal iônico apenas a molécula LPSF/MG-1 demonstrou bioatividade moderada com score de - 0.41, enquanto que as demais moléculas foram inativas.

Na avaliação de bioatividade de interferência na inibição de quinases apenas a LPSF/MG-1 demonstrou ser inativa para este parâmetro, as demais moléculas (LPSF/MG-2, LPSF/MG-3, LPSF/MG-4, LPSF/MG-5, LPSF/MG-7, LPSF/MG-9, LPSF/LPSF/MG-10, LPSF/LPSF/MG-13 E LPSF/LPSF/MG-16) demonstraram bioatividade de inibição das quinases de maneira moderada e com um score de intervalo entre -0.10 e -0.28. No que se refere a capacidade de bioatividade de inibição de receptores nuclear, apenas as moléculas LPSF/MG-4 e LPSF/MG-5 demonstraram bioatividade moderada com score respectivamente de -0.52 e -0.54, as demais moléculas foram inativas para inibição de receptor nuclear.

Na observação referente a inibição de proteases foi identificado bioatividade moderada apenas para as moléculas LPSF/MG-1 e LPSF/MG-4, com score respectivamente de -0.50 e -0.52, as demais moléculas foram inativas para inibição de proteases. No critério de inibição enzimática todas as moléculas das imidazolidina-2,4-diona demonstraram bioatividade moderada, com um intervalo de score entre -0.18 e -0.40.

Diante do exposto sobre a análise de bioatividade nos ensaios preditivos, as moléculas LPSF/MG-1 e LPSF/MG-4 demonstraram maior pontuação para maior número classes de alvos biológicos em relação as demais moléculas.

As propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) e de propriedades citotóxicas foram previstas utilizando a plataforma Web SwissADME (http://swissadme.ch/index.php#undefined) (AYAR et al., 2021; DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017a). Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 - Propriedades farmacocinéticas e metabólicas dos derivados de imidazolidina.

Parâmetro	**Composto**									
	LPSF/ MG-1	**LPSF/ MG-2**	**LPSF/ MG-3**	**LPSF/ MG-4**	**LPSF/ MG-5**	**LPSF/ MG-7**	**LPSF/ MG-9**	**LPSF/ MG-10**	**LPSF/ MG-13**	**LPSF/ MG-16**
Absorção GI	High	High	High	High	High	High	High	High	High	High
Permeabilidade BBB	No	Yes	Yes	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	No
Substrato P-gp	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Inibição CYP1A2	No	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Inibição CYP2C19	No	Yes	Yes	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Inibição CYP2C9	No	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Inibição CYP2D6	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Inibição CYP3A4	No	Yes	Yes	No	No	Yes	No	Yes	Yes	Yes
Log Kp	-7.13 cm/s	-6.07 cm/s	-6.01 cm/s	-7.06 cm/s	-6.60 cm/s	-6.23 cm/s	-6.28 cm/s	-6.23 cm/s	-6.44 cm/s	-7.05 cm/s
Ghose	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Egan	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Muegge	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Score de Biodisponibilidade	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55

Fonte: Próprio autor, 2023.

Há dois fatores importantes a serem considerados quanto a biodisponibilidade de um fármaco, a absorção gastrointestinal (GI absorbation) e permeabilidade da barreira

hematoencefálica (BBB). A plataforma SwissADME realiza este tipo de análise e gera dados numéricos e em representações semelhantes a um “ovo cozido” (DAINA; ZOETE, 2016; GHOSE; VISWANADHAN; WENDOLOSKI, 1999; HASSAN et al., 2022a). Estes dados levam em considerações os valores de lipofilicidade indicados pelo Log P e a área de superfície topológica de uma molécula o TPSA, já descrito anteriormente. Logo, diante dos resultados expressos na Tabela 4, foi possível observar que todas as moléculas demonstraram alta absorção gastrointestinal. E quanto a permeabilidade hematoencefálica, seis moléculas se demonstraram capazes de fazer permeação (LPSF/MG-2, LPSF/MG-3, LPSF/MG-7, LPSF/MG-9, LPSF/MG-10, LPSF/MG-13) e quatro demonstraram não foram capazes de permear a barreira hematoencefálica (LPSF/MG-1, LPSF/MG-4, LPSF/MG-5 e LPSF/MG-16).

Dentre todos os compostos avaliados em relação a inibição da P-gp (P-glicoproteína), foi observado que nenhum dos compostos inibe esta proteína, o que é bastante interessante, uma vez que isso significa que os compostos avaliados não teriam diminuição de sua biodisponibilidade através da administração oral.

Quanto ao perfil metabólico das moléculas, todas as moléculas foram avaliadas quanto a possibilidade de inibir isômeros do citocromo P450. O estudo das isoformas deste determinam as propriedades farmacocinéticas, bioativação e a persistência de segurança de medicamentos (Ayar et al., 2021; Hassan et al., 2022b; Zhang et al., 2017). Foi possível observar que quase todas as moléculas apresentaram grande possibilidade de inibir as enzimas CYP1A2 e a CYP2C9, com exceção da LPSF/MG-1 e LPSF/MG-4. Quanto a CYP2C19 a maioria das moléculas foram capazes de fazer inibição, com exceção da LPSF/MG-1, LPSF/MG-4 e LPSF/MG-5. Para o isômero CYP3A4 algumas moléculas demonstraram inibição que foram as LPSF/MG-2, LPSF/MG-3, MG7, LPSF/LPSF/MG-10, LPSF/LPSF/MG-13, LPSF/LPSF/MG-16, as demais não foram capazes de inibição. Nenhuma das moléculas foi capaz de fazer inibição do isômero CYP2D6. Esses achados corroboram com outros trabalhos que também evidenciaram que derivados imidazolidínicos inibem isômeros do citocromo P450, contudo o isômero CYP2D6 não é comum de ser inibido por derivados imidazolidínicos (Cimatti et al., 2022).

Foi avaliado a predição do coeficiente de permeabilidade da pele (Kp), parâmetro importante que avalia a permeabilidade epidérmica e absorção sistêmica de drogas após a administração transdérmica (Sobanska et al., 2021), considerando-se que uma molécula

tem boa capacidade de permeação da pele quando seu Kp é superior a -2.5cm/s. (Awadelkareem et al., 2022). Todas as moléculas de imidazolidina-2,4-diona apresentaram coeficiente de permeabilidade inferior a -2.5cm/s, o que pode ser considerado como fator interessante para evitar intoxicação em contato direto com a pele em casos acidentais.

Outro parâmetro importante avaliado para as moléculas deste estudo foi o score de biodisponibilidade, o qual deve demonstrar valores acima de 0.25, sendo que todas as moléculas demonstraram score médio de 0.55 o que pode ser considerado ótimo. Além disso, a predição demonstrou o fato de as moléculas se enquadrarem nos filtros dos princípios de Ghose (GHOSE; VISWANADHAN; WENDOLOSKI, 1999), Egan (EGAN; MERZ; BALDWIN, 2000) e Muegge (MUEGGE; HEALD; BRITTELLI, 2001), critérios que são considerados contraprovas semelhantes à de Lipinski e Veber. A predição dos fatores metabólicos demonstra que a maioria das moléculas são inibidoras de isoformas do citocromo P450 (CYP1A2 e CYP2C9).

A predição dos parâmetros de toxicidade *in silico* foi analisada para diferentes situações como hepatotoxicidade, carcinogenecidade, imunotoxicidade, mutagenicidade, citotoxicidade (aguda) e teste AMES das moléculas deste estudo (HASSAN et al., 2022b; PINHEIRO et al., 2022). Os parâmetros foram considerados *in silico* por ensaios em roedores utilizando o pKCSM (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015) (http://biosig.unimelb.edu.au/ pkcsm/prediction) e ProTox-II webserver. Os resultados estão sintetizados na Tabela 6.

Tabela 6 - Análise de toxicidade *in silico* das moléculas de imidazolidina.

	Predição de Probabilidade (%)					
Composto	**Hepatotoxicidade**	**Carcinogenicidades**	**Imunogenicidade**	**Mutagenicidade**	**Citotoxicidade**	**AMES**
LPSF/MG-1	Inativo (0.83)	Inativo (0.63)	Ativo (0.70)	Inativo (0.68)	Inativo (0.78)	YES
LPSF/MG-2	Inativo (0.65)	Inativo (0.63)	Inativo (0.94)	Inativo (0.67)	Inativo (0.74)	YES
LPSF/MG-3	Inativo (0.56)	Inativo (0.63)	Inativo (0.72)	Inativo (0.70)	Inativo (0.73)	YES
LPSF/MG-4	Inativo (0.70)	Inativo (0.63)	Inativo (0.80)	Inativo (0.69)	Inativo (0.77)	YES

LPSF/MG-5	Inativo (0.61)	Inativo (0.62)	Inativo (0.80)	Inativo (0.70)	Inativo (0.76)	YES
LPSF/MG-7	Inativo (0.56)	Inativo (0.61)	Inativo (0.56)	Inativo (0.68)	Inativo (0.68)	YES
LPSF/MG-9	Inativo (0.53)	Inativo (0.62)	Inativo (0.52)	Inativo (0.68)	Inativo (0.73)	YES
LPSF/MG-10	Inativo (0.57)	Inativo (0.62)	Inativo (0.70)	Inativo (0.69)	Inativo (0.69)	NO
LPSF/MG-13	Inativo (0.57)	Inativo (0.64)	Ativo (0.90)	Inativo (0.71)	Inativo (0.66)	YES
LPSF/MG-16	Inativo (0.65)	Inativo (0.65)	Ativo (0.90)	Inativo (0.70)	Inativo (0.70)	YES

*Todos os valores entre parênteses estão em valor decimal referente a % logo devem ser multiplicados por 100%

Fonte: Próprio autor, 2023.

Os resultados de predição obtidos demonstram que nenhuma das moléculas é hepatotóxica, carcinogênica, mutagênica e citotóxica. Quanto à característica de imunotoxicidade, a maioria das moléculas foi inativa com taxas de probabilidade de inatividade de 52% a 94%, com exceção das moléculas LPSF/MG-1, LPSF/MG-13 e LPSF/MG-16 que demonstraram atividade imunotóxica e com probabilidades preditas de 70% a 90%. No entanto, pelo resultado do AMES a maioria das moléculas foi considerada com potencial tóxico, com exceção da LPSF/MG-10. Moléculas positivas para o AMES indica possibilidade de toxicidade hepática e/ou ação mutagênica (DRWAL et al., 2014).

Docking Molecular

O ensaio de ancogarem de moléculas, conhecido como docking molecular é uma ferramenta importante, pois pode descrever a forma de interação entre ligante e receptor de novas moléculas e como estas podem se ligar e interagir com os alvos de interesse, sejam proteínas ou moléculas diversas, deste modo auxiliando na economia de recursos e facilitando a escolhas dos ensaios *in vitro* e *in vivo* (HASSAN et al., 2022a). O estudo de docking molecular tem se tornado um método cada vez mais disseminado na triagem e analise de novas moléculas, que permite de maneira preditiva obter informações de proteína-ligante, informação importante para o desenvolvimento e aplicação de drogas e otimização de terapêuticas (WANG; ZHU, 2016).

A estrutura a ser selecionada para estudo de docking deve estar relacionada a afinidade de ligação entre o ligante e a proteína alvo. Neste estudo foi de escolha o fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR2), o qual atua como agente importante no crescimento de células endoteliais. O mesmo é conhecido como receptor de domínio de inserção de quinases, em especial a tirosina quinase tipo III. O VEGFR2 funciona como mediador de proliferação endotelial induzida. Pesquisas indicam que a ativação dessas quinases pode estar relacionada com a sobrevida e proliferação de células neoplásicas. A super expressão do VEGFR2 foi identificada em variados tumores como de câncer de cólon, próstata, mama, ovários e pâncreas, tornando a inibição do VEGFR2 uma opção de tratamento promissora para diversos tipos de câncer (AL WASIDI; HASSAN; NAGLAH, 2020b; ALKAHTANI et al., 2019a; DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017b; ELSHERIF et al., 2020; MOSTAFA et al., 2016a).

Deste modo, simulações de ancoragem molecular foram realizadas afim de investigar as interações moleculares entre o promissor composto LPSF/MG-7 e os locais de interação da proteína VEGFR2 (PDB ID: 4ASD). A molécula de LPSF/MG-7 exibiu um score de – 8.931 kcal/mol e a molécula de referência BAX apresentou um score de -11,377, molécula esta que já possui interação comprovada na literatura de interação com o VEGFR2, o que contribui de que a molécula LPSF/MG-7 é capaz de interagir com o sítio alvo do ligante. Ainda foi evidenciado que a LPSF/MG-7 faz ligações de hidrogênio com aceptores de Glu79 e His163, e foi observado ainda interações hidrofóbicas do tipo Pi-Sigma e Pi-Alkyl com os aminoácidos Lys62, Leu83, Val110 e His163. A interação de ligação do composto LPSF/MG-7 com o ligante alvo cocristalizado da proteína VEGFR2 está representado na tabela 7 e na Figura 18.

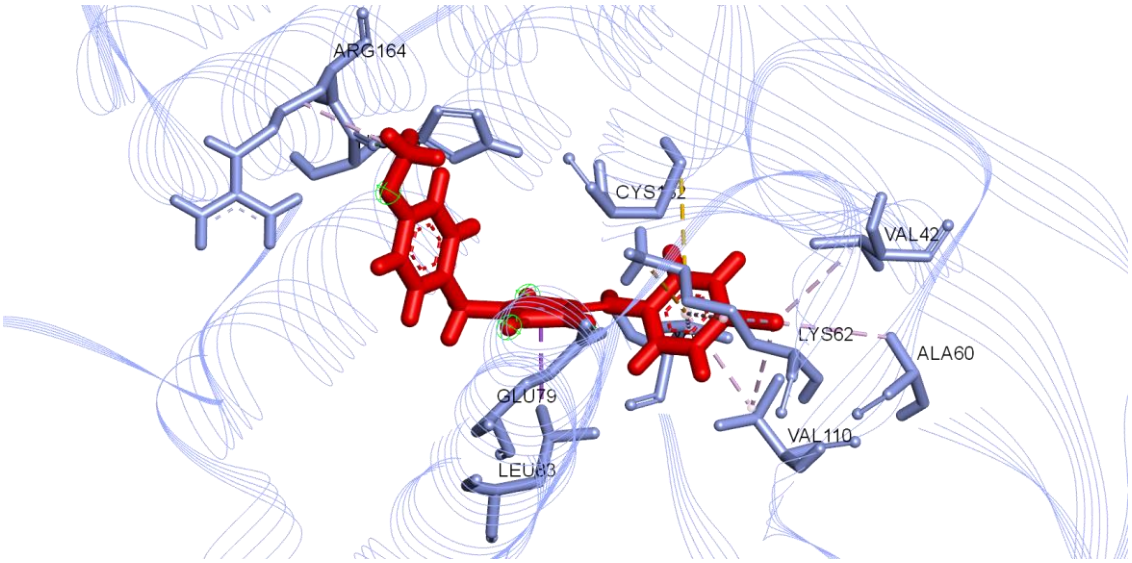
Tabela 7 - Estudo de modelagem molecular do derivado mais promissor (LPSF/MG-4) dentro dos sítios ativos da VEGFR2 (PDB ID: A4SD)

Doador	**Receptor**	**Distância**	**Categoria**	**Tipo**
LIG2:H	A:GLU79:OE2	176.903	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
LIG2:H	A:HIS163:O	260.235	Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond
A:LYS62:NZ	LIG2	440.337	Electrostatic	Pi-Cation
A:LEU83:CD2	LIG2	341.991	Hydrophobic	Pi-Sigma

A:CYS182:SG	LIG2	586.925	Other	Pi-Sulfur
A:ALA60	LIG2:Br	448.719	Hydrophobic	Alkyl
LIG2:C	A:ARG164	433.571	Hydrophobic	Alkyl
LIG2:Br	A:VAL42	376.767	Hydrophobic	Alkyl
LIG2:Br	A:LYS62	392.973	Hydrophobic	Alkyl
LIG2:Br	A:VAL110	4.2397	Hydrophobic	Alkyl
LIG2	A:LYS62	517.639	Hydrophobic	Pi-Alkyl
LIG2	A:VAL93	459.659	Hydrophobic	Pi-Alkyl
LIG2	A:VAL110	409.866	Hydrophobic	Pi-Alkyl

Fonte: Próprio autor, 2023.

Figura 18 - Representação da interação 3D da molécula LPSF/MG-7 acoplada ao sítio da VEGFR2.



Interações em roxo: Arginina-164 (ARG-164), Glutamamto-79 (GLU79), LEUCINA-83(LEU83), LISINA-62(LYS62) e ALANINA-60(ALA60); Interações em lilás: Valina-42(VAL42) e VALINA-110(VAL110); interação em amarelo: CISTEÍNA-182(CYS182).

Fonte: Próprio autor, 2023.

Avaliação *in vitro*

Os derivados de imidazolidinas-2,4-diona foram investigados quanto a sua atividade citotóxica em diferentes linhagens de células tumorais e PBMCs, afim de avaliar a capacidade citotóxica antiproliferativa dos compostos nas linhagens de Du145 (câncer de

próstata), Mia-paca2 (Câncer de pâncreas), Panc1 (câncer de pâncreas) e PBMCs (células mononucleares do sangue periférico, do inglês: Peripheral blood mononuclear cells). Inicialmente todas as moléculas sintetizadas foram rastreadas na concentração de 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,125 µM, 3,062 µM e 1,531, empregando-se como controle negativo a condição tratada com o veículo Dimetil sulfóxido (DMSO) à 0,1% (tabela 8).

Tabela 8 – Concentração inibitória mínima (CI50) capaz de induzir efeito antiproliferativo de 50% da população celular pelos compostos imidazolidina-2,4-diona

Composto	**Linhagem Celular (CI50)**			
	Du145	**Mia-paca2**	**Panc1**	**PBMC**
LPSF/MG-1	> 100 µM	> 100 µM	> 100 µM	> 100 µM
LPSF/MG-2	45,92 ± 0,31 µM	17,19 ± 1,11µM	> 100 µM	> 100 µM
LPSF/MG-3	> 100 µM	> 100 µM	65,64 ± 2,97 µM	> 100 µM
LPSF/MG-4	29,9 ± 2,3 µM	> 100 µM	> 100 µM	> 100 µM
LPSF/MG-5	> 100 µM	> 100 µM	> 100 µM	> 100 µM
LPSF/MG-7	55,9 ± 3,1 µM	13,92 ± 3,76 µM	50,22 ± 2,91 µM	> 100 µM
LPSF/MG-9	> 100 µM	> 100 µM	73,06 ± 1,95 µM	> 100 µM
LPSF/MG-10	> 100 µM	> 100 µM	> 100 µM	> 100 µM
LPSF/MG-13	> 100 µM	> 100 µM	74,22 ±2,52 µM	> 100 µM
LPSF/MG-16	> 100 µM	> 100 µM	> 100 µM	> 100 µM
Gemcitabina	1 µM	1 µM	1 µM	-

Os valores correspondem à média ± DP de três experimentos independentes realizados em triplicata.

Fonte: Próprios autores, 2023.

No processo de triagem dos compostos e das linhagens celulares, observou-se que vários dos compostos apresentaram atividade citotóxica para diferentes linhagens celulares. Pode-se destacar como respostas interessantes aquelas observadas na células da linhagem Du-145 tratadas com os compostos LPSF/MG-2, LPSF/MG-4 e LPSF/MG-7, os quais demonstraram CI50 de 45,92 ±0,311 µM, 29,9 ± 2,3 µM e 55,9 ± 3,1 µM, respectivamente. Frente a linhagem a essa linhagem de próstata a molécula LPSF/MG-4 apresentou a melhor dose-resposta devido ao seu valor de CI_{50} ser o menor dentre as demais. A molécula LPSF/MG-4 apresenta um grupo metoxil na posição 4 do anel aromático, o que lhe confere uma característica lipofilicidade, o que possivelmente lhe

permite também a maior capacidade de sofrer absorção intracelular e interação com outras moléculas orgânicas (ROMAGNOLI et al., 2013a; THI XUAN; VAN HAI, 2017).

Na linhagem de Mia-paca2, os compostos LPSF/MG-2 e LPSF/MG-7 demonstraram atividade citotóxicas significativa, com CI_{50} de 17,19±1,11µM e 13,92±3,76 µM para os derivados LPSF/MG-2 e LPSF/MG-7, respectivamente. Na linhagem de Panc1 foi observado efeito citotóxico para os compostos LPSF/MG-3 e LPSF/MG-7, sendo os respectivos valores calculados do CI_{50} equivalente (ou sinônimo) 65,64±2,97 µM para e 50,22±2,91 µM. Vale ressaltar que outros compostos também apresentaram efeitos citotóxico, porém com concentrações mais altas.

Nas células de PBMCs nenhum dos compostos apresentou efeito citotóxico com redução de até 50% da proliferação celular com concentrações menores que 100 µM, o que sugere um possível efeito de seletividade dos compostos por linhagens tumorais. Na análise de seletividade (Tabela - 9) foi possível observar de acordo com o cálculo do índice ou score de seletividade que a molécula LPFS/MG-4 é seletiva pela linhagem celular de câncer de próstata (Du145) com score de 3,34 e a LPSF/MG-2 foi seletiva para a linhagem de carcinoma pancreático (Mia-paca-2) com score de 5,81, enquanto o LPSF/MG-7 apresentou score de 7,18 para a mesma linhagem. Segundo Espuri et al. (2019), é dito como seletivo quando o índice de seletividade é maior igual a 3, sendo este valor calculado como a razão entre o valor do CI50 de células normais dividido pelo CI50 de compostos em questão em células tumorais.

Tabela 9 – Índice de seletividade de novos derivados imidazolidina-2,4-diona

Composto	**Linhagem celular**		
	Du145	**Mia-paca-2**	**Panc1**
LPSF/MG-1	1	1	1
LPSF/MG-2	2,17	5,81	1
LPSF/MG-3	1	1	1,52
LPSF/MG-4	3,34	1	1
LPSF/MG-5	1	1	1
LPSF/MG-7	1,78	7,18	1,99
LPSF/MG-9	1	1	1,36
LPSF/MG-10	1	1	1
LPSF/MG-13	1	1	1,34
LPSF/MG-16	1	1	1

Fonte: Próprio autor, 2023.

Em uma análise comparativa das concentrações de CI50 dos compostos, as menores concentrações foram observadas em células de pâncreas da linhagemMia-paca2 tratadas com os compostos LPSF/MG-2 e LPSF-MG-7. e por comparação de tipo de tumor a linhagem de Panc1 pode-se citar também a LPSF/MG-3. Embora todos os compostos deste estudo possuam uma cadeia principal do tipo imidazolidina-2,4-diona, eles possuem características estruturais que as diferenciam e que podem estar correlacionadas à suas diferentes respostas de efeitos citotóxicos. O composto LPSF/MG-2 possui um grupo metil na posição 4 do anel aromático que o proporciona maior interação hidrofóbica e hidrofílicas com outras moléculas, contribuindo para interações biológicas e sua internalização em estruturas celulares, fato esse que é corroborado por outros estudos, que avaliaram a atividade de análogos de Pirazol com grupamentos terminais metil e observaram a mesma atividade em moléculas com grupamentos metil frente a linhagens de câncer de ovário (HeLa), câncer de cólon (HT-29) e câncer de mama (MCF-7) (ROMAGNOLI et al., 2013b)

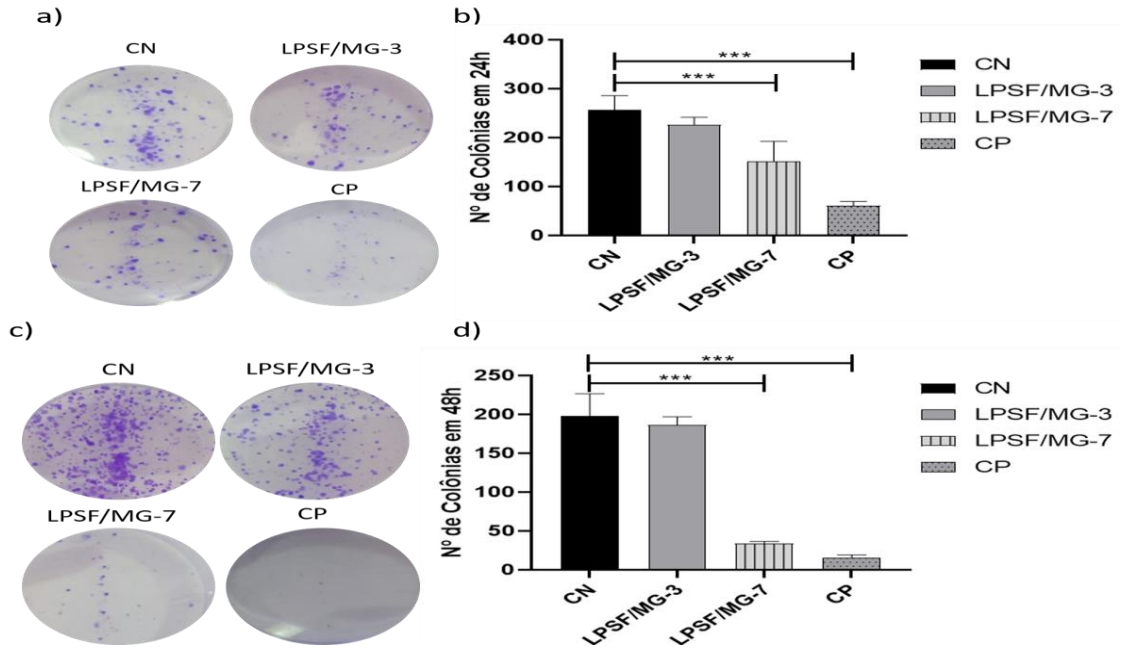
O composto LPSF/MG-3 possui em sua estrutura um grupamento cloro na posição 4 do anel aromático, o que confere ao composto propriedades de eletronegatividade, o que facilita a interação com canais iônicos, interação com proteínas e influencia em seus efeitos biológicos (HEIDRICH; SPERL; BOECKLER, 2019; ZAGÓRSKA et al., 2021; ZIMMERMANN et al., 2014). No tocante a molécula que apresentou efeitos citotóxicos em diferentes linhagens aqui estudadas e com concentrações de CI50 menores que as demais moléculas testadas em uma mesma linhagem foi a LPSF/MG-7, a qual possui na sua posição 4 (*para)* de substituição o elemento bromo, o qual pode conferir ao composto um perfil de maior carga eletronegativa e potencial oxidativo e contribuir para efeitos anticâncer pela interação biológica com proteínas e canais iônicos, conforme estudos realizados com hidantoínas com o átomo de bromo em sua estrutura, que demonstraram bons resultados em ensaios de efeito citotóxico para tumores de câncer de mama (MCF-7), câncer de pulmão (A549 e NCI-H460) (DA SILVA FILHO et al., 2019; GOUVEIA et al., 2018).

Diante dos resultados dos ensaios de citotoxicidade se decidiu aprofundar com outras metodologias a investigação dos efeitos biológicos das moléculas LPSF/MG-2 e LPSF/MG-7 na linhagem de câncer de Mia-paca2. Devido ao fato desta linhagem ser de câncer de pâncreas, foi preferido comparar os resultados em uma linhagem de mesmo

sítio anatômico, sendo escolhido a linhagem de adenocarcinoma ductal pancreático (Panc1), na qual os compostos com melhor resultado foram as LPSF/MG-3 e LPSF/MG7.

Na avaliação da influência do tratamento com o derivado LPSF/MG-3 e LPSF/MG-7 sobre a formação de clones de células da linhagem Panc1 após 24 e 48 horas de tratamento com a concentração do CI50, observou-se que o LPSF/MG-7 demonstrou redução 22,32 % (p=0,0267) do número de clones no tempo de 24 horas (Figura 19-a, b) e 81,22% (p = 0,0402) no tempo de 48 horas (Figura 19-c, d), quando comparado ao controle negativo. Por sua vez, o LPSF/MG-3 promoveu redução de 16,22% para o tempo de 24h (figura 19-a, b) e de 3,57% para o tempo de 48h (figura 19-c, d), reduções essas não significativas estatisticamente quando comparada ao controle negativo. O controle positivo (CP) de gemcitabina demonstrou inibição de 90,62% (p = 0,0243) no tempo de 24 horas (figura 19-a, b) e 75,25% (p = 0,0316) no tempo de 48 horas (figura 19-c, d).

Figura 19 - Avaliação da inibição da formação de clones celulares de Panc1 tratados com os derivados LPSF/MG-3 e LPSF/MG-7.

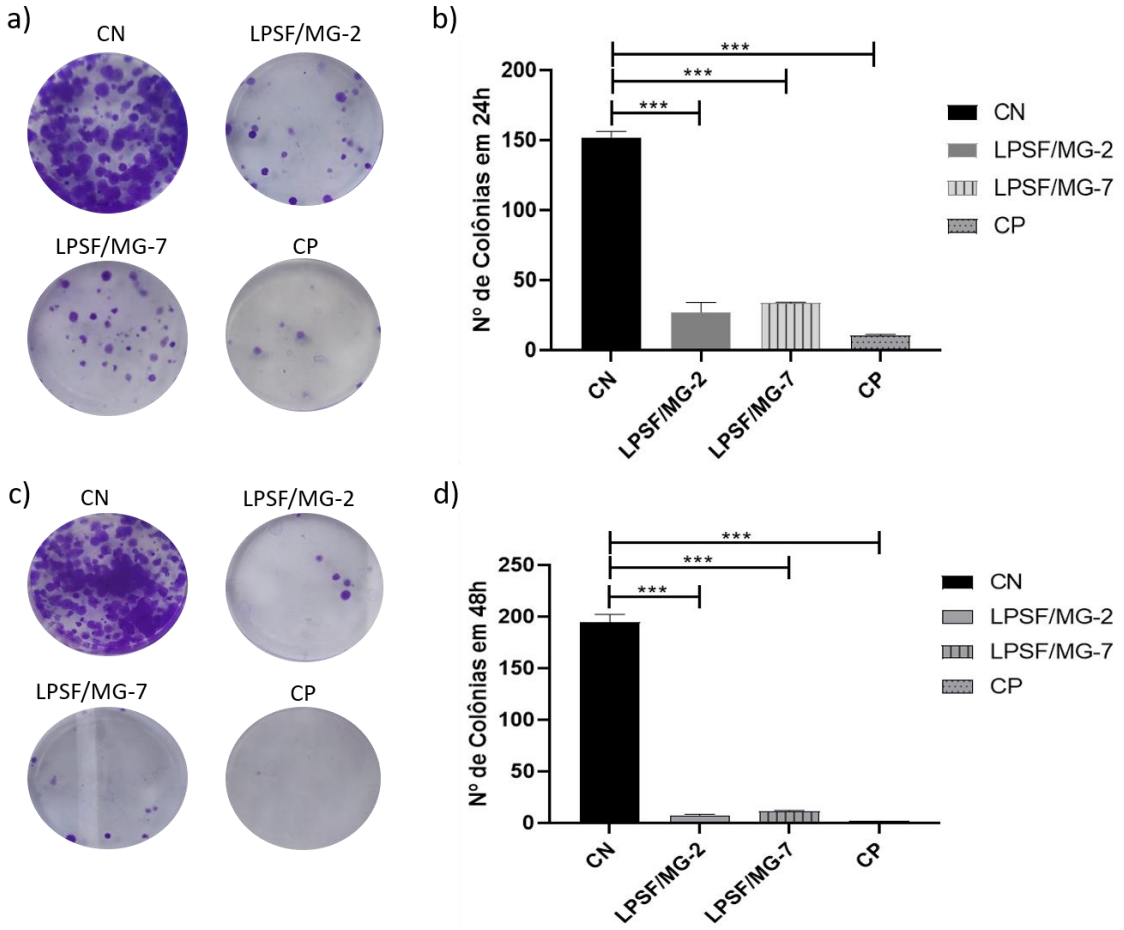


a) Imagem representativa das colônias formadas após tratamento das células nas concentrações CI50 LPSF/MG-3 (65,64 µM) e LPSF/MG-7 (50,22 µM) no tempo de 24 horas; b) Gráfico de comparação da quantificação de colônias formadas após tratamento no tempo de 24 horas; c) Imagem representativa das colônias formadas após tratamento das células nas concentrações CI50 LPSF/MG-3 (65,64 µM) e LPSF/MG-7 (50,22 µM) no tempo de 48 horas; d) Gráfico de comparação da quantificação de colônias formadas após tratamento no tempo de 24 horas. A gemcitabina (1 µM) foi usada como controle positivo (CP). Controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO; 0,1%.). Os valores correspondem à média ± DP de três experimentos independentes realizados em triplicata, ***p< 0,05.

Fonte: Próprios autores, 2023.

Para a linhagem Mia-Paca-2 foi avaliado a influência do tratamento com o derivado LPSF/MG-2 e LPSF/MG-7, sobre a formação de clones após o tratamento das células durante 24 (figura 20-a,b) e 48 horas (figura 20-c,d) com a concentração do CI50. A molécula LPSF/MG-2 promoveu inibição de 87,15% ($p < 0,0001$) do número de clones no tempo de 24 horas (Figura 20-b) e de 95,92% ($p < 0,0001$) no tempo de 48 horas (Figura 20-d), quando comparado ao controle negativo, enquanto para a molécula LPSF/MG-7 a inibição no tempo de 24h foi de 78,71% ($p < 0,0001$) (Figura 20-b) e de 93,88% ($p < 0,0001$) (Figura 20-c), comparando-se ao controle negativo.

Figura 20 - Avaliação da inibição da formação de clones celulares de Mia-paca2 tratados após 24 horas (a) e 48 horas (b) com o derivado LPSF/MG-2 e LPSF/MG-7.



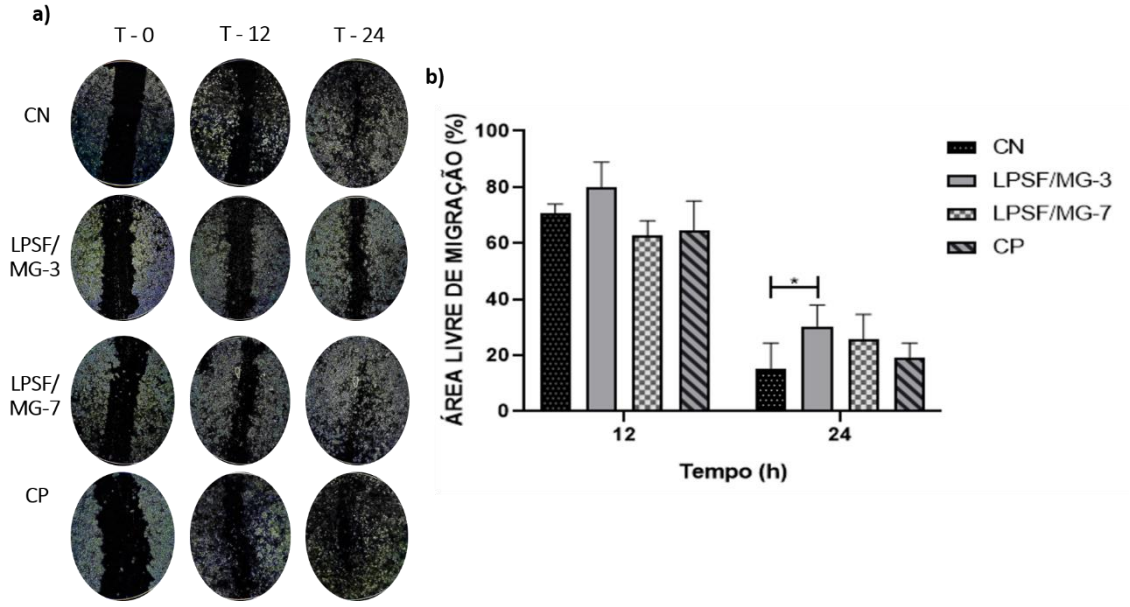
a) Imagem representativa das colônias formadas após tratamento das células nas concentrações CI50 LPSF/MG-2 (17,19 µM) e LPSF/MG-7 (13,92 µM) no tempo de 24 horas; b) Gráfico de comparação da quantificação de colônias formadas após tratamento no tempo de 24 horas; c) Imagem representativa das colônias formadas após tratamento das células nas concentrações CI50 LPSF/MG-2 (17,19 µM) e LPSF/MG-7 (13,92 µM) no tempo de 48 horas; d) Gráfico de comparação da quantificação de colônias formadas após tratamento no tempo de 24 horas. A gemcitabina (1 µM) foi usada como controle positivo (CP). Controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO; 0,1%.). Os valores correspondem à média ± DP de três experimentos independentes realizados em triplicata, ***$p< 0,05$.

Fonte: Próprios autores, 2023.

Todos os achados dos ensaios de inibição de formação de clones pelo composto LPSF/MG-7 foram bastante promissores, assim como o LPSF/MG-2, embora este último tenha demonstrado efeito apenas na linhagem de Mia-paca-2. Estes achados corroboram com outros estudos realizados com compostos do tipo imidazolidina-2,4-diona, onde compostos de mesmo tipo demonstraram efeito de redução da formação de clones de linhagens de adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231) e câncer de pulmão (A549) (ZHANG et al., 2017a), bem como, estudo realizado com linhagens celulares de câncer de pâncreas (Mia-paca-2) e câncer de pele (A375) (GILL et al., 2017).

Posteriormente foi avaliado a capacidade de inibição da migração celular após o tratamento com os derivados LPSF/MG-2 e LPSF/MG-7 na linhagem de Mia-paca2 e na linhagem de Panc1 com os compostos LPSF/MG-3 e LPSF/MG-7 (figura 21). Na linhagem de Panc1 no tempo de 12 horas a inibição da migração celular não foi significativa estatisticamente, sendo observado no controle negativo 70,49% de área livre, enquanto que para o LPSF/MG-3 a área livre correspondeu a 79,84%, para o LPSF/MG-7 a área livre foi de 62,77% e para o controle positivo (gemcitabina) a área livre foi de 64,67%. No tempo de 24 horas, a linhagem de Panc1 persistiu a tendência de diminuição da inibição da migração, onde o controle negativo demonstrou 15,20% de área livre, para o LPSF/MG-7 a área livre foi de 25,79%, controle positivo (gemcitabina) a área livre foi de 19,06% e para o LPSF/MG-3 a área livre correspondeu a 30,37% (p=0,0441), sendo a LPSF/MG-3 no tempo de 24 horas a única inibição significativa estatisticamente.

Figura 21 - Avaliação da inibição da migração celular na linhagem de câncer de pâncreas Panc1 tratados no tempo de 12 e 24 horas com os compostos LPSF/MG-3 e LPSF/MG-7, controle negativo (DMSO 0,1%) e controle positivo (gemcitabina 1µM).

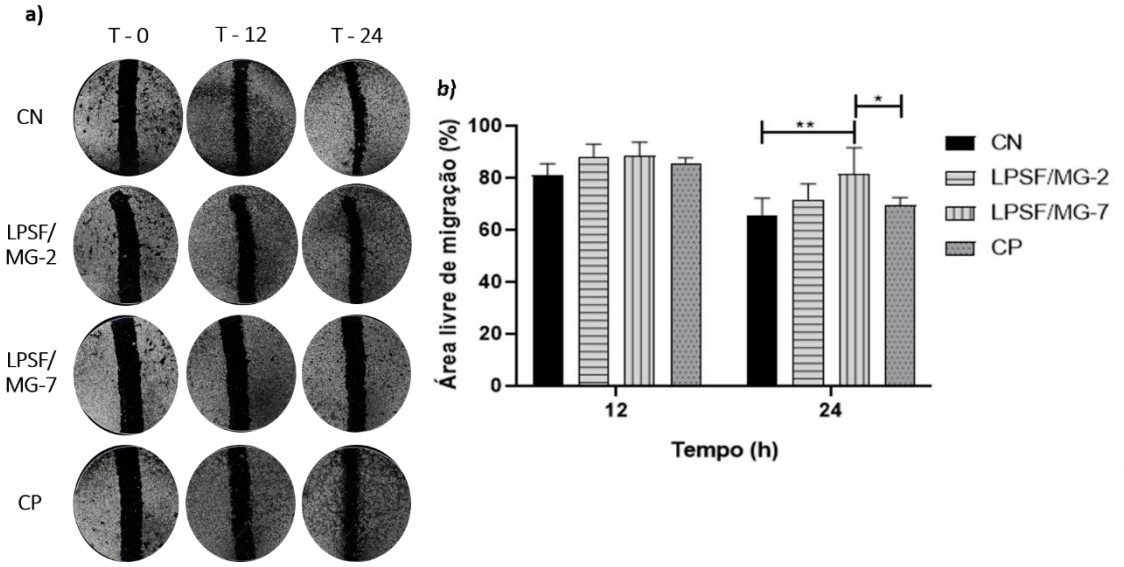


a) Imagem representativa das colônias formadas após tratamento das células nas concentrações CI50 LPSF/MG-3 (65,64 µM) e LPSF/MG-7 (50,22 µM) no tempo final de 24 horas; b) Gráfico de comparação da quantificação de colônias formadas após tratamento no tempo de 24 horas. A gemcitabina (1 µM) foi usada como controle positivo (CP). Controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO; 0,1%.). Os valores correspondem à média ± DP de três experimentos independentes realizados em triplicata, * p< 0,05; ** p< 0,001.

Fonte: Próprios autores, 2023.

Na figura 22 é possível observar a inibição da migração no tempo de 12 e 24 horas da linhagem de Mia-Paca-2. No tempo de 12 horas, o controle negativo demonstrou 81,10% de área livre, enquanto que a condição tratada com o LPSF/MG-2 a área livre correspondeu a 82,77%, para o LPSF/MG-7 a área livre foi de 88,58% e o controle positivo (gemcitabina) exibiu área livre foi de 85,68%, não sendo significativa estatisticamente a inibição da migração celular no tempo de 12 horas para nenhuma das condições. No tempo de 24 horas a linhagem de Mia-Paca-2 manteve a tendência de diminuição da migração, visto que o controle negativo demonstrou 65,40% de área livre, o LPSF/MG-2 exibiu área livre correspondente a 71,67%, a condição tratada com o LPSF/MG-7 levou a uma área livre de 81,46% (p=0,0002) e o controle positivo (gemcitabina) exibiu área livre de 69,48%. A molécula LPSF/MG-7 demonstrou ter tido melhor retardo de migração celular que o controle positivo de gemcitabina (p=0,0014).

Figura 22 - Avaliação da inibição da migração celular na linhagem de câncer de pâncreas Mia-paca2 tratados no tempo de 12 e 24 horas com os compostos LPSF/MG-2 e LPSF/MG-7, controle negativo (DMSO 0,1%) e controle positivo (gemcitabina 1µM).



a) Imagem representativa das colônias formadas após tratamento das células nas concentrações CI50 LPSF/MG-2 (17,19 µM) e LPSF/MG-7 (13,92 µM) no tempo final de 24 horas; b) Gráfico de comparação da quantificação de colônias formadas após tratamento no tempo de 24 horas. A gemcitabina (1 µM) foi usada como controle positivo (CP). Controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO; 0,1%.). Os valores correspondem à média ± DP de três experimentos independentes realizados em triplicata, * p< 0,05; ** p< 0,001.

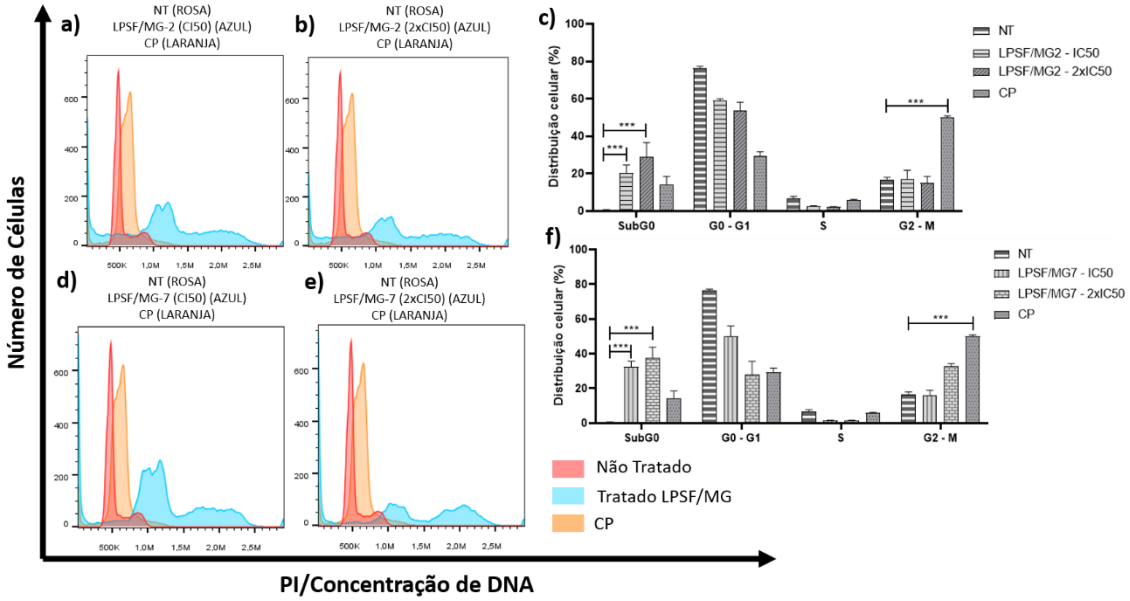
Fonte: Próprios autores, 2023.

No ensaio de inibição de migração celular com a linhagem Panc1, os compostos LPSF/MG-3 e LPSF/MG-7 demonstraram efeito de inibição, contanto pode-se destacar o composto LPSF/MG-7 como o mais promissor, uma vez que, o mesmo demonstrou resultados significativos na outra linhagem de câncer de pâncreas, Mia-paca-2. A inibição de migração é um fenômeno importante na cancerologia, pois muitos tumores são capazes de desenvolver invasão de outros tecidos. Tal achado tanto apresentam melhor resultados que os relatados na literatura, como também corrobora com estudos realizados com moléculas de imidazolidinas que foram capazes de inibir a migração de células de câncer de próstata (PC-3) em concentração de 50 a 200 µM, compostos estes que também possuíam em suas cadeias ramificação do tipo metil e cloro, como as avaliadas neste estudo (KHANFAR; EL SAYED, 2010).

A possível interferência no ciclo celular das linhagens de Mia-paca2 e Panc1 foi analisado na variação de 48 e 72 horas e ainda com a uma variação de dose de CI50 e o dobro do CI50. Na linhagem de Mia-paca-2 nas concentrações de CI50 e o dobro do CI50, no tempo de 48 horas de tratamento com as moléculas LPSF/MG-2 (figura 23-a, b, c) e LPSF/MG-7 (figura 23-d, e, f); identificou-se que ambas tiveram comportamentos de aumento da concentração de células na fase sub-G0, por consequência parada do ciclo na

fase Sub-G0, sendo que o percentual de células na fase SubG0 foi de 20,52 % (p<0,0001) para LPSF/MG-2 (figura 23-a,c) e de 32,42% (p<0,0001) LPSF/MG-7 (figura 23-d,f), ambos os resultados na concentração do CI50. Na condição do dobro do CI50, o LPSF/MG-2 demonstrou se manter o aumento de células na fase SubG0 em 29,0% (p<0,0001) (figura 23-b, c) e o mesmo ocorreu para LPSF/MG-7 com 37,5% (p<0,0001) (figura 23-e,f), neste mesmo tempo de tratamento o controle positivo (gemcitabina) (CI50=1 µM) apresentou arraste do ciclo celular em G2-M com percentual de 50,02% (p<0,0001) das células nesta fase (figura 23-c,f).

Figura 23 - Avaliação da influência sobre o ciclo celular do tratamento com LPSF/MG-2 e LPSF/MG-7 na dose de CI50 e o dobro do CI50 na linhagem de câncer de pâncreas Mia-paca-2 no tempo de 48 horas.



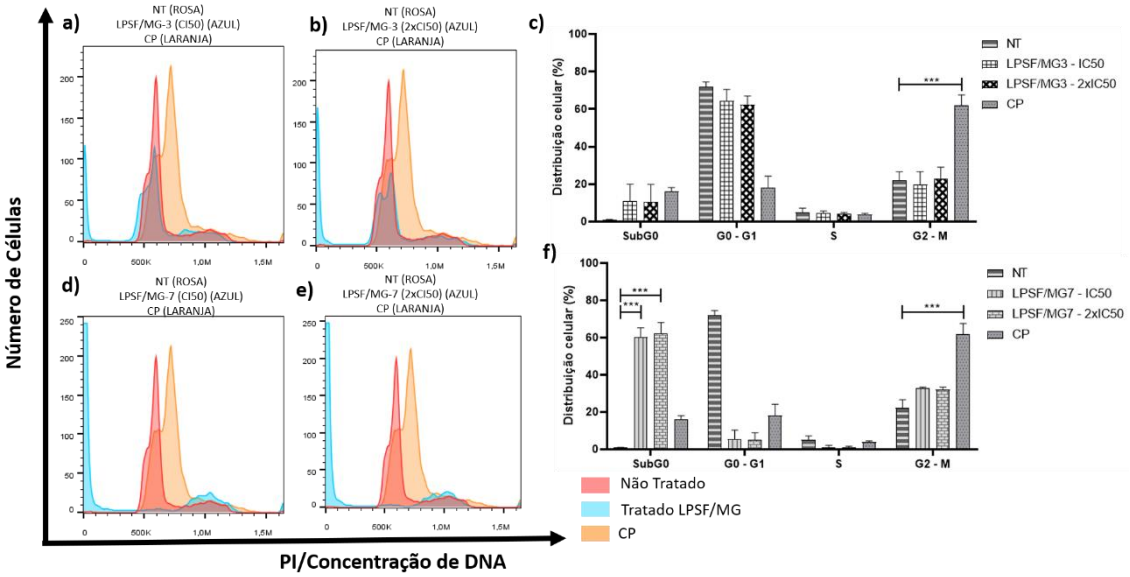
a) Histograma comparativo entre o NT, LPSF/MG-2 (na dose de CI50) e CP; b) Histograma comparativo entre o NT, LPSF/MG-2 (na dose do dobro de CI50) e CP; c) Gráfico de quantificação média das células por fase do ciclo celular e comparação entre as condições de NT, LPSF/MG-2 (na dose de CI50 e o do dobro de CI50) no tempo de 48 horas;; d) Histograma comparativo entre o NT, LPSF/MG-7 (na dose de CI50) e CP; e) Histograma comparativo entre o NT, LPSF/MG-7 (na dose do dobro de CI50) e CP; f) Gráfico de quantificação média das células por fase do ciclo celular e comparação entre as condições de NT, LPSF/MG-7 (na dose de CI50 e o do dobro de CI50) no tempo de 48 horas. A gemcitabina (1 µM) foi usada como controle positivo (CP). Controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO; 0,1%.). Os valores correspondem à média ± DP de três experimentos independentes realizados em triplicata, * p< 0,05; ** p< 0,001; ***p<0,0005.

Fonte: Próprios autores, 2023.

Ainda na análise de interferência do ciclo no tempo de 48 horas na linhagem Panc1, a molécula LPSF-MG3 não demostrou fazer interferência no ciclo celular em

todas as condições de variação de dose de CI50 (figura 24-a, b, c). Contudo a molécula LPSF/MG-7 na dose de CI50 (figura 24-d, f) demonstrou parada do ciclo celular na fase Sub-G0 com 60,35% (p<0,0001) das células na fase SubG0 e no dobro do CI50 havia 62,15% (p<0,0001) de células (figura 24-e, f).

Figura 24 - Avaliação da influência sobre o ciclo celular do tratamento com LPSF/MG-3 e LPSF/MG-7 na dose de CI50 e o dobro do CI50 na linhagem de câncer de pâncreas Panc1 no tempo de 48 horas.



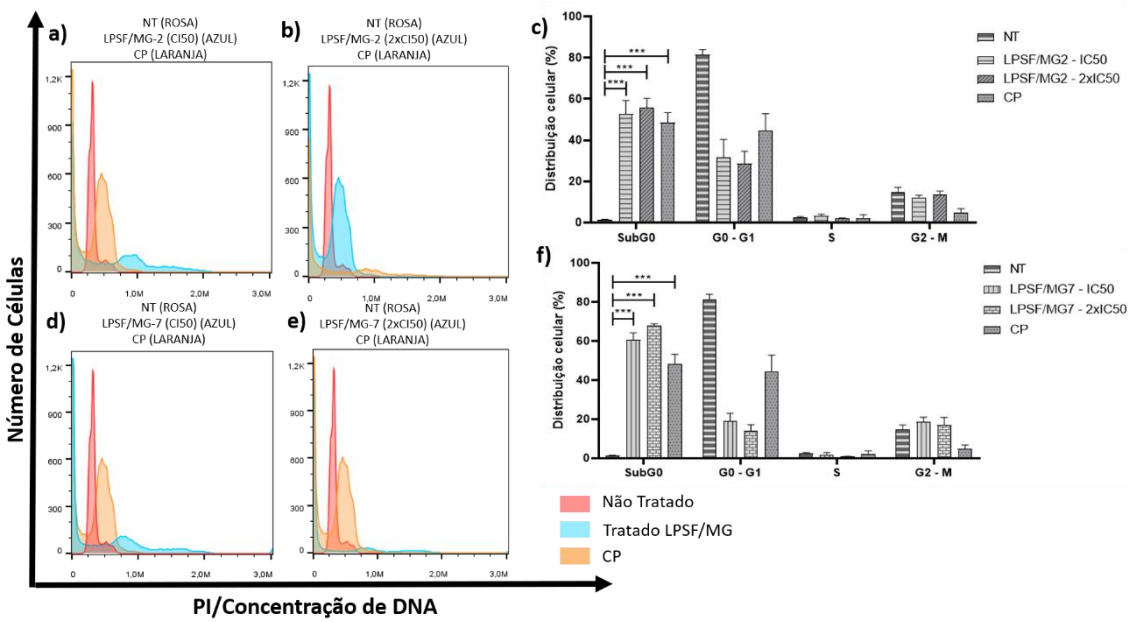
a) Histograma comparativo entre o NT, LPSF/MG-3 (na dose de CI50) e CP; b) Histograma comparativo entre o NT, LPSF/MG-3 (na dose do dobro de CI50) e CP; c) Gráfico de quantificação média das células por fase do ciclo celular e comparação entre as condições de NT, LPSF/MG-3 (na dose de CI50 e o do dobro de CI50) no tempo de 48 horas;; d) Histograma comparativo entre o NT, LPSF/MG-7 (na dose de CI50) e CP; e) Histograma comparativo entre o NT, LPSF/MG-7 (na dose do dobro de CI50) e CP; f) Gráfico de quantificação média das células por fase do ciclo celular e comparação entre as condições de NT, LPSF/MG-7 (na dose de CI50 e o do dobro de CI50) no tempo de 48 horas. A gemcitabina (1 μM) foi usada como controle positivo (CP). Controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO; 0,1%.). Os valores correspondem à média ± DP de três experimentos independentes realizados em triplicata, * p< 0,05; ** p< 0,001; ***p<0,0005.

Fonte: Próprios autores, 2023.

No ensaio de ciclo celular na condição de tratamento de 72 horas observou-se que na linhagem de Mia-paca2, houve a parada das células na fase SubG0, demonstrando parada do ciclo celular, a molécula LPSF/MG-2 na dose de CI50 (figura 25-a, c) apresentou 52,57% (p<0,0001) das células paradas na fase Sub-G0 e na dose de o dobro do CI50 55,7% (p<0,0001), na mesma fase (figura 25-b, c). Ainda na linhagem de Mia-paca-2 a molécula LPSF/MG-7 na dose de CI50 (figura 25-d, f) apresentou 60,57% das células na fase SubG0 e no dobro do CI50 esteve 68,02% (p<0,0001) das células (figura

25-e, f). No tempo de 72 horas o controle positivo também demonstrou parada do ciclo celular com média de 48,42% de células na fase SubG0 (figura 25-c, f).

Figura 25 - Avaliação da influência sobre o ciclo celular do tratamento com LPSF/MG-2 e LPSF/MG-7 na dose de CI50 e o dobro do CI50 na linhagem de câncer de pâncreas Mia-paca-2 no tempo de 72 horas.

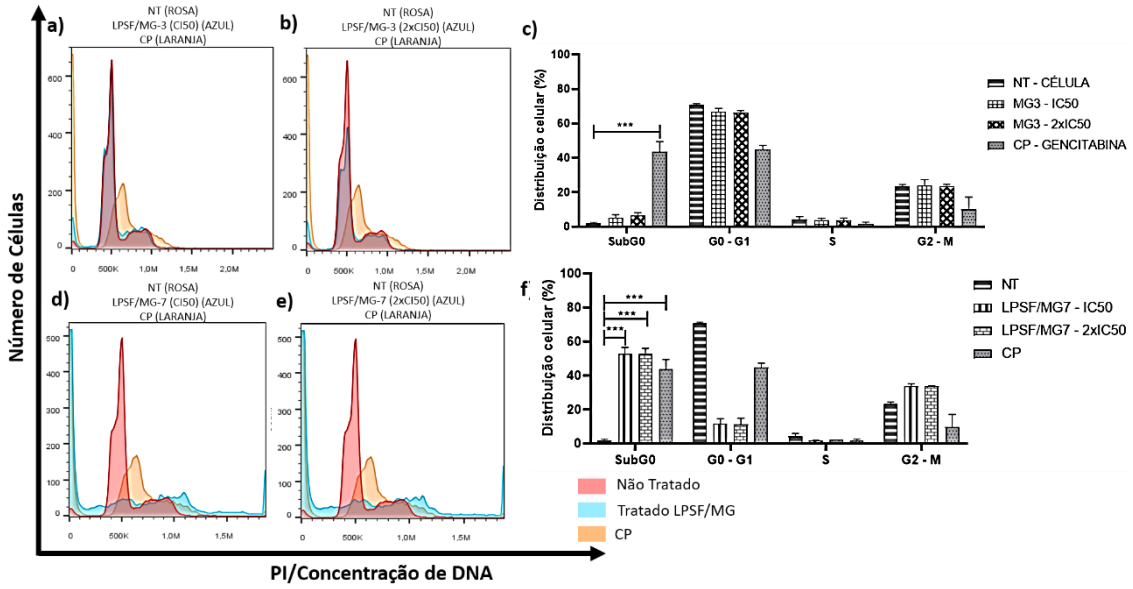


a) Histograma comparativo entre o NT, LPSF/MG-2 (na dose de CI50) e CP; b) Histograma comparativo entre o NT, LPSF/MG-2 (na dose do dobro de CI50) e CP; c) Gráfico de quantificação média das células por fase do ciclo celular e comparação entre as condições de NT, LPSF/MG-2 (na dose de CI50 e o do dobro de CI50) no tempo de 72 horas;; d) Histograma comparativo entre o NT, LPSF/MG-7 (na dose de CI50) e CP; e) Histograma comparativo entre o NT, LPSF/MG-7 (na dose do dobro de CI50) e CP; f) Gráfico de quantificação média das células por fase do ciclo celular e comparação entre as condições de NT, LPSF/MG-7 (na dose de CI50 e o do dobro de CI50) no tempo de 72 horas. A gemcitabina (1 µM) foi usada como controle positivo (CP). Controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO; 0,1%.). Os valores correspondem à média ± DP de três experimentos independentes realizados em triplicata, * p< 0,05; ** p< 0,001; ***p<0,0005.

Fonte: Próprios autores, 2023.

No tempo de 72 horas a análise de possível interferência de ciclo na linhagem Panc1, a molécula LPSF-MG3 não demostrou fazer interferência no ciclo celular em mesmo nas condições de variação de dose de CI50 (figura 26-a, b, c). Contudo, na linhagem de Panc1 a molécula LPSF/MG-7 demonstrou parada do ciclo celular na fase Sub-G0, apresentando percentual de células na fase SubG0 de 52,55% (p<0,0001) no tratamento da dose de CI50 (figura 26-c, f) e 52,9% (p<0,0001) no dobro da dose de CI50 (figura 26-e, f). O controle positivo de gemcitabina (CI50=1 µM) apresentou parada do ciclo celular na fase SubG0 com 45,55% (p<0,0001) de células (figura 26).

Figura 26 - Avaliação da influência sobre o ciclo celular do tratamento com LPSF/MG-3 e LPSF/MG-7 na dose de CI50 e o dobro do CI50 na linhagem de câncer de pâncreas Panc1 no tempo de 72 horas.



a) Histograma comparativo entre o NT, LPSF/MG-3 (na dose de CI50) e CP; b) Histograma comparativo entre o NT, LPSF/MG-3 (na dose do dobro de CI50) e CP; c) Gráfico de quantificação média das células por fase do ciclo celular e comparação entre as condições de NT, LPSF/MG-3 (na dose de CI50 e o do dobro de CI50) no tempo de 72 horas;; d) Histograma comparativo entre o NT, LPSF/MG-7 (na dose de CI50) e CP; e) Histograma comparativo entre o NT, LPSF/MG-7 (na dose do dobro de CI50) e CP; f) Gráfico de quantificação média das células por fase do ciclo celular e comparação entre as condições de NT, LPSF/MG-7 (na dose de CI50 e o do dobro de CI50) no tempo de 72 horas. A gemcitabina (1 μM) foi usada como controle positivo (CP). Controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO; 0,1%.). Os valores correspondem à média ± DP de três experimentos independentes realizados em triplicata, * p< 0,05; ** p< 0,001; ***p<0,0005.

Fonte: Próprios autores, 2023.

Novas abordagens terapêuticas anticâncer para planejamento e síntese de compostos tem sido desenvolvidas afim de interferir simultaneamente entre eventos biológicos, com grande importância a interferência no ciclo celular de regulação ou parada do mesmo, o que pode por ventura contribuir para a morte celular (CAVAZZONI et al., 2008; MARTINS, 2012; SPENGLER, 2011).

No presente estudo pode-se destacar o composto LPSF/MG-7, o qual foi capaz de interferir no ciclo celular levando ao aumento das células ao estado de Sub-G0 nas diferentes linhagens de modo significativo, assim como o controle gemcitabina, que fez arraste para a fase G2-M no tempo de 48h e no tempo de 72 horas foi observado o mesmo comportamento, a LPSF/MG-7 levou ao aumento de células em Sub-G0. Estes achados

de parada do ciclo celular na fase Sub-G0 são corroborados por outros estudos, os quais também realizaram avaliação de interferência do ciclo celular com moléculas de imidazolidina-2,4-diona que possuíam em sua estrutura grupos funcionais metil e bromo e ambas as moléculas levaram também o aumento de células no estado de Sub-G0 em câncer de pâncreas (Mia-paca-2) e câncer de pele (A375) (GILL et al., 2017).

Outros estudos realizados também com compostos de imidazolidina gente com o agente propil-2-(8-(3,4-difluorobenzil)-29,59-dioxo-8-azaspiro[biciclo[3.2.1]octano-3,49-imidazolidina]-19-il)acetato em linhagens tumorais de leucemia linfócítica aguda (Reh) e leucemia mieloide crônica (K562), apresentaram também efeitos de parada no ciclo celular na fase Sub-G0, foi identificado ainda aumento do percentual de células na mesma fase com o aumento da concentração do composto, sendo o CI50 deste estudo de 37 μM (KHANFAR; EL SAYED, 2010).

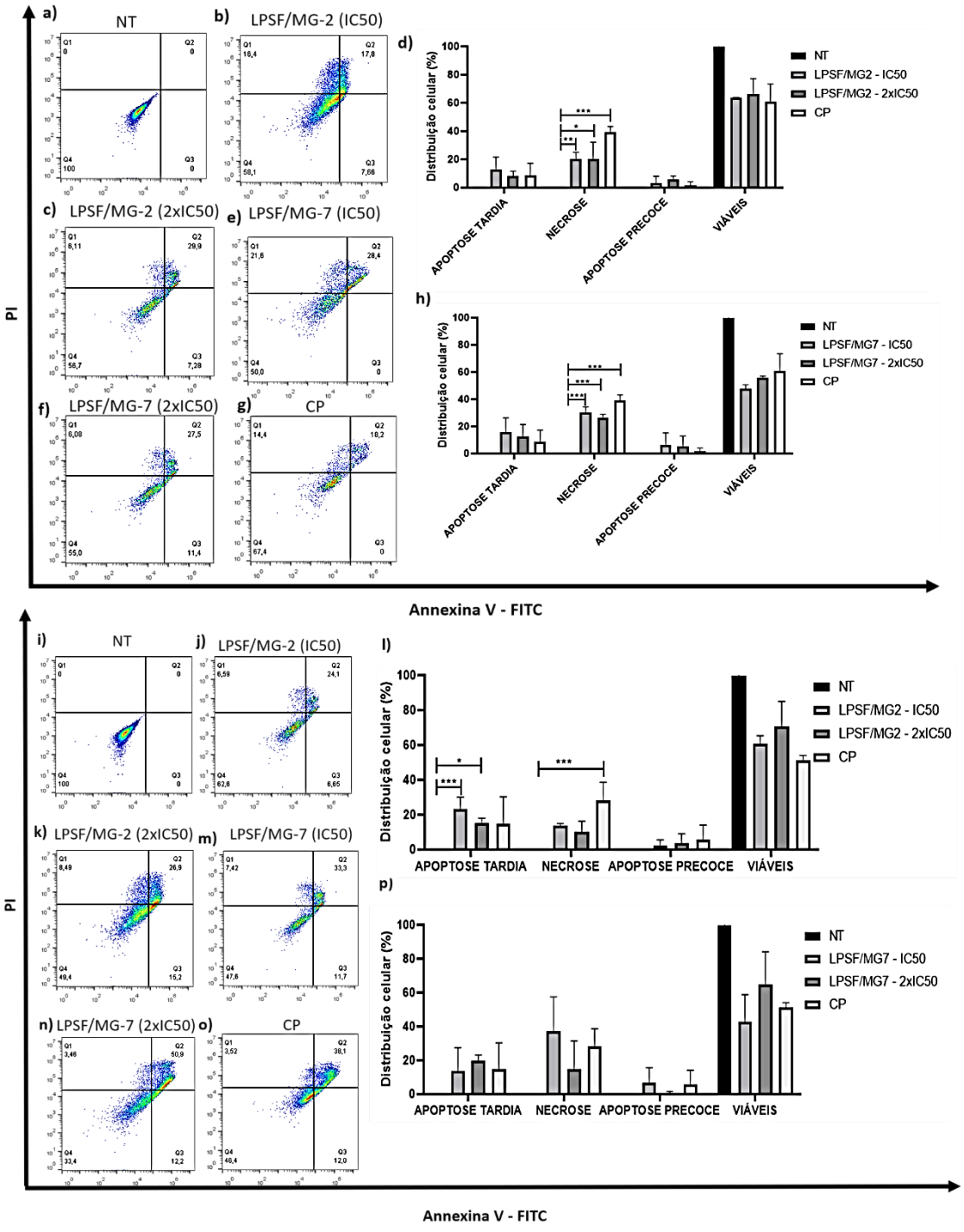
Na avaliação do perfil de indução de morte através do método de citometria de fluxo e aplicação dos fluoróforos anexina V-FITC e iodeto de propídeo nas linhagens de Mia-paca2 e Panc1, utilizou-se com condição a variação de tempo de 48 e 72 horas e também variação de concentração de CI50 e o dobro do CI50 para os compostos LPSF/MG-2, LPSF/MG-3 e LPSF/MG-7.

No tempo de 48 horas, a linhagem de Mia-paca2, no tratamento com o composto LPSF/MG-2 na dose de CI50 (figura 27-b, d) demonstrou indução de morte por necrose de 20,4% (p =0,0067), valor aproximado houve também na dose do dobro do CI50 que foi de 20,8% (p = 0,0107) (figura 27-c, d); ainda frente a linhagem de Mia-paca2 a molécula LPSF/MG-7 demonstrou indução de morte por necrose de 30,02% (p = 0,0002) para a dose de CI50 (figura 27-e, h) e 26,32% (p = 0,0005) de indução de necrose para a dose de o dobro do CI50 (figura 27-f, h). O controle positivo para indução de morte, gemcitabina (CI50=1 μM), no tempo de 48 horas apresentou indução de morte por necrose de 39,12% (p = 0,0020) (figura 27-g, h).

No tempo de 72 horas para a linhagem de Mia-paca2 o composto LPSF/MG-2 na dose de CI50 demonstrou indução de morte por apoptose tardia de 23,05% (p =0,0009) (figura 27-j, l), sendo observado na dose do dobro do CI50 o valor de 15,07% (p = 0,0466) (figura 27-k, l); ainda frente a linhagem de Mia-paca2 a molécula LPSF/MG-7 demonstrou indução de morte por necrose de 30,07% (p = 0,0005) para a dose de CI50 (figura 27-m, p) 19,62% (p = 0,0265) de indução de apoptose tardia para a dose de o dobro

do CI50 (figura 27-n, p). O controle positivo para indução de morte, gemcitabina (CI50=1 µM), no tempo de 72 horas apresentou indução de morte de 28,35% (p <0,0001) por necrose (figura 27-o, l, p).

Figura 27 - Avaliação do perfil de indução de morte no tratamento com LPSF/MG-2 e LPSF/MG-7 na dose de CI50 e o dobro do CI50 na linhagem de câncer de pâncreas Mia-paca-2 no tempo de 48 e 72 horas.



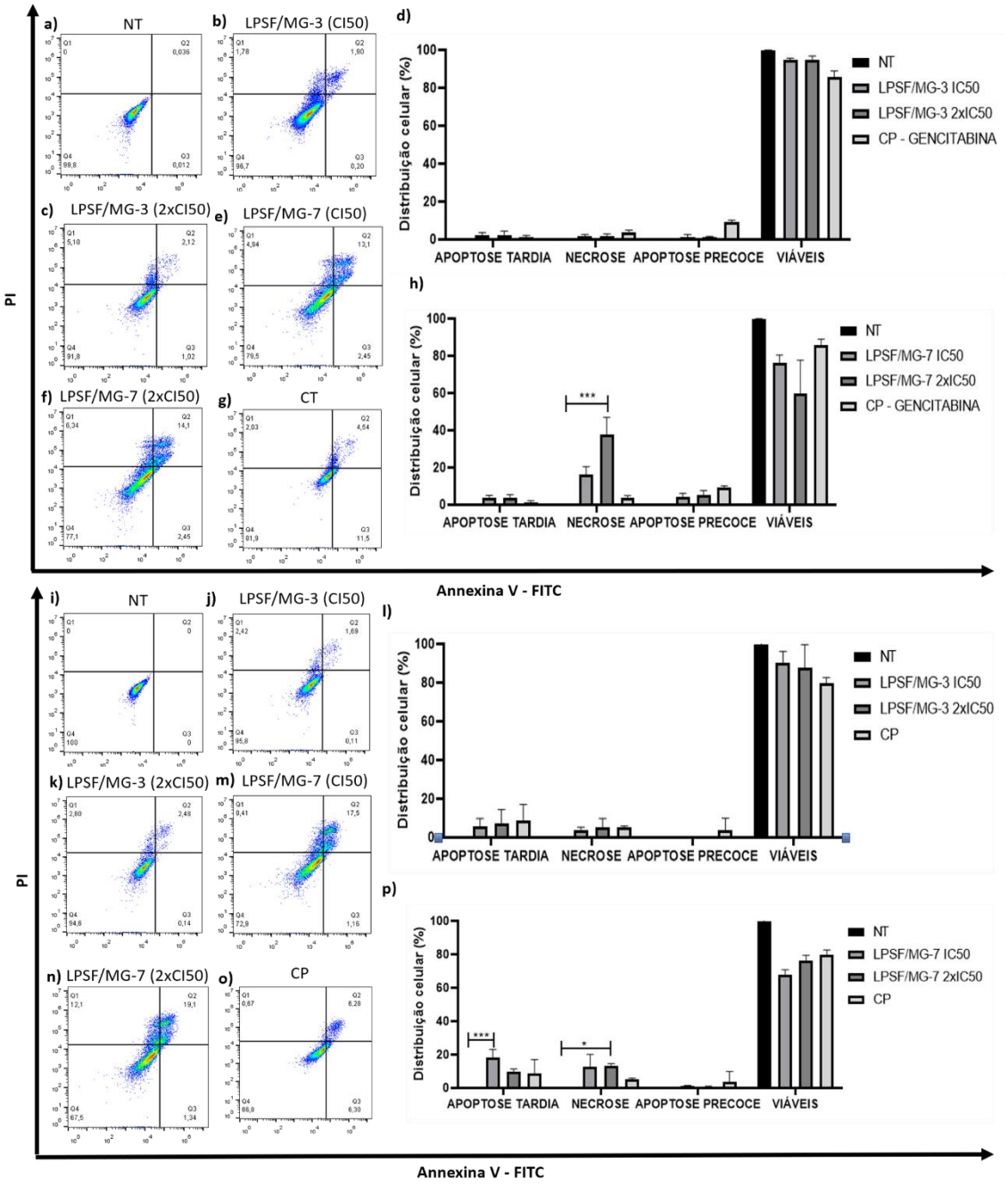
a) Gráfico dot plot na condição de NT; b) Gráfico dot plot na condição de LPSF/MG-2 (dose de CI50); c) Gráfico dot plot na condição de LPSF/MG-2 (dobro da dose de CI50); d) Gráfico de quantificação média das células por perfil de indução de morte celular e comparação entre os perfis de morte no tempo de 48 horas; e) Gráfico dot plot na condição de LPSF/MG-7 (dose de CI50); f) Gráfico dot plot na condição de LPSF/MG-7 (dobro da dose de CI50); g) Gráfico dot plot na condição do CP; h) Gráfico de quantificação média das células por perfil de indução de morte celular e comparação entre os perfis de morte no tempo de 48 horas. i) Gráfico dot plot na condição de NT no tempo de 72 horas; j) Gráfico dot plot na condição de LPSF/MG-2 (dose de CI50) no tempo de 72 horas; k) Gráfico dot plot na condição de LPSF/MG-2 (dobro da dose de CI50) no tempo de 72 horas; l) Gráfico de quantificação média das células por perfil de indução de morte celular e comparação entre os perfis de morte no tempo de 72 horas; m) Gráfico dot plot na condição de LPSF/MG-7 (dose de CI50) no tempo de 72 horas; n) Gráfico dot plot na condição de LPSF/MG-7 (dobro da dose de CI50) no tempo de 72 horas; o) Gráfico dot plot na condição do CP no tempo de 72 horas; p) Gráfico de quantificação média das células por perfil de indução de morte celular e comparação entre os perfis de morte no tempo de 72 horas. A gemcitabina (1 μM) foi usada como controle positivo (CP). Controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO; 0,1%.). Os valores correspondem à média ± DP de três experimentos independentes realizados em triplicata, * $p< 0,05$; ** $p< 0,001$; ***$p<0,0005$.

Fonte: Próprio autor, 2023.

Na linhagem de Panc1 não foi observado indução de morte significativa pela molécula LPSF/MG-3 (figura 28-b, c, d), porém a molécula LPSF/MG-7 demonstrou indução de morte por necrose de16,06% ($p = 0,0008$) no tempo de 48 horas (figura 28-e, h).

No tempo de tratamento de 72 horas na linhagem de Panc1 não foi observado indução de morte significativa pela molécula LPSF/MG-3 (figura 28-j, k, l) também no tempo de 72 horas, porém a molécula LPSF/MG-7 demonstrou indução de morte por apoptose tardia de 20,52% ($p = 0,0026$) na dose de CI50 (figura 28-m, p) e de 13,23 % ($p = 0,0052$) de indução por necrose na dose do dobro do CI50 (figura 28-n, p). Ainda na linhagem de Panc1, o controle positivo para indução de morte, gemcitabina (CI50=1 μM), no tempo de 72 horas apresentou indução de morte de 12,23% por necrose (figura 28-o, p).

Figura 28 - Avaliação do perfil de indução de morte no tratamento com LPSF/MG-3 e LPSF/MG-7 na dose de CI50 e o dobro do CI50 na linhagem de câncer de pâncreas Panc1 no tempo de 48 e 72 horas.



a) Gráfico dot plot na condição de NT; b) Gráfico dot plot na condição de LPSF/MG-3 (dose de CI50); c) Gráfico dot plot na condição de LPSF/MG-3 (dobro da dose de CI50); d) Gráfico de quantificação média das células por perfil de indução de morte celular e comparação entre os perfis de morte no tempo de 48 horas; e) Gráfico dot plot na condição de LPSF/MG-7 (dose de CI50); f) Gráfico dot plot na condição de LPSF/MG-7 (dobro da dose de CI50); g) Gráfico dot plot na condição do CP; h) Gráfico de quantificação média das células por perfil de indução de morte celular e comparação entre os perfis de morte no tempo de 48 horas. i) Gráfico dot plot na condição de NT no tempo de 72 horas; j) Gráfico dot plot na condição de LPSF/MG-3 (dose de CI50) no tempo de 72 horas; k) Gráfico dot plot na condição de LPSF/MG-3 (dobro da dose de CI50) no tempo de 72 horas; l) Gráfico de quantificação média das células por perfil de indução de morte celular e comparação entre os perfis de morte no tempo de 72 horas; m) Gráfico dot plot na condição de LPSF/MG-7 (dose de CI50) no tempo de 72 horas; n) Gráfico dot plot na condição de LPSF/MG-7 (dobro da dose de CI50) no tempo de 72 horas; o) Gráfico dot plot na condição do CP no tempo de 72 horas; p) Gráfico de quantificação média das células por perfil de indução de morte celular e comparação entre os perfis de morte no tempo de 72 horas. A gemcitabina (1 μM) foi usada como controle

positivo (CP). Controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO; 0,1%.). Os valores correspondem à média ± DP de três experimentos independentes realizados em triplicata, * p< 0,05; ** p< 0,001; ***p<0,0005.

Fonte: Próprio autor, 2023.

O composto LPSF/MG-2 e LPSF/MG-7 demonstraram serem capazes de induzir morte celular por apoptose tardia e necrose na linhagem de Mia-paca2, tanto nas concentrações de CI50 como o dobro desta, o mesmo comportamento foi observado para o controle positivo de gemcitabina. As células tumorais inibem os mecanismos de morte celular, para deste modo permitir a evolução dos tumores, logo compostos que induzem a morte destas células é uma estratégia terapêutica válida para o desenvolvimento de novos agentes anticâncer (DOS SANTOS et al., 2016).

Estudos de perfil de morte realizados com moléculas de imidazolidinas em linhagens tumorais de leucemia linfócítica aguda (Reh) e leucemia mieloide crônica (K562), apresentaram também efeitos que corroboram com o presente estudo, onde foi identificado indução de morte com taxas de 16 a 40% de células em indução de morte por necrose, em concentrações de 50 a 250 µM (KHANFAR; EL SAYED, 2010). Estudo também realizados com compostos do tipo imidazolidina foram realizados em linhagens de câncer de fígado (Hep-G2) e foi observado indução de morte por apoptose tardia e necrose (NAFIE et al., 2022).

Embora o principal tipo de morte mais citado na literatura seja o de apoptose por esta ser um tipo de morte programada e individual, “célula a célula”, e que pode ocorrer por diferentes vias: intrínseca e a extrínseca, sem causar tanto dano ao tecido como um todo, logo tais características justifica esta ser dita por muitas vezes como ideal(Alkahtani et al., 2019). Contudo a via da necrose, foi conhecida como um processo de morte que ocorre de maneira abrupta e com geração de proteínas pró-inflamatória como as interleucinas(Islam et al., 2016; Suvarna et al., 2019).

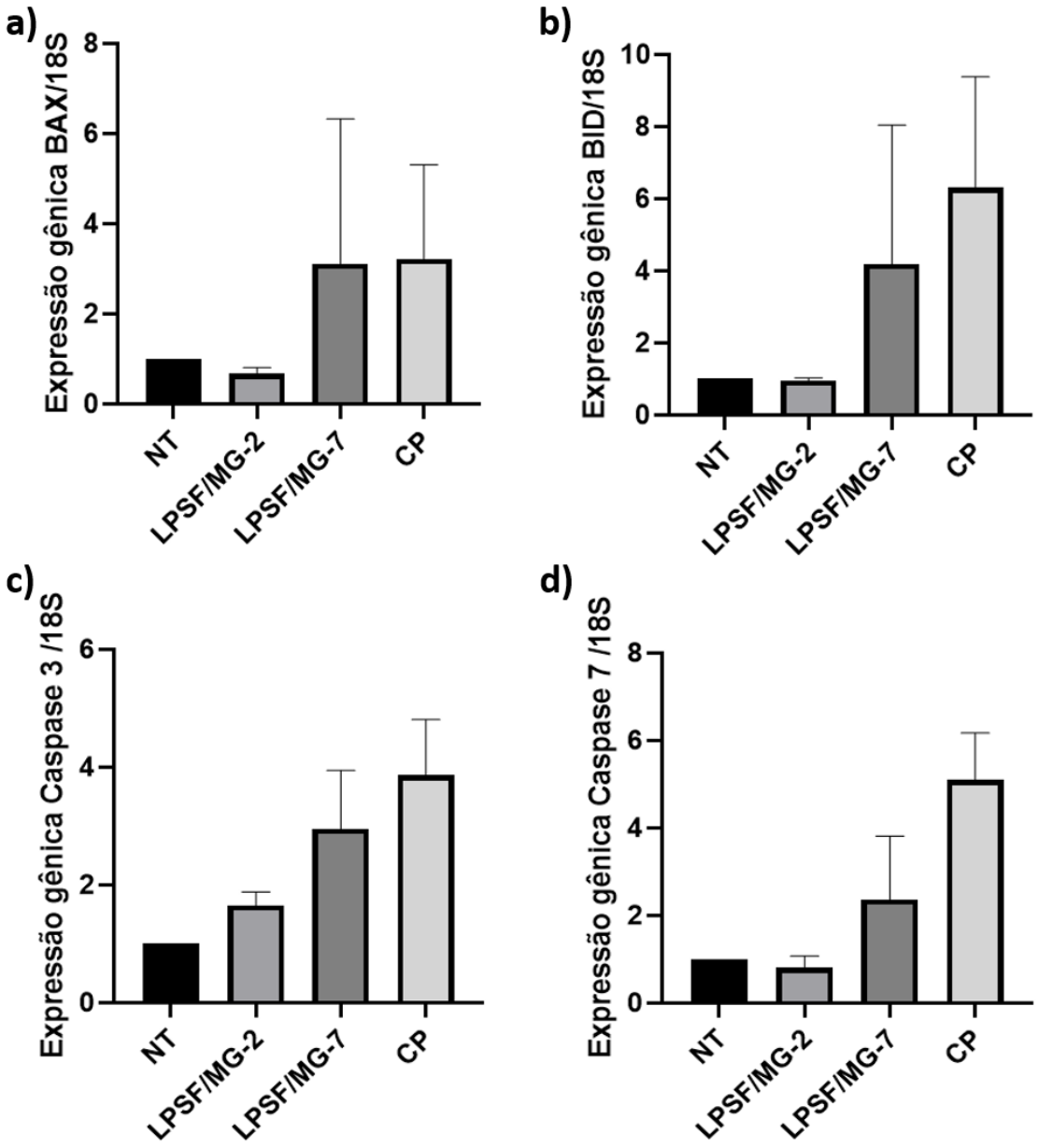
Porém já é sabido que há vias intermediárias a apoptose e a necrose, como a necroptose, na qual o processo de morte celular ocorre com ativação de agentes inflamatórios, porém de maneira sutil e moderada, principalmente mediadas por proteínas como RIPk3 e caspase 8 (Bertheloot et al., 2021), logo o motivo de escolha destas para elucidação do mecanismo de morte celular pelo agentes imidazolidínicos aqui estudados.

No intuito de confirma se o tratamento com a LPSF/MG-2 e LPSF/MG-7 modulam a via de sinalização de apoptose no câncer de pâncreas (Mia-paca2), foi

realizado o ensaio de RTqPCR e análise dos resultados de expressão. Na figura 29 (a, b, c e d) é possível observar que as moléculas LPSF/MG-2, LPSF/MG-7 e o CP, na concentração do CI50 no tempo de 72h, modulam a expressão dos genes BAX, BID e as caspases 3 e 7, em relação as células não tratadas. Na figura 29-a com o tratamento com a LPSF/MG-7, pode-se observar que o gene de BAX foi expresso 3,11 vezes mais em comparação a expressão no NT e no tratamento com o CP a expressão foi de 3,21 vezes mais quando comparado ao NT. Por sua vez, na figura 29-b podemos observar que houve também maior expressão de BID no tratamento com a LPSF/MG-7 e CP, sendo a expressão de 4,19 e 6,31 vezes mais que o NT, respectivamente.

Na figura 29-c pode-se observar que o tratamento com a LPSF/MG-2 demonstrou um aumento em 1,67 vezes mais de expressão do gene da caspase 3 quando comparado a expressão do NT, observa-se ainda que em comparação com o NT, o tratamento com a LPSF/MG-7 teve aumento de 2,95 vezes mais expressão do gene da caspase 3 e 3,86 vezes mais expressão do mesmo para o tratamento com o CP, também quando comparado ao NT. Quanto a expressão do gene da caspase 7 (figura 29-d), pode-se notar o aumento da expressão deste após tratamento com a LPSF/MG-7 em 2,36 vezes e de 5,1 vezes para o CP, quando comparadas estas condições ao NT.

Figura 29 – Efeito dos derivados de imidazolidinas-2,4-dionas na expressão de genes relacionados a apoptose (BAX, BID, Casp3 e Casp7) em comparação ao gene endógeno 18S na linhagem de Mia-paca2.



Os dados dos gráficos são da média ± o desvio padrão da duplicata de dois experimentos independentes. NT: Não Tratado.

A família das proteínas pró-apoptóticas em especial BID e BAX, aqui estudadas, desempenham papel importante na regulação da permeabilidade mitocondrial sendo responsáveis pelo processo de apoptose celular (JOVANOVIĆ GALOVIĆ et al., 2022; NEGI; MURPHY, 2021; YAN; ELBADAWI; EFFERTH, 2020). A molécula de BID é ativada pela caspase 8, a qual é considerada por tal como uma caspase iniciadora, uma vez ativado, o BID irá ativar seu homólogo BAD, o qual irá permitir a passagem do citocromo C para o citosol e em paralelo a caspase 8 irá ativar as caspases efetoras, sendo aqui estudadas as caspases 3 e 7, as quais irão clivar outros substratos protéicos da célula

resultando no processo apoptótico (Carneiro & El-Deiry, 2020; Negi & Murphy, 2021; Tummers & Green, 2017).

6. DISCUSSÃO

Os efeitos biológicos identificados nos ensaios *in vitro,* tendo seus resultados confirmados de maneira sólida através dos estudos *in silico,* a partir dos quais foi possível observar que todas as moléculas do tipo das imidazolidina-2,4-diona do presente estudo não violam o princípio de Lipinski ou o de Veber. Ambos os princípios são utilizados como referência de comparação com características em comum com drogas já conhecidas de banco de moléculas, características como:massa molecular menor ou igual a 500 Da, Log de P menor ou igual a 5, número de doadores de hidrogênio deve ser menor ou igual a 5 e número de grupos aceptores de hidrogênio menor ou igual a 10 e o princípio de Veber considera a área de superfície polar (TPSA) menor ou igual a 140 Â² e número de ligação rotacionáveis menor ou igual a 10, achados estes que contribuem para o desenvolvimento de moléculas menos tóxicas em relação células normais periféricas e com maior potencial terapêutico a ser explorado (LIPINSKI, 2000; MARTIN, 2018).

As moléculas LPSF/MGs apresentaram capacidade de interação de ligação do receptor acoplado à proteína G (GPCR), todas as moléculas avaliadas demonstraram possível bioatividade moderada, com intervalos entre -0.18 e -0.44, contudo apenas a LPSF/MG-1 apresentou capacidade de modulação de canal iônico, sendo um comportamento diferente das demais moléculas, tendo em vista que mesmo com características eletronegativas como a LPSF/MG-2 e LPSF/MG-7, que possuem respectivamente grupos como cloro e bromo, as mesmas não apresentaram característica de interação com canais iônicos (DA SILVA FILHO et al., 2019; GOUVEIA et al., 2018).

Na avaliação de bioatividade quase todas as LPSF/MGs demonstraram a capacidade de inibir quinases e inibir enzimas de modo geral, com exceção da LPSF/MG-1 que não demonstrou atividade de inibição de quinases. Este fato é bastante interessante, pois contribui para confirmar possíveis mecanismos que induziram a parada do ciclo celular na fase sub-G0 e indução de morte celular pela LPSF/MG-2 e LPSF/MG-7. Características semelhantes também foram identificadas em outros estudos com avaliação *in silico* de moléculas de imidazolidina sobre bioatividade (KANG et al., 2021; MAHDI et al., 2021).

A maioria das LPSF/MGs apresentaram capacidade de inibição de isômeros do citocromo P450, incluindo a LPSF/MG-2 e a LPSF/MG-7, que foram capazes de inibir

algumas isoformas do P450, porém não inibiram a isoformas CYP2D6. A capacidade de inibir as isoformas do citocromo P450 pode influenciar a necessidade de ajustes de utilização de drogas com intuito de garantir a eficácia terapêutica, contudo conhecer a interação entre moléculas e isoformas da P450 auxilia em garantir a estabilidade de propriedades farmacocinéticas, bioativação e a persistência de segurança de medicamentos (Ayar et al., 2021; Hassan et al., 2022b; Zhang et al., 2017).

Por sua vez, a seletividades das LPSF/MGs foi confirmada através da predição do coeficiente de permeabilidade (Kp), todas os compostos apresentaram Kp inferior a -2,5 cm/s o que pode ser considerado como característica importante por indicar não toxicidade quando em contato direto com a pele e também permitindo que agentes terapêuticos anticâncer do tipo das LPSF/MGs tenham ação de toxicidade seletiva (Sobanska et al., 2021; Awadelkareem et al., 2022).

Outro parâmetro importante avaliado sobre as das LPSF/MGs foi o score de biodisponibilidade o qual deve demonstrar valores acima de 0.25, sendo que todos os compostos demonstraram score médio de 0.55 o que pode ser considerado ótimo. Além deste, a predição demonstrou se enquadrarem nos filtros dos princípios de Ghose (GHOSE; VISWANADHAN; WENDOLOSKI, 1999), Egan (EGAN; MERZ; BALDWIN, 2000) e Muegge (MUEGGE; HEALD; BRITTELLI, 2001) para todos as moléculas, estes filtros são considerados contra-provas semelhantes à de Lipinski e Veber.

No quesito de características do perfil toxicológico foi identificado que nenhuma das moléculas é hepatotóxica, carcinogênica, mutagênica e citotóxica. Quanto à característica de imunotoxicidade, a maioria das moléculas foi inativa com taxas de probabilidade de inatividade de 52% a 94%, com exceção das moléculas LPSF/MG-1, LPSF/LPSF/MG-13 e LPSF/LPSF/MG-16 que demonstraram atividade imunotóxica e com probabilidades preditas de 70% a 90%, contudo as mesmas não apresentaram efeitos biológicos para as concentrações padrões deste estudo. No entanto, pelo resultado do AMES a maioria das moléculas foi considerada com potencial tóxico com exceção da LPSF/MG-10. Moléculas positivas para o AMES indica possibilidade de toxicidade hepatotóxica e/ou mutagênica (DRWAL et al., 2014).

Tendo em vista que a ancoragem molecular tem se tornado um método cada vez mais disseminado na triagem e analise de novas moléculas, permitindo de maneira

preditiva obter informações de proteína-ligante importantes para o desenvolvimento e aplicação de drogas e otimização de terapêuticas (WANG; ZHU, 2016). No estudo de docking molecular realizado no presente trabalho foi selecionado como proteína alvo de ligação o fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR2), o qual atua como agente importante no crescimento de células endoteliais. O mesmo é conhecido como receptor de domínio de inserção de quinases, a qual foi comprovada a capacidade das LPSF/MGs serem inibidoras de quinases pelos ensaios *in silico* aqui já mencionados.

O VEGFR2 funciona como mediador de proliferação endotelial induzida e a ativação dessas quinases pode estar relacionada com a sobrevida e proliferação de células neoplásicas. A super expressão do VEGFR2 foi identificada em variados tumores como de câncer de cólon, próstata, mama, ovários e pâncreas, tornando a inibição do VEGFR2 uma opção de tratamento promissora para diversos tipos de câncer (AL WASIDI; HASSAN; NAGLAH, 2020b; ALKAHTANI et al., 2019a; DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017b; ELSHERIF et al., 2020; MOSTAFA et al., 2016a).

Nas simulações de ancoragem molecular foi realizada investigação das interações moleculares entre o promissor composto LPSF/MG-7, que teve os melhores resultados nos ensaios *in vitro* e os locais de interação da proteína VEGFR2 (PDB ID: 4ASD). A molécula de LPSF/MG-7 possui apresentou um score de – 8.931 kcal/mol e o mesmo faz ligações de hidrogênio com aceptores de Glu79 e His163, e foi observado ainda interações hidrofóbicas do tipo Pi-Sigma, Pi-Alkyl com ligações de interação de doação de C pelo ligante testado LPSF/MG-7 e os aceptores também do ligante testado LPSF/MG-7 identificados foram os aminoácidos Lys62, Leu83, Val110 e His163.

A interação de ligação do composto LPSF/MG-7 com o ligante alvo cocristalizado da proteína VEGFR2, corrobora de maneira positiva com os achados dos efeitos biológicos *in vitro*, tendo invista que o score de interação menor que zero indica interação da molécula com o sitio alvo, sugerindo a possibilidade de que o LPSF/MG-7 seja um forte candidato a agente anticâncer com diversos efeitos biológicos, aqui já mencionados, interessantes.

A necessidade de desenvolvimento de novos agentes anticâncer continua sendo uma importante batalha entre pesquisadores de todo o mundo. Os compostos imidazolidínicos apresentaram baixo efeito citotóxico em células normais do sangue periférico de doadores saudáveis, a avaliação de ensaios de citotoxicidade em células sadias é importante, pois sugere a características de seletividade da série de compostos.

A seletividade celular, na questão de diferenciação entre células saudáveis e tumorais é importante para a prospecção de novos compostos terapêuticos (CARDOSO et al., 2015).

No processo de triagem dos compostos e das linhagens celulares observou-se que vários dos compostos apresentaram atividade citotóxica para diferentes linhagens celulares, sendo os principais LPSF/MG-2, LPSF/MG-3 e LPSF/MG-7. Embora todos os compostos deste estudo possuam uma cadeia principal do tipo imidazolidina-2,4-diona, cada composto possui grupos funcionais que os diferem. O composto LPSF/MG-2 possui um grupo metil na posição 4 do anel aromático, o qual possibilita maior interação hidrofóbicas com outras moléculas, o que contribui para interações biológicas, e facilita sua internalização em estruturas celulares. Tal fato corrobora com estudos como o que avaliou a atividade de análogos de Pirazol com grupamentos terminais metil e evidenciou os efeitos biológicos de moléculas com esses grupamentos frente a linhagens de câncer de ovário (HeLa), câncer de cólon (HT-29) e câncer de mama (MCF-7) (ROMAGNOLI et al., 2013b)

O composto LPSF/MG-3 possui em sua estrutura um grupamento cloro na posição 4 do anel aromático, o que possibilita este composto possuir carga mais eletronegativa, facilitando, por exemplo, interação com canais iônicos, proteínas e influenciar em seus efeitos biológicos (HEIDRICH; SPERL; BOECKLER, 2019; ZAGÓRSKA et al., 2021; ZIMMERMANN et al., 2014).

No tocante a molécula que apresentou melhor/menor CI50 para todas as linhagens de células tumorais foi a LPSF/MG-7, que possui em sua posição 4 do anel aromático o elemento bromo, o mesmo pode conferir ao composto perfil de maior carga eletronegativa e potencial oxidativo, possibilitando efeitos anticâncer pela interação biológica com proteínas, e canais iônicos. Essas características são corroboradas por pesquisas realizadas com hidantoínas que possuem o bromo em sua estrutura, estes estudos demonstraram bons resultados em ensaios de efeito citotóxico para tumores de câncer de mama (MCF-7), câncer de pulmão (A549 e NCI-H460) (DA SILVA FILHO et al., 2019; GOUVEIA et al., 2018).

Os compostos se apresentaram bastante promissores em relação a inibição de clones pelos compostos LPSF/MG-2 e LPSF/MG-7. Estes achados corroboram com os estudos de ZHANG et al, (2017a), que realizou estudos com compostos do tipo imidazolidina-2,4-diona, compostos esses que promoveram redução da formação de clones de linhagens de adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231) e câncer de pulmão (A549). E corrobora

ainda com os estudos de GILL et al., (2017), que realizou ensaios clonogênicos com linhagens celulares de câncer de pâncreas (Mia-paca-2) e câncer de pele (A375) e observou que compostos de imidazolidina foram capazes de reduzir a formação de clones destas linhagens.

Os compostos LPSF/MG-2 e LPSF/MG-7 apresentara também a capacidade de retardar o processo de migração celular na linhagem de Panc1 e Mia-paca-2. A inibição da migração celular é uma característica importante a ser considerada como efeito de agentes anticâncer, pois muitos tumores são capazes de desenvolver invasão de outros tecidos. Tal achado tanto se apresenta como um resultado superior como também corrobora com os estudos de EL SAYED (2010), que avaliou a ação de inibição de migração por compostos de imidazolidinas, compostos estes que foram capazes de inibir a migração de células de câncer de próstata (PC-3) em concentrações de 50 a 200 µM, e compostos estes que também possuíam em suas cadeias ramificação do tipo, metil, metoxi e cloro, grupos semelhantes aos estudados estudo, outro fato é que as concentrações de CI50 do pesquisador foram superiores aos CI50 do LPSF/MG-2 e LPSF/MG-7 (KHANFAR; EL SAYED, 2010).

Outra característica importante em agentes terapêuticos anticâncer é a capacidade de modular ou parar o ciclo celular. Pode-se destacar aqui que os compostos LPSF/MG-2 e LPSF/MG-7 foram capazes de interferir no ciclo celular levando a parada do mesmo na fase Sub-G0 nas diferentes linhagens de modo significativo em ambos os tempos de tratamento de 48 e 72 horas, efeito este também observado como ação do controle gemcitabina no tempo de tratamento de 72 horas. Resultados deste tipo corroboram com pesquisas realizadas por GILL et al. (2017), que avaliou a interferência no ciclo celular por moléculas de imidazolidina-2,4-diona as quais possuíam como grupos funcionais metil e bromo, assim como as moléculas LPSF/MG-2 e LPSF/MG-7 respectivamente, e observou parada do ciclo celular em Sub-G0 em linhagens de câncer de pâncreas (Mia-paca-2) e câncer de pele (A375).

Em 2010, KHANFAR & EL SAYED, avaliaram o efeito no ciclo celular de linhagens de leucemia linfócítica aguda (Reh) e leucemia mieloide crônica (K562) pelo compostos de imidazolidina propil-2-(8-(3,4-difluorobenzil)-29,59-dioxo-8-azaspiro[biciclo[3.2.1]octano-3,49-imidazolidina]-19-il)acetato, o qual apresentou efeito de parada no ciclo celular na fase Sub-G0, e por consequência foi identificado ainda

aumento de 16 a 40% do percentual de células na mesma fase com o aumento da concentração do composto, sendo o CI50 deste estudo de 37 µM.

Outras pesquisas realizadas com compostos de imidazolidinas-2,4-diona por Nafiel et al. (2022), evidenciou também a influência de agentes imidazolidínicos na linhagem de câncer de fígado (Hep-G2), identificando por apoptose tardia e necrose (NAFIE et al., 2022).

De acordo com o estudos de Kavitha e colaboradores(2009), ao avaliarem os efeitos biológicos de agentes de espiro-hidantoínas na inibição do crescimento celular em tumores de leucemia, os mesmos identificaram o aumento da expressão do gene BID e BAX, ambos proteínas pró-apoptóricas e também o aumento da expressão do gene da caspase 3 e 7, fato este que corrobora com os achados deste estudo.

Os achados deste estudo também coroboram com achados de outras pesquisas onde foi observado que o agente quimioterápico gemcitabina, comumente utilizado no tratamento do câncer de pâncreas, também realiza indução de morte celular por apoptose com aumento da expressão dos genes da caspase 3, 7 e consequentemente BID e BAX (Lin et al., 2020; Schniewind et al., 2004).

7. CONCLUSÃO

- ✔ Na avaliação *in silico* todos os compostos apresentaram alta a moderada absorção gastrointestinal e não violaram nenhum princípio de Linpinski ou Verber.
- ✔ Os compostos mostraram boa bioatividade, sendo a maioria inibidor de quinases e de isômeros do citocromo P450.
- ✔ Os compostos não mostraram possível ação hepatotóxica, carcinogênica, mutagênica e citotóxica.
- ✔ O composto LPSF/MG-7 na análise da ancoragem molecular foi capaz de fazer interação com sítio ativo do fator de crescimento endotelial VEGFR2.
- ✔ Os compostos de imidazolidina-2,4-diona apresentaram baixa citotoxicidade nas concentrações avaliadas em células mononucleares de sangue periférico.
- ✔ Os compostos LPSF/MG-7 apresentou citotoxicidade frente a linhagem Mia-paca-2, Panc1 e Du145. Já o composto LPSF/MG-2 apresentou citotoxicidade frente a linhagem Mia-paca-2, o LPSF/MG-3 se mostrou citotóxico frente a linhagem de Panc1 e LPSF/MG-4 exibiu citotoxicidade frente apenas a linhagem de Du145.
- ✔ Os compostos LPSF/MG-2 e LPSF/MG-7 diminuíram a formação de clones em Mia-paca-2, na linhagem de Panc1 os compostos LPSF/MG-3 e LPSF/MG-7 demonstraram redução do número de clones.
- ✔ Os compostos LPSF/MG-2 e LPSF/MG-7 diminuíram a capacidade de migração celular em Mia-paca-2, na linhagem de Panc1 os compostos LPSF/MG-3 e LPSF/MG-7 demonstraram redução da capacidade de migração.
- ✔ Os compostos LPSF/MG-2 e LPSF/MG-7 interagiram com o ciclo celular levando à parada do mesmo na fase Sub-G0 nas linhagens de Mia-paca-2 e Panc1.
- ✔ Os compostos LPSF/MG-2 e LPSF/MG-7 induziram morte celular por apoptose tardia e necrose na linhagem de Mia-paca-2 e na linhagem de Panc1 apenas LPSF/MG-7 induziu morte por necrose.
- ✔ A molécula de LPSF/MG-2 e LPSF/MG-7 foram capazes de aumentar a expressão dos genes de BAX, BID, Caspase 3 e Caspase 7.

8. PERSPECTIVAS

- Investigar o mecanismo de ação dos novos compostos imidazolidínicos por western blotting.

REFERÊNCIAS

AACR – American Association and Cancer Research - Preventing cancer: identifying risk factors**.** 2019. Disponível em: https://cancerprogressreport.aacr.org/progress/cpr19-contents/cpr19-preventing-cancer/. Acesso em: 18 de novembro de 2022.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA**: A Cancer Journal for Clinicians**. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21492>. Acesso em: 11/09/2018.

Czorny R.C.N., Pinto M.E., Pompeo D.A., Bereta D., Cardoso, L.V., Silva D.M. Fatores de risco para o câncer de próstata: população de uma unidade básica de saúde. **Cogitare Enfermagem**, v. 22, n. 4, 2017.

Dar, A. M., & Khan, S. Spectroscopic, viscositic, DNA binding and cytotoxic studies of newly synthesized steroidal imidazolidines. **Journal of fluorescence**, v. 26, n. 2, 2016.

Facina, T. Estimativa 2014–incidência de câncer no brasil. **Rev Bras Cancerol**, v. 60, n. 1, 2014.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Bray, F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International journal of cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-E386, 2015. Disponível em: < https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ijc.29210>. Acesso em: 02/08/2018.

Freitas, R.M., Rodrigues, A.M.X., Matos, A.F.Jr, Oliveira, G.A.L. Fatores de risco e principais alterações citopatológicas do câncer bucal: uma revisão de literatura. **RBCA**, v. 48, n. 1, 2016.

INCA, Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2018**: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2017. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>. Acesso em: 02/08/2018

Matos-Rocha, T.J., Lima, M.D., Silva, A.L., Oliveira, J.F., Gouveia,, A.L., Silva, V.B., Almeida Júnior, A.S., Brayner, F.A., Cardoso, P.R., Pitta-Galdino, M.D., Pitta, I.D., Rêgo, M.J., Alves, L.C., Pitta, M.G. Synthesis and biological

evaluation of novel imidazolidine derivatives as candidates to schistosomicidal agents. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59, 2017.

Munder, A., Moskovitz, Y., Redko, B., Rachel Levy, A., Ruthstein, S., Gellerman, G., & Gruzman, A. Antiproliferative effect of novel aminoacridine-based compounds. **Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 4, 2015.

Regulska, K.; Stanisz, B.; Regulski, M. Individualization of anticancer therapy; molecular targets of novel drugs in oncology. **Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej** (Online), v. 66, p. 855-867, 2012. Disponível em: < https://europepmc.org/abstract/med/23175342>. Acesso em: 04/08/2018.

Sierra M.S., Soerjomataram I., Antoni S., Laversanne M., Piñeros M., de Vries E. Cancer patterns and trends in Central and South America. **Cancer Epidemiology**, v. 44, 2016.

ABDEL-AZIZ, A. A. M. et al. Investigation of arenesulfonyl-2-imidazolidinones as potent carbonic anhydrase inhibitors. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 30, n. 1, p. 81–84, 1 fev. 2015.

AHMAD, F.; CHERUKURI, M. K.; CHOYKE, P. L. **Metabolic reprogramming in prostate cancer**. **British Journal of Cancer**Springer Nature, , 26 out. 2021a.

AHMAD, F.; CHERUKURI, M. K.; CHOYKE, P. L. **Metabolic reprogramming in prostate cancer**. **British Journal of Cancer**Springer Nature, , 26 out. 2021b.

AL WASIDI, A. S.; HASSAN, A. S.; NAGLAH, A. M. In vitro cytotoxicity and druglikeness of pyrazolines and pyridines bearing benzofuran moiety. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 10, n. 4, 2020a.

AL WASIDI, A. S.; HASSAN, A. S.; NAGLAH, A. M. In vitro cytotoxicity and druglikeness of pyrazolines and pyridines bearing benzofuran moiety. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 10, n. 4, 2020b.

ALDEA, M. et al. **Overcoming resistance to tumor-targeted and immune-targeted therapies**. **Cancer Discovery**American Association for Cancer Research Inc., , 2021.

ALKAHTANI, H. M. et al. Synthesis, anticancer, apoptosis-inducing activities and EGFR and VEGFR2 assay mechanistic studies of 5,5-diphenylimidazolidine-2,4-dione derivatives: Molecular docking studies. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, n. 5, p. 682–693, 1 jul. 2019a.

ALKAHTANI, H. M. et al. Synthesis, anticancer, apoptosis-inducing activities and EGFR and VEGFR2 assay mechanistic studies of 5,5-diphenylimidazolidine-2,4-dione derivatives: Molecular docking studies. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, n. 5, p. 682–693, 1 jul. 2019b.

ALKAHTANI, H. M. et al. Synthesis, anticancer, apoptosis-inducing activities and EGFR and VEGFR2 assay mechanistic studies of 5,5-diphenylimidazolidine-2,4-dione derivatives: Molecular docking studies. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, n. 5, p. 682–693, 1 jul. 2019c.

ANIFOWOSE, A. et al. **Anticancer strategies by upregulating p53 through inhibition of its ubiquitination by MDM2**. **Medicinal Chemistry Research**Springer, , 1 jul. 2020.

ARAVENA, C. J.; P, A. J. **L-PRF y Ciclo Celular. Revisión Narrativa L-PRF and cell cycle. Narrative ReviewInt. J. Odontostomat**. [s.l: s.n.].

ARNETH, B. Tumor Microenvironment. **Medicina**, v. 56, n. 15, 2020a.

ARNETH, B. **Tumor microenvironment**. **Medicina (Lithuania)**MDPI AG, , 1 jan. 2020b.

AYAR, A. et al. Antioxidant, Cytotoxic Activity and Pharmacokinetic Studies by Swiss Adme, Molinspiration, Osiris and DFT of PhTAD-substituted Dihydropyrrole Derivatives. **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 18, n. 1, p. 52–63, 24 fev. 2021.

BAJAJ, J.; DIAZ, E.; REYA, T. **Stem cells in cancer initiation and progression**. **Journal of Cell Biology**Rockefeller University Press, , 6 jan. 2020.

BANERJEE, R. et al. The presenilin loop region is essential for glycogen synthase kinase 3 β (GSK3β) mediated functions on motor proteins during axonal transport. **Human Molecular Genetics**, v. 27, n. 17, p. 2986–3001, 1 set. 2018.

BARBOSA, L. A. et al. RIPK1-RIPK3-MLKL-associated necroptosis drives Leishmania infantum killing in neutrophils. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. AUG, 14 ago. 2018.

BATISTA NAPOTNIK, T.; POLAJŽER, T.; MIKLAVČIČ, D. **Cell death due to electroporation – A review**. **Bioelectrochemistry**Elsevier B.V., , 1 out. 2021.

BERTHELOOT, D.; LATZ, E.; FRANKLIN, B. S. **Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death**. **Cellular and Molecular Immunology**Springer Nature, , 1 maio 2021.

BEZERRA, V. DE L. et al. SARS-CoV-2 como agente causador da COVID-19: Epidemiologia, características genéticas, manifestações clínicas, diagnóstico e possíveis tratamentos. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 4, p. 8452–8467, 2020.

BOUMAHDI, S.; DE SAUVAGE, F. J. **The great escape: tumour cell plasticity in resistance to targeted therapy**. **Nature Reviews Drug Discovery**Nature Research, , 1 jan. 2020.

BURGER, R. M. **Cleavage of Nucleic Acids by Bleomycin**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.

CARDOSO, M. V. D. O. et al. Design, synthesis and structure - Activity relationship of phthalimides endowed with dual antiproliferative and immunomodulatory activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 96, p. 491–503, 2015.

CARELLA, F. et al. Comparative pathology in bivalves: Aetiological agents and disease processes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 131, p. 107–120, 1 out. 2015.

CARNEIRO, B. A.; EL-DEIRY, W. S. **Targeting apoptosis in cancer therapy**. **Nature Reviews Clinical Oncology**Nature Research, , 1 jul. 2020.

CASTRO, N. R.; MARÇAL, L. L. ESTUDO DA SÍNTESE DE DERIVADOS DE IMIDAZOLIDINAS-2,4-DIONAS E OBTENÇAO DE NOVOS DERIVADOS. **Revista Eletrônica Perspectivas da Ciência e Tecnologia - ISSN: 1984-5693**, v. 10, p. 150, 5 dez. 2018.

CATERINA, M. C. et al. Imidazolidines as new anti-Trypanosoma cruzi agents: Biological evaluation and structure-activity relationships. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 5, p. 2226–2234, 1 mar. 2008.

CAVAZZONI, A. et al. Dual mechanisms of action of the 5-benzylidene-hydantoin UPR1024 on lung cancer cell lines. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 7, n. 2, p. 361–370, 1 fev. 2008.

CAZACU, I. M. et al. Pancreatitis-Associated Genes and Pancreatic Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-analysis. **Pancreas**, v. 47, n. 9, p. 1078–1086, 1 out. 2018.

CHALLA, S.; CHAN, F. K. M. **Going up in flames: Necrotic cell injury and inflammatory diseases**. **Cellular and Molecular Life Sciences**, out. 2010.

CHAUDHRY, G.-E.-S. et al. **Vitex rotundifolia fractions induce apoptosis in human breast cancer cell line, MCF-7, via extrinsic and intrinsic pathwaysResearch in Pharmaceutical Sciences**. [s.l: s.n.].

CHEN, C. P. et al. Evaluating molecular properties involved in transport of small molecules in stratum corneum: A quantitative structure-activity relationship for skin permeability. **Molecules**, v. 23, n. 4, 2018.

CHEN, Q. Y.; DESMARAIS, T.; COSTA, M. Metals and Mechanisms of Carcinogenesis. **Rev Pharmacol Toxicol**, v. 6, p. 537–554, 2019.

CHEN, X. et al. Pyroptosis is driven by non-selective gasdermin-D pore and its morphology is different from MLKL channel-mediated necroptosis. **Cell Research**, v. 26, n. 9, p. 1007–1020, 1 set. 2016.

CHHIKARA, B. S.; PARANG, K. **Global Cancer Statistics 2022: the trends projection analysisChemical Biology Letters Chem. Biol. Lett**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://pubs.thesciencein.org/cbl>.

CHORTANI, S. et al. Access to new phosphonate- and imidazolidine-benzopyrimidinone derivatives as antityrosinase and anti-acetylcholinesterase agents: Design, synthesis and molecular docking. **Journal of Molecular Structure**, v. 1268, 15 nov. 2022.

ČIŽEKOVÁ, L. et al. Novel 3,6-bis(imidazolidine)acridines as effective photosensitizers for photodynamic therapy. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 17, p. 4684–4693, 1 set. 2014.

COOPER, K. F. **Till death do us part: The marriage of autophagy and apoptosis**. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**Hindawi Limited, , 2018.

CRUCERIU, D. et al. **The dual role of tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) in breast cancer: molecular insights and therapeutic approaches**. **Cellular Oncology**Springer, , 1 fev. 2020.

CULP, M. B. B. et al. **Recent Global Patterns in Prostate Cancer Incidence and Mortality Rates**. **European Urology**Elsevier B.V., , 1 jan. 2020a.

CULP, M. B. B. et al. **Recent Global Patterns in Prostate Cancer Incidence and Mortality Rates**. **European Urology**Elsevier B.V., , 1 jan. 2020b.

DA SILVA FILHO, F. A. et al. Topoisomerase inhibition and albumin interaction studies of acridine-thiosemicarbazone derivatives. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 138, p. 582–589, 1 out. 2019.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, 3 mar. 2017a.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, 3 mar. 2017b.

DAINA, A.; ZOETE, V. A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. **ChemMedChem**, p. 1117–1121, 2016.

DAR, A. M.; SHAMSUZZAMAN, S.; KHAN, S. Spectroscopic, Viscositic, DNA Binding and Cytotoxic Studies of Newly Synthesized Steroidal Imidazolidines. **Journal of Fluorescence**, v. 26, n. 2, p. 639–649, 1 mar. 2016.

DAVID LOMANTO DÍAZ, L. et al. **El ciclo celular**. [s.l: s.n.].

DE ALMEIDA, S. M. V. et al. **DNA binding and Topoisomerase inhibition: How can these mechanisms be explored to design more specific anticancer agents? Biomedicine and Pharmacotherapy**Elsevier Masson SAS, , 1 dez. 2017.

DE BONO, J. et al. Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 22, p. 2091–2102, 28 maio 2020a.

DE BONO, J. S. et al. **Prostate carcinogenesis: inflammatory storms**. **Nature Reviews Cancer**Nature Research, , 1 ago. 2020b.

DE MAGALHÃES, C. S. et al. A dynamic niching genetic algorithm strategy for docking highly flexible ligands. **Information Sciences**, v. 289, n. 1, p. 206–224, 2014.

DEGTEREV, A. et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. **Nature Chemical Biology**, v. 1, n. 2, p. 112–119, 2005.

DELGADO, J. L. et al. **Topoisomerases as anticancer targets**. **Biochemical Journal**Portland Press Ltd, , 31 jan. 2018.

DICK, J. E. Stem cell concepts renew cancer research. 2008.

DING, L. et al. **The roles of cyclin-dependent kinases in cell-cycle progression and therapeutic strategies in human breast cancer**. **International Journal of Molecular Sciences**MDPI AG, , 1 mar. 2020.

DOS SANTOS, T. A. R. et al. Antitumor and immunomodulatory activities of thiosemicarbazones and 1,3-Thiazoles in Jurkat and HT-29 cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 82, p. 555–560, 1 ago. 2016.

DOWLATH, M. J. H. et al. **Effects of radiation and role of plants in radioprotection: A critical review**. **Science of the Total Environment**Elsevier B.V., , 20 jul. 2021.

DRWAL, M. N. et al. ProTox: A web server for the in *silico* prediction of rodent oral toxicity. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. W1, 1 jul. 2014.

EBLE, J. A.; NILAND, S. The extracellular matrix in tumor progression and metastasis. **Clinical & Experimental Metastasis**, n. 0123456789, 2019a.

EBLE, J. A.; NILAND, S. **The extracellular matrix in tumor progression and metastasis**. **Clinical and Experimental Metastasis**Springer Netherlands, , 15 jun. 2019b.

EGAN, W. J.; MERZ, K. M.; BALDWIN, J. J. Prediction of drug absorption using multivariate statistics. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 21, p. 3867–3877, 19 out. 2000.

ELMORE, S. **Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death**. [s.l: s.n.].

EL-SAWY, E. et al. Synthesis and biological activity of some new 1-benzyl and 1-benzoyl-3-heterocyclic indole derivatives. **Acta Pharmaceutica**, v. 60, n. 1, p. 55–71, 1 mar. 2010.

ELSHERIF, M. A. et al. Antimicrobial evaluation and molecular properties prediction of pyrazolines incorporating benzofuran and pyrazole moieties. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 10, n. 2, p. 37–43, 1 fev. 2020.

FARDI, M.; SOLALI, S.; FARSHDOUSTI HAGH, M. **Epigenetic mechanisms as a new approach in cancer treatment: An updated review**. **Genes and Diseases**Chongqing yi ke da xue, di 2 lin chuang xue yuan Bing du xing gan yan yan jiu suo, , 1 dez. 2018.

FERLAY, J. et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. **International Journal of Cancer**, v. 149, n. 4, p. 778–789, 15 ago. 2021.

FOWKE, J. H. et al. Associations of body mass index, smoking, and alcohol consumption with prostate cancer mortality in the Asia cohort consortium. **American Journal of Epidemiology**, v. 182, n. 5, p. 381–389, 1 set. 2015.

FUKUNAGA, H. et al. A Brief Overview of the Preclinical and Clinical Radiobiology of Microbeam Radiotherapy. **Clinical Oncology**, v. 33, n. 11, p. 705–712, 1 nov. 2021.

GALLUZZI, L. et al. **Essential versus accessory aspects of cell death: Recommendations of the NCCD 2015**. **Cell Death and Differentiation**Nature Publishing Group, , 1 jan. 2015a.

GALLUZZI, L. et al. **Essential versus accessory aspects of cell death: Recommendations of the NCCD 2015**. **Cell Death and Differentiation**Nature Publishing Group, , 1 jan. 2015b.

GALLUZZI, L. et al. **Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018**. **Cell Death and Differentiation**Nature Publishing Group, , 1 mar. 2018.

GANGULY, S. S.; LI, X.; MIRANTI, C. K. The Host Microenvironment Influences Prostate Cancer Invasion, Systemic Spread, Bone Colonization, and Osteoblastic Metastasis. **Frontiers in Oncology**, v. 4, n. December, p. 1–16, 2014.

GENIN, M. et al. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. **BMC Cancer**, v. 15, n. 1, 8 ago. 2015.

GEORGE, B. P.; CHANDRAN, R.; ABRAHAMSE, H. **Role of phytochemicals in cancer chemoprevention: Insights**. **Antioxidants**MDPI, , 1 set. 2021.

GHOLIVAND, K. et al. New phosphoramides containing imidazolidine moiety as anticancer agents: An experimental and computational study. **Bioorganic Chemistry**, v. 120, 1 mar. 2022a.

GHOLIVAND, K. et al. Therapeutic potential of phospho-thiadiazole derivatives as anti-glioblastoma agents: synthesis, biological assessment and computational study. **Bioorganic Chemistry**, v. 129, 1 dez. 2022b.

GHOSE, A. K.; VISWANADHAN, V. N.; WENDOLOSKI, J. J. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. **Journal of Combinatorial Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 55–68, 1999.

GHOSH, M. et al. **Evaluation of ,8-tethymustine, a new anticancer compound, in murine tumour models'Cancer Letters**. [s.l: s.n.].

GILL, R. K. et al. Polysubstituted 2-aminoimidazoles as anti-biofilm and antiproliferative agents: Discovery of potent lead. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 138, p. 152–169, 2017.

GIROD, J. C. et al. Conformation of Deoxyribonucleic Acid in Alcohol Solutions. **Biochemistry**, v. 12, n. 25, p. 5092–5096, 1973.

GOEL, S. et al. Overcoming Therapeutic Resistance in HER2-Positive Breast Cancers with CDK4/6 Inhibitors. **Cancer Cell**, v. 29, n. 3, p. 255–269, 14 mar. 2016.

GOEL, S. et al. **CDK4/6 Inhibition in Cancer: Beyond Cell Cycle Arrest**. **Trends in Cell Biology**Elsevier Ltd, , 1 nov. 2018.

GOUVEIA, R. G. et al. Synthesis, DNA and protein interactions and human topoisomerase inhibition of novel Spiroacridine derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 22, p. 5911–5921, 1 dez. 2018.

GREENLEE, J. D. et al. **Rafting down the Metastatic Cascade: The Role of Lipid Rafts in Cancer Metastasis, Cell Death, and Clinical Outcomes**. **Cancer Research**American Association for Cancer Research Inc., , 1 jan. 2021a.

GREENLEE, J. D. et al. **Rafting down the Metastatic Cascade: The Role of Lipid Rafts in Cancer Metastasis, Cell Death, and Clinical Outcomes**. **Cancer Research**American Association for Cancer Research Inc., , 1 jan. 2021b.

GRETEN, F. R.; GRIVENNIKOV, S. I. **Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences**. **Immunity**Cell Press, , 16 jul. 2019.

GUEDES, I. A. et al. New machine learning and physics-based scoring functions for drug discovery. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021.

GUN, S. Y. et al. Redox Biology Targeting immune cells for cancer therapy. **Redox Biology**, v. 25, n. November 2018, p. 101174, 2019.

GUTSCHNER, T.; DIEDERICHS, S. The hallmarks of cancer: A long non-coding RNA point of view. **RNA Biology**, v. 9, n. 6, p. 703–719, 2012.

HA CHUNG, B.; HORIE, S.; CHIONG, E. **The incidence, mortality, and risk factors of prostate cancer in Asian men**. **Prostate International**Elsevier B.V., , 1 mar. 2019.

HANAHAN, D. **Hallmarks of Cancer: New Dimensions**. **Cancer Discovery**American Association for Cancer Research Inc., , 1 jan. 2022.

HANAHAN, D.; WEINBER, R. **The Hallmarks of Cancer**. [s.l: s.n.].

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **Hallmarks of cancer: The next generation**. **Cell**, 4 mar. 2011.

HASSAN, A. S. et al. Synthesis, molecular docking, and in *silico* ADME prediction of some fused pyrazolo[1,5-a]pyrimidine and pyrazole derivatives as potential antimicrobial agents. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 19, n. 2, p. 521–545, 1 fev. 2022a.

HASSAN, A. S. et al. Synthesis, molecular docking, and in *silico* ADME prediction of some fused pyrazolo[1,5-a]pyrimidine and pyrazole derivatives as potential antimicrobial agents. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 19, n. 2, p. 521–545, 1 fev. 2022b.

HE, S. et al. Receptor Interacting Protein Kinase-3 Determines Cellular Necrotic Response to TNF-α. **Cell**, v. 137, n. 6, p. 1100–1111, 12 jun. 2009.

HEIDRICH, J.; SPERL, L. E.; BOECKLER, F. M. Embracing the diversity of halogen bonding motifs in fragment-based drug discovery-construction of a diversity-optimized halogen-enriched fragment library. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, n. FEB, 2019.

HUANG, D. et al. The MLKL Channel in Necroptosis Is an Octamer Formed by Tetramers in a Dyadic Process. **Molecular and Cellular Biology**, v. 37, n. 5, mar. 2017.

INCA. Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**, p. 1–122, 2019.

INCA. **E CÂNCER: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, TOXICOLÓGICOS E REGULATÓRIOS**. Rio de Janeiro: [s.n.].

IVANENKOV, Y. A. et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel potent MDM2/p53 small-molecule inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 2, p. 404–409, 15 jan. 2015.

JOVANOVIĆ GALOVIĆ, A. et al. The Effects of Resveratrol-Rich Extracts of Vitis vinifera Pruning Waste on HeLa, MCF-7 and MRC-5 Cells: Apoptosis, Autophagia and Necrosis Interplay. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 10, 1 out. 2022.

JURRUS, E. et al. Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. **Protein Science**, v. 27, n. 1, p. 112–128, 1 jan. 2018a.

JURRUS, E. et al. Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. **Protein Science**, v. 27, n. 1, p. 112–128, 1 jan. 2018b.

KALIKS, R. A. et al. **Diferenças no tratamento sistêmico do câncer no Brasil: meu SUS é diferente do teu SUS Differences in systemic cancer treatment in Brazil: my Public Health System is different from your Public Health SystemBraz J Oncol**. [s.l: s.n.].

KANG, T. et al. Design, Synthesis, and SAR of Novel 1,3-Disubstituted Imidazolidine or Hexahydropyrimidine Derivatives as Herbicide Safeners. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 1, p. 45–54, 13 jan. 2021.

KARKI, R.; KANNEGANTI, T. D. **The 'cytokine storm': molecular mechanisms and therapeutic prospects**. **Trends in Immunology**Elsevier Ltd, , 1 ago. 2021.

KATSILA, T. et al. **Computational approaches in target identification and drug discovery**. **Computational and Structural Biotechnology Journal**Elsevier B.V., , 2016.

KAVITHA, C. V. et al. Novel derivatives of spirohydantoin induce growth inhibition followed by apoptosis in leukemia cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 77, n. 3, p. 348–363, 1 fev. 2009.

KAVITHA, C. V. et al. Propyl-2-(8-(3,4-Difluorobenzyl)-2′,5′-Dioxo-8-Azaspiro[Bicyclo[3.2.1] Octane-3,4′-Imidazolidine]-1′-yl) Acetate Induces Apoptosis in Human Leukemia Cells through Mitochondrial Pathway following Cell Cycle Arrest. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 26 jul. 2013.

KEPP, O. et al. **Oncolysis without viruses — inducing systemic anticancer immune responses with local therapies**. **Nature Reviews Clinical Oncology**Nature Research, , 1 jan. 2020.

KHAN, I. et al. **A decade of cell death studies: Breathing new life into necroptosis**. **Pharmacology and Therapeutics**Elsevier Inc., , 1 abr. 2021.

KHANFAR, M. A.; EL SAYED, K. A. Phenylmethylene hydantoins as prostate cancer invasion and migration inhibitors. CoMFA approach and QSAR analysis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 11, p. 5397–5405, nov. 2010.

KIST, M.; VUCIC, D. Cell death pathways: intricate connections and disease implications. **The EMBO Journal**, v. 40, n. 5, mar. 2021.

KLEMM, F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of therapeutic response in cancer. **Trends in cell biology**, v. 25, n. 4, p. 198–213, 2014.

LAFAYETTE, E. A. et al. Synthesis of novel indole derivatives as promising DNA-binding agents and evaluation of antitumor and antitopoisomerase I activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 136, p. 511–522, 2017.

LEE, S. H. et al. Interferon-gamma regulates inflammatory cell death by targeting necroptosis in experimental autoimmune arthritis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.

LEELANANDA, S. P.; LINDERT, S. **Computational methods in drug discovery**. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**Beilstein-Institut Zur Forderung der Chemischen Wissenschaften, , 12 dez. 2016.

LIANG, X. et al. A comprehensive review of topoisomerase inhibitors as anticancer agents in the past decade. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 171, p. 129–168, 2019.

LIN, X.; LI, X.; LIN, X. **A review on applications of computational methods in drug screening and design**. **Molecules**MDPI AG, , 2020.

LIPINSKI, C. A. **Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability**. Groton: [s.n.].

LIU, C. et al. **Tumor microenvironment and immunotherapy of oral cancer**. **European Journal of Medical Research**BioMed Central Ltd, , 1 dez. 2022.

LIU, H.; YANG, Z.; PAN, Z. **Synthesis of Highly Substituted Imidazolidine-2,4-dione (Hydantoin) through Tf 2 O-mediated Dual Activation of Boc-protected Dipeptidyl Compounds Supporting Information**. [s.l: s.n.].

LIU, Y. et al. **Critical role of FOXO3a in carcinogenesis**. **Molecular Cancer**BioMed Central Ltd., , 25 jul. 2018.

LIU, Z. et al. **In *silico* drug repositioning-what we need to know**. **Drug Discovery Today**Elsevier Ltd, , 2013.

LIU, Z. G.; JIAO, D. Necroptosis, tumor necrosis and tumorigenesis. **Cell Stress**, v. 4, n. 1, p. 1–8, 1 jan. 2020.

LÓPEZ-LÓPEZ, L. I. et al. **Hidantoína y derivados como estructuras de importancia en la Química medicinal: Avances recientes**. [s.l: s.n.].

LÚCIA DE ALMEIDA, V. et al. **CÂNCER E AGENTES ANTINEOPLÁSICOS CICLO-CELULAR ESPECÍFICOS E CICLO-CELULAR NÃO ESPECÍFICOS QUE INTERAGEM COM O DNA: UMA INTRODUÇÃOQuim. Nova**. [s.l: s.n.].

MAHDI, R. et al. **Synthesis and Characterization some Imidazolidine Derivatives and Study the Biological Activity**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://annalsofrscb.ro>.

MARTIN, Y. C. How medicinal chemists learned about log P. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 32, n. 8, p. 809–819, 1 ago. 2018.

MARTINS, A. , D. A. , H. J. , S. G. , A. A. , M. J. , . . . & A. L. Activity of Fourteen New Hydantoin Compounds on the Human ABCB1 Efflux Pump. **In Vivo**, v. 26, n. 0258–851x, p. 293–298, 2012.

MASSAROTTI, A. et al. **The tubulin colchicine domain: A molecular modeling perspective**. **ChemMedChem**, 2 jan. 2012.

MATOS-ROCHA, T. J. et al. Synthesis and biological evaluation of novel imidazolidine derivatives as candidates to schistosomicidal agents. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 59, 2017.

MBEUNKUI, F.; JOHANN, D. J. **Cancer and the tumor microenvironment: A review of an essential relationship**. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, mar. 2009.

MENG, Y. et al. Human RIPK3 maintains MLKL in an Inativo conformation prior to cell death by necroptosis. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2021.

MILLS, C. C.; KOLB, E. A.; SAMPSON, V. B. **Development of chemotherapy with cell-cycle inhibitors for adult and pediatric cancer therapy**. **Cancer Research**American Association for Cancer Research Inc., , 15 jan. 2018.

MOGUILEWSKY, M.; BERTAGNA, C.; HUCHER, M. **PHARMACOLOGICAL AND CLINICAL STUDIES OF THEA~IA~ROGENANANDRONJ. steroid Biochem**. [s.l: s.n.].

MOREIRA, L. A. et al. As dificuldades no rastreio e diagnóstico do câncer de próstata: uma revisão integrativa. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 8, p. e48011831213, 26 jun. 2022.

MORRISH, E.; BRUMATTI, G.; SILKE, J. **Future Therapeutic Directions for Smac-Mimetics**. **Cells**NLM (Medline), , 11 fev. 2020.

MOSES, C. et al. **Hallmarks of cancer: The CRISPR generation**. **European Journal of Cancer**Elsevier Ltd, , 1 abr. 2018.

MOSTAFA, A. A. et al. Biological evaluation of some imidazolidine-2,4-dione and 2-thioxoimidazolidin-4-one derivatives as anticoagulant agents and inhibition of MCF-7 breast cancer cell line. **International Journal of Pharmacology**, v. 12, n. 4, p. 290–303, 2016a.

MOSTAFA, A. A. et al. Biological evaluation of some imidazolidine-2,4-dione and 2-thioxoimidazolidin-4-one derivatives as anticoagulant agents and inhibition of MCF-7 breast cancer cell line. **International Journal of Pharmacology**, v. 12, n. 4, p. 290–303, 2016b.

MUEGGE, I.; HEALD, S. L.; BRITTELLI, D. Simple selection criteria for drug-like chemical matter. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 12, p. 1841–1846, 7 jun. 2001.

MUKHERJEE, A. et al. Evaluation of Fluoren-NU as a Novel Antitumor Agent. **Oncology Research**, v. 17, p. 387–396, 2009.

NAFIE, M. S. et al. Evaluation of 2-thioxoimadazolidin-4-one derivatives as potent anti-cancer agents through apoptosis induction and antioxidant activation: In vitro and in vivo approaches. **Molecules**, v. 27, n. 1, 1 jan. 2022.

NEGI, A.; MURPHY, P. V. **Development of Mcl-1 inhibitors for cancer therapy**. **European Journal of Medicinal Chemistry**Elsevier Masson s.r.l., , 15 jan. 2021.

NEPOMUCENO, L. et al. MECANISMOS DE REPARO AOS DANOS NO DNA NOS PONTOS DE CHECAGEM DO CICLO CELULAR. **Enciclopédia Biosfera**, v. 14, n. 25, p. 881–902, 20 jun. 2017.

NEWMAN, A. M. et al. Determining cell type abundance and expression from bulk tissues with digital cytometry. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 7, p. 773–782, 1 jul. 2019.

NOWAK-SLIWINSKA, P.; SCAPOZZA, L.; ALTABA, A. R. I. **Drug repurposing in oncology: Compounds, pathways, phenotypes and computational approaches for**

colorectal cancer. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**Elsevier B.V., , 1 abr. 2019.

OCAÑA, M. C. et al. Metabolism within the tumor microenvironment and its implication on cancer progression: An ongoing therapeutic target. **Medicinal Research Reviews**, n. May, p. 1–44, 2018.

OLVER, I. et al. The timeliness of patients reporting the side effects of chemotherapy. **Supportive Care in Cancer**, v. 26, n. 10, p. 3579–3586, 1 out. 2018.

PANAGOPOULOS, A.; ALTMEYER, M. **The Hammer and the Dance of Cell Cycle Control**. **Trends in Biochemical Sciences**Elsevier Ltd, , 1 abr. 2021.

PATRA, S. et al. **Dysregulation of histone deacetylases in carcinogenesis and tumor progression: a possible link to apoptosis and autophagy**. **Cellular and Molecular Life Sciences**Birkhauser Verlag AG, , 1 set. 2019.

PEDERSINI, R. et al. Changes in eating habits and food preferences in breast cancer patients undergoing adjuvant chemotherapy. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021.

PEISCH, S. F. et al. Prostate cancer progression and mortality: a review of diet and lifestyle factors. **World Journal of Urology**, v. 35, n. 6, p. 867–874, 1 jun. 2017a.

PEISCH, S. F. et al. Prostate cancer progression and mortality: a review of diet and lifestyle factors. **World Journal of Urology**, v. 35, n. 6, p. 867–874, 1 jun. 2017b.

PIAZZA MJ; URBANETZ, A.; CARVALHO NS. **Biologia molecular: aspectos básicos da genética: parte I Molecular biology: genetic basic aspects**. [s.l: s.n.].

PINHEIRO, R. B. DOS S. et al. Análise in *silico* do perfil farmacocinético e toxicológico do complexo tioglicolato de Zinco II [Zn(ATG)2(OH2)2]. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 6, p. e44711629430, 3 maio 2022.

PIRES, D. E. V.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 4066–4072, 14 maio 2015.

QUIJANO, M. A.; VELÁSQUEZ, M. M. defectos de la apoptosis en el linfoma cutáneo. **Rev Asoc Colomb Dermatol**, p. 174–183, 2016.

RAJABI, S. et al. **The most competent plant-derived natural products for targeting apoptosis in cancer therapy**. **Biomolecules**MDPI, , 1 abr. 2021.

RICHARDSON, J. S.; RICHARDSON, D. C.; GOODSELL, D. S. **Seeing the pdb**. **Journal of Biological Chemistry**American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., , 2021.

RINDI, G.; INZANI, F. **Neuroendocrine neoplasm update: Toward universal nomenclature**. **Endocrine-Related Cancer**BioScientifica Ltd., , 2020.

RODRIGUEZ, D. A. et al. Characterization of RIPK3-mediated phosphorylation of the activation loop of MLKL during necroptosis. **Cell Death and Differentiation**, v. 23, n. 1, p. 76–88, 1 jan. 2016.

ROGAWSKI, M. A.; LÖSCHER, W. **The neurobiology of antiepileptic drugs for the treatment of nonepileptic conditions**. **Nature Medicine**, jul. 2004.

ROMAGNOLI, R. et al. Concise Synthesis and Biological Evaluation of 2-Aroyl-5-Amino Benzo[b]thiophene Derivatives As a Novel Class of Potent Antimitotic Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 22, p. 9296–9309, 27 nov. 2013a.

ROMAGNOLI, R. et al. Concise Synthesis and Biological Evaluation of 2-Aroyl-5-Amino Benzo[b]thiophene Derivatives As a Novel Class of Potent Antimitotic Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 22, p. 9296–9309, 27 nov. 2013b.

RÜHLE, A. et al. **The current understanding of mesenchymal stem cells as potential attenuators of chemotherapy-induced toxicity**. **International Journal of Cancer**Wiley-Liss Inc., , 1 dez. 2018.

SABARWAL, A.; KUMAR, K.; SINGH, R. P. **Hazardous effects of chemical pesticides on human health–Cancer and other associated disorders**. **Environmental Toxicology and Pharmacology**Elsevier B.V., , 1 out. 2018.

SAKTHIVEL, K. M.; GURUVAYOORAPPAN, C. **Acacia ferruginea inhibits tumor progression by regulating inflammatory mediators-(TNF-a, iNOS, COX-2, IL-1ß, IL-6, IFN-γ, IL-2, GM-CSF) and pro-angiogenic growth factor- VEGF**. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**Asian Pacific Organization for Cancer Prevention, , 2013.

SANTOS, K. B. et al. Highly Flexible Ligand Docking: Benchmarking of the DockThor Program on the LEADS-PEP Protein-Peptide Data Set. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 60, n. 2, p. 667–683, 24 fev. 2020.

SARKARIA, J. N.; BRISTOW, R. G. Overview of Cancer Molecular Radiobiology. **Radiation Oncology Advances**, p. 115–116, 2008.

SCHÜZ, J. et al. European code against cancer 4th edition: 12 ways to reduce your cancer risk. **Cancer Epidemiology**, v. 39, p. S1–S10, 9 abr. 2015.

SCHWARZER, R.; LAURIEN, L.; PASPARAKIS, M. **New insights into the regulation of apoptosis, necroptosis, and pyroptosis by receptor interacting protein kinase 1 and caspase-8**. **Current Opinion in Cell Biology**Elsevier Ltd, , 1 abr. 2020.

SHAH, A. et al. Characterization and DNA binding studies of unexplored imidazolidines by electronic absorption spectroscopy and cyclic voltammetry. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 120, p. 90–97, 5 mar. 2013.

SHAH, M. H. et al. **Neuroendocrine and adrenal tumors, version 2.2018 featured updates to the nccn guidelines**. **JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network**Harborside Press, , 1 jun. 2018.

SHALAPOUR, S.; KARIN, M. **Immunity, inflammation, and cancer: An eternal fight between good and evil**. **Journal of Clinical Investigation**American Society for Clinical Investigation, , 1 set. 2015.

SHARMA, V.; CRANKSHAW, C. L.; PIWNICA-WORMS, D. Effects of multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein expression levels and coordination metal on the cytotoxic potency of multidentate (N4O2) (ethylenediamine)bis[propyl(R-benzylimino)]metal(III) cations. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 18, p. 3483–3490, 1996.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2019. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 69, n. 1, p. 7–34, jan. 2019.

SIGMAN, D. S.; MAZUMDER, A.; PERRIN, D. M. Chemical Nucleases. **Chemical Reviews**, v. 93, n. 6, p. 2295–2316, 1993.

SIGMAN,', D. S.; MAZUMDER, A.; PERRIN, D. M. **Chemical NucleasesChem. Rev**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.

SINGH, N. et al. Molecular modeling and molecular dynamics studies of hydralazine with human DNA methyltransferase 1. **ChemMedChem**, v. 4, n. 5, p. 792–799, 11 maio 2009.

ŠMIT, B. M.; PAVLOVIĆ, R. Z. Three-step synthetic pathway to fused bicyclic hydantoins involving a selenocyclization step. **Tetrahedron**, v. 71, n. 7, p. 1101–1108, 18 fev. 2015.

SPENGLER, G. , H. J. , O. I. , V. M. , K.-K. K. , M. J. , & A. L. Modulation of Multidrug Efflux Pump Activity by New Hydantoin Derivatives on Colon Adenocarcinoma Cells without Inducing Apoptosis. **Anticancer Research**, v. 31, n. 0250-7005/2011, p. 3285–3288, 2011.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, maio 2021.

SUVARNA, V.; SINGH, V.; MURAHARI, M. **Current overview on the clinical update of Bcl-2 anti-apoptotic inhibitors for cancer therapy**. **European Journal of Pharmacology**Elsevier B.V., , 5 nov. 2019.

TAITT, H. E. **Global Trends and Prostate Cancer: A Review of Incidence, Detection, and Mortality as Influenced by Race, Ethnicity, and Geographic Location**. **American Journal of Men's Health**SAGE Publications Inc., , 1 nov. 2018.

TAM, S. et al. **Association of Immunosuppression with Outcomes of Patients with Cutaneous Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck**. **JAMA Otolaryngology - Head and Neck Surgery**American Medical Association, , 1 fev. 2020.

TANG, D. et al. **The molecular machinery of regulated cell death**. **Cell Research**Nature Publishing Group, , 1 maio 2019.

TETTAMANTI, G.; CASARTELLI, M. **Cell death during complete metamorphosis**. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**Royal Society Publishing, , 14 out. 2019.

THAKKAR, S. et al. **Tumor microenvironment targeted nanotherapeutics for cancer therapy and diagnosis: A review**. **Acta Biomaterialia**Acta Materialia Inc, , 1 jan. 2020.

THI XUAN, N.; VAN HAI, N. **Klotho (KL)**. [s.l: s.n.].

THOMAS, D.; RADHAKRISHNAN, P. Tumor-stromal crosstalk in pancreatic cancer and tissue fibrosis. **Molecular Cancer**, v. 18, n. 1, p. 1–15, 2019a.

THOMAS, D.; RADHAKRISHNAN, P. **Tumor-stromal crosstalk in pancreatic cancer and tissue fibrosis**. **Molecular Cancer**BioMed Central Ltd., , 21 jan. 2019b.

TUMMERS, B.; GREEN, D. R. **Caspase-8: regulating life and death**. **Immunological Reviews**Blackwell Publishing Ltd, , 1 maio 2017.

VANDEN BERGHE, T.; HASSANNIA, B.; VANDENABEELE, P. **An outline of necrosome triggers**. **Cellular and Molecular Life Sciences**Birkhauser Verlag AG, , 1 jun. 2016.

VINEIS, P.; WILD, C. P. **Global cancer patterns: Causes and prevention**. **The Lancet**Elsevier B.V., , 2014.

WALDUM, H. L.; SAGATUN, L.; MJØNES, P. Gastrin and Gastric Cancer. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, 17 jan. 2017.

WANG, G.; ZHU, W. **Molecular docking for drug discovery and development: A widely used approach but far from perfect**. **Future Medicinal Chemistry**Future Science, , 1 set. 2016.

WANG, S.-C. et al. Limited improvement in prostate cancer mortality-to-incidence ratios in countries with high health care expenditures. **AGAIN**, v. 12, p. 21308–21315, 2020.

WEBER, K. et al. Nuclear RIPK3 and MLKL contribute to cytosolic necrosome formation and necroptosis. **Communications Biology**, v. 1, n. 1, 1 dez. 2018.

WEBER, M. B. et al. Advanced squamous cell carcinoma and immunotherapy: new therapeutic perspectives. **Surgical and Cosmetic Dermatology**, v. 13, 2021.

WÜRTH, R. et al. **Drug-repositioning opportunities for cancer therapy: Novel molecular targets for known compounds**. **Drug Discovery Today**Elsevier Ltd, , 1 jan. 2016.

XIA, B. et al. MLKL forms cation channels. **Cell Research**, v. 26, n. 5, p. 517–528, 1 maio 2016.

YAN, G.; ELBADAWI, M.; EFFERTH, T. **Multiple cell death modalities and their key features (Review)**. **World Academy of Sciences Journal**Spandidos Publications, , 1 mar. 2020.

YANOFSKY, V. R. et al. **Understanding dendritic cells and their role in cutaneous carcinoma and cancer immunotherapy**. **Clinical and Developmental Immunology**, 2013.

YOON, S. et al. Necroptosis is preceded by nuclear translocation of the signaling proteins that induce it. **Cell Death and Differentiation**, v. 23, n. 2, p. 253–260, 1 fev. 2016.

ZAGÓRSKA, A. et al. Design, synthesis, and in vitro antiproliferative activity of hydantoin and purine derivatives with the 4-acetylphenylpiperazinylalkyl moiety. **Materials**, v. 14, n. 15, 1 ago. 2021.

ZAIDI, S. et al. **The anticancer potential of metformin on prostate cancer**. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**Nature Publishing Group, , 1 set. 2019a.

ZAIDI, S. et al. **The anticancer potential of metformin on prostate cancer**. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**Nature Publishing Group, , 1 set. 2019b.

ZHANG, M. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of hydantoin bridged analogues of combretastatin A-4 as potential anticancer agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 24, p. 6623–6634, 15 dez. 2017a.

ZHANG, M. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of hydantoin bridged analogues of combretastatin A-4 as potential anticancer agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 24, p. 6623–6634, 15 dez. 2017b.

ZHANG, Y. et al. **Plasma membrane changes during programmed cell deaths**. **Cell Research**Nature Publishing Group, , 1 jan. 2018.

ZIMMERMANN, M. O. et al. Halogen-enriched fragment libraries as chemical probes for harnessing halogen bonding in fragment-based lead discovery. **Future Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 6, p. 617–639, 2014.

ANEXO 01 - PARECER COMITE DE ETICA HUMANO

UFPE - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - CAMPUS RECIFE - UFPE/RECIFE

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICÂNCER E MECANISMO DE AÇÃO DE AGENTES IMIDAZOLIDÍNICOS

Pesquisador: Auvani Antunes da Silva Junior

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 37065920.2.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICIAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.322.331

Apresentação do Projeto:

O projeto "Avaliação da Atividade Anticâncer e Mecanismo de Ação de Agentes Imidazolidínicos" trata-se de um projeto de Doutorado, do Programa de Inovação Terapêutica, da UFPE, do doutorando Auvani Antunes da Silva Junior, tendo como orientadora a Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta e mais cinco pesquisadores na equipe. Este projeto objetiva a avaliação da atividade anticâncer e o mecanismo de ação de moléculas de imidazolidinas do tipo 2,4-diona. Será desenvolvido com metodologia experimental através de estudos "in vitro", com cultura de células normais e neoplásicas cultivadas separadamente em meios específicos para tal, nos quais serão inoculadas as moléculas que fazem parte do estudo em diferentes concentrações, sendo realizado análises de citotoxicidade, citometria de fluxo laminar, análise de ciclo celular, estudo de efeito sobre topoisomerase, ensaio de migração, Western Blot. Os pesquisadores esperam que as moléculas de imidazolidinas frente a células normais demonstrem baixa toxicidade, que as moléculas apresentem interferências no ciclo celular em fase G2.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral:

Avaliar a atividade anticâncer de novos derivados imidazolidínicos e compreender os seus mecanismos de ação.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br

Objetivos específicos:

- Avaliar a citotoxicidade dos derivados imidazolidínicos frente a linhagens não tumorais e normais (PBMCs);
- Avaliar a atividade citotóxica dos derivados imidazolidínicos frente à diferentes linhagens de células neoplásicas;
- Investigar o efeito dos derivados imidazolidínicos no ciclo celular;
- Investigar o efeito dos derivados imidazolidínicos na indução de morte celular;
- Avaliar o efeito dos derivados imidazolidínicos sobre a atividade da enzima topoisomerase I;
- Analisar o potencial dos derivados imidazolidínicos na inibição do efeito migratório de linhagens tumorais;
- Investigar possíveis alvos moleculares de vias apoptóticas de linhagens tumorais após tratamento com derivados imidazolidínicos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os pesquisadores consideram os riscos que podem ocorrer no ato da coleta de sangue dos doadores de células sanguíneas recrutados são desconforto no momento da coleta e o braço pode ficar um pouco dolorido e apresentar hematoma que é uma área arroxeada no local da coleta. No intuito de minimizar estes riscos a coleta será feita por profissionais treinados e competentes e orientados para reduzir os riscos.

Benefícios:

Não estão previstos benefícios diretos para os voluntários. Este estudo permitirá avaliar a atividade anticâncer e mecanismo de ação de agentes imidazolidínicos no intuito de investigar o potencial de desenvolvimento de novas moléculas com possibilidade de aplicação em novas terapias anticâncer.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Para este estudo será realizada a coleta de amostras do sangue periférico de 10 voluntários sadios, os mesmos serão recrutados no âmbito da universidade. Serão coletados 10-15 mL de sangue em tubo contendo o anticoagulante heparina. Nenhuma coleta será realizada sem a autorização prévia dos voluntários, e também serão prestadas todas as informações sobre o objetivo do estudo e o

interesse em sua participação. Serão incluídos apenas candidatos maiores de 18 anos de idade, de ambos os sexos e que não possuam doenças crônicas declaradas até o momento da pesquisa. Serão excluídos da pesquisa indivíduos que possuam doenças crônicas, mulheres grávidas, ou indivíduos que declarem no ato da coleta, ter manifestado sinais e sintomas como: febre, espirro, rinorreia, dor de garganta, diarreia, náuseas, mialgia ou fadiga e ou qualquer sintoma sugestivo de infecções de origens bacterianas, fúngicas, virais e/ou autoimunes. Todas as despesas serão custeadas pelo pesquisador responsável pelo projeto de pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O pesquisador responsável anexou Folha de Rosto assinada pela Diretora do Centro de Biociências; Carta de Anuência assinada pela Diretora do Centro de Biociências; declaração de vínculo ao Programa de Inovação Terapêutica – Doutorado; projeto de pesquisa; Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para maiores de 18 anos ou emancipados, Termo de Compromisso e Confidencialidade assinado pelo pesquisador responsável e os currículos dos sete pesquisadores envolvidos na pesquisa.

Recomendações:

Os objetivos devem ser escritos com verbos no infinitivo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Protocolo Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio da Notificação com o Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser

modificada e suas justificativas.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1617471.pdf	27/08/2020 16:19:46		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetoauvaniversaofinal.pdf	27/08/2020 16:18:40	Auvani Antunes da Silva Junior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	27/08/2020 16:18:15	Auvani Antunes da Silva Junior	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CARTADEANUENCIAASSINADA.pdf	27/08/2020 14:06:56	Auvani Antunes da Silva Junior	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoassinada.pdf	27/08/2020 14:05:26	Auvani Antunes da Silva Junior	Aceito
Outros	curriculomoacyr.pdf	24/08/2020 10:57:18	Auvani Antunes da Silva Junior	Aceito
Outros	curriculomichele.pdf	24/08/2020 10:56:49	Auvani Antunes da Silva Junior	Aceito
Outros	curriculomarina.pdf	24/08/2020 10:56:15	Auvani Antunes da Silva Junior	Aceito
Outros	curriculomardonny.pdf	24/08/2020 10:55:55	Auvani Antunes da Silva Junior	Aceito
Outros	curriculomaira.pdf	24/08/2020 10:55:35	Auvani Antunes da Silva Junior	Aceito
Outros	curriculoivan.pdf	24/08/2020 10:53:55	Auvani Antunes da Silva Junior	Aceito
Outros	curriculoauvani.pdf	24/08/2020 10:53:29	Auvani Antunes da Silva Junior	Aceito
Outros	declaracaodevinculo.pdf	24/08/2020 10:50:48	Auvani Antunes da Silva Junior	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termoconfidencialidadelmidazolidina.pdf	24/08/2020 10:50:08	Auvani Antunes da Silva Junior	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 08 de Outubro de 2020

Assinado por:
Gisele Cristina Sena da Silva
(Coordenador(a))

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br

ANEXO 02 – Artigo Publicado: Imidazolidine Derivates in Cancer Research: what is Know?

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net

Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, XXXX, *XX*, 1-6 1

REVIEW ARTICLE

Imidazolidine Derivatives in Cancer Research: What is known?

Auvani Antunes da Silva Júnior[1], Marina Galdino da Rocha Pitta[1], Mardonny Bruno de Oliveira Chagas[2], Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo[3], Michelle Melgarejo da Rosa[3] and Maira Galdino da Rocha Pitta[3,*]

[1]*Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil;* [2]*Life Science Center, Federal University of Pernambuco, Caruaru, Brazil;* [3]*Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil*

ARTICLE HISTORY

Received: November 20, 2020
Revised: April 29, 2021
Accepted: May 31, 2021

DOI:
10.2174/1871520621666210727113639

Abstract: It is well known that cancer is the second leading cause of death worldwide. Due to this fact, new results for the treatment of cancer are constantly being introduced and verified. Imidazolidine derivatives regulate cell cycle progression and DNA stability. Structurally, a heterocyclic nucleus favors a direct DNA interaction and therefore, control of the DNA replication process. This review aims not only to discuss the role of imidazolidines in cancer therapy but also explore the functionality of such agents in the future aspects of cancer prognosis and treatment. Convincing data from 1996 to 2021 has presented imidazolidine derivatives as a relevant therapeutic tool to modulate cancer progression and malignancy. Here we highlight these aspects in a variety of cell lines, cancer types, involving *in vitro* and *in vivo* techniques.

Keywords: Apoptosis, cancer, cell cycle, DNA, imidazolidine, anticancer.

1. INTRODUCTION

It is well known that non-transmissible diseases and metabolic complications such as cardiovascular diseases, chronic respiratory diseases, and cancer are included among the root causes of illness and death, globally. In 2018, cancer became one in each six causes of death. Of note, approximately half of the cases were computed in developing countries with low-middle income [1-5].

Words like cancer, neoplasia or malignant tumor are terminologies used to name more than 200 diseases caused by intrinsic and extrinsic reasons, throughout the body. The molecular biology of cancer involves changes in the genetic code, which evolves to the rapid and uncontrolled growth of altered cells, in addition to losing the limit of these cells. In some cases, the malignant cell spreads to organs and other tissues, initiating a process of metastasis [6, 7].

The world health organization estimated that the most common cancers worldwide (per million cases) included lung (2.09), breast (2.09), colorectal (1.8), prostate (1.28), skin cancer (1.04), and stomach (1.03). In 2019, 1,762,450 new cancer cases and 606,880 cancer deaths occurred in the United States [8-10].

The leading causes of risk factors for cancer development include tobacco, approximately 22% of cancer deaths, menopause, inappropriate food intake, lacking exercise, environmental and occupational hazards [11, 12].

Sixty to seventy percent of cancer patients are treated with chemotherapy agents [13]. The use of chemical compounds decreases the speeding of cellular growth.

Antineoplastic drugs aim to inhibit the cell division, whilst impairing tumor progression. The imbalance mechanism comes with the effect of chemotherapeutic agents against non-cancer cells, emerging distinguished body complications. More studies are warranted so as to establish a more selective and less invasive molecule to be considered for cancer treatment [14-16].

*Address correspondence to this author at the Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, P.O. Box: 50730-120, Recife, Brazil; Tel: ++055-81-9671-7788; Fax: +55-81-2126-8947;
E-mails: mgrpitta@gmail.com; maira.pitta@ufpe.br

Imidazolidine derivatives are composed of a heterocyclic nucleus surrounded by active nitrogen atoms [17, 18]. Compelling data have addressed the activity of such molecules in regard to the cell cycle inhibition [19, 20].

To encourage research in this domain, the present review provides an insight into the role of Imidazolidine derivatives on cancer research and treatment (Table **1**).

2. DISCUSSION

2.1. Characteristic and Biological Activity of Imidazolidines

Imidazolidines or hydantoins were discovered by Bayer, in 1861. The structure imidazolidine-2,4-diones, came from a product of the hydantoin reaction, in the synthesis of uric acid. These molecules constitute an important heterocyclic organic group of compounds, showing a pentagonal conformation. They have been extracted from natural products disclosing a range spectrum of applications [21, 22].

In compliance with IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), hydantoins have an imidazolidine ring composed of two carbonyls in positions 2 and 4, and two nitrogen atoms in positions 1 and 3 (Structure **1**). The change in its structure can generate alterations in its chemical, physical and pharmacological properties of the molecules [23].

Studies comprise the pharmacological interest of Imidazolidine molecules not only for its bioactivity characteristics, but also for its capacity of structural modification [24]. The biological activity of Imidazolidine comprises effect as anticonvulsant [25], antitumor [26], anticancer [27], antiparasitic [28], and antiarrhythmic [29], for instance.

2.2. Imidazolidine Molecules with Anti-Cancer Activity

In 1996, Shamsa, Crankshaw and Worms developed the metalo pharmaceutics molecule (ethylenediamine) -*N,N'*-bis[propyl[(2-hydroxy-3-methoxybenzyl)imino]] and (ethylenediamine)-*N,N'*-bis[propyl[(2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzyl)-imino]] (R-ENBPI) with potential anticancer activity (Structure **2**).

1871-5206/XX $65.00+.00 © XXXX Bentham Science Publishers

Table 1. List of the anti-tumoral mechanism of imidazolidine derivatives.

Authors	Year	Aim	Cell Line	Mechanism of Action (Biological Effect)
Sharma *et al.*	1996	Characterization of the cytotoxic potency of phenolic complexes	Human epidermal carcinoma (KB-3-1); Multiple drug-resistant epidermal carcinoma cells (KB-8-5).	Modification in the expression of glycoprotein-P RMF and metallic R-EN BPI complexes.
Ghosh *et al.*	1997	Evaluate the alkylating and lyophilizing activity of imidazolidine.	Sarcoma-180 (TIB-66) e lymphoma Hodgkin (CRL 7362).	Not described.
Kavitha *et al.*	2008	To determine how the ester and electronic properties of the side chain can influence its effect on cell viability.	Leukemia cells (CRL-9589).	Apoptosis induction by activation and cleavage of caspase 9, activation of pro-caspase 3, and cleavage of the poly (adenosine diphosphate-ribosyl) polymerase receptor.
Mukherjee *et al.*	2008	Synthesis and antitumor and toxicological evaluation of molecules with hydantoin group.	Human neuroblastoma (SK-N-SH); neuroblastoma (IMR-32), lung (A549), prostate (DU-145), leukemia (HL-60), e lymphoma (U-937)	Inhibit the synthesis of DNA and RNA.
El-Sawy *et al.*	2010	Synthesize heterocyclic compounds from 1-benzyl- (2a) and 1-benzoyl-3-bromoacetyl-indoles (2b) and evaluate for their antimicrobial and anticancer effect.	Human ovarian cancer cells (OVCAR3 e BG-1)	Not described.
Shah *et al.*	2013	Characterize imidazolidine compounds and provides information on the molecular mechanisms of their action.	*In vitro* study with fragments of DNA	Formation of connection adducts with the DNA.
Sakthivel KM , Guruvayoorappan C .	2013	To evaluate the effect of ferruginea extract containing imidazolidine compounds on tumors.	Lymphoma of Dalton (LDA)	Immunomodulation and tumor suppression.
Kavitha *et al.*	2013	Investigate anticancer activity and the mechanism of action of azaspirohydantoin derivatives (ASHD).	Leukemia cell (K562)	Inhibit DNA replication, leading to cell cycle inhibition with increased expression of pro-apoptotic BAD proteins and reduction of anti-apoptotic BCL2 proteins and activation of caspase 9.
Cihlková *et al.*	2014	To study the photocytotoxicity of AcrDIMs and the production of ROS by AcrDIM after irradiation.	Human ovarian cancer (A2780) and of lymphocytic leukemia of mice (L1210).	Photosensitization apoptosis.
Ivanenkov *et al.*	2015	Synthesis of selective regions, biological evaluation and 3D-molecular modeling of a series of new 2-thioxo-5H- dispiro [imidazolidine-4,3-pyrrolidine-2,3-indole] -2,5 (1H) -diastereomeric dione.	Hepatocellular carcinoma (HepG2), Embryonic kidney cancer (Hek-293), Breast adenocarcinoma (MCF-7), cervical cancer (SiHa) and colorectal carcinoma (HCT-116).	Complex inhibition MDM2/p53.
Dar AM, *et al.*	2016	Synthesis of new steroidal imidazolidines.	Breast adenocarcinoma (MCF-7), cervical adenocarcinoma (HeLa), acute promyelocytic leukemia (HL-60), colorectal adenocarcinoma type B (SW480) and hepatocellular carcinoma (HepG2).	Apoptosis induction.
Lafayette *et al.*	2017	To evaluate the ability of imidazolidine agents to interact with DNA, the antiproliferative effect on tumor cells and the inhibition capacity of the topoisomerase I enzyme.	HL60 (acute promyelocytic leukemia), K562 (chronic myeloid leukemia), T47D (breast ductal carcinoma) and MCF7 (breast adenocarcinoma) cell lines.	Cytotoxic activity in tumor cells, alteration of the double helix DNA conformation after binding to the complex.
Aboelkhair *et al.*	2018	Evaluate the antiproliferative potential in vitro, mode of binding and inhibition of histone deacetylases by imidazolidine agents.	Cell lines of MCF 7 (breast adenocarcinoma) and HepG2 (hepatocellular carcinoma).	Antiproliferative activity, inhibition of polymerization of tubulin protein.
Chemova *et al.*	2020	Synthesize and identify cytotoxic properties and effect on the xanthine oxidase enzyme of platinum complexes.	Chronic myeloid leukemia (lineage K-562) and acute lymphocytic leukemia (lineage REH).	Induction of cell death and inhibition of the enzyme xanthine oxidase.
Yao *et al.*	2020	Synthesis and analysis of the anticancer potential of imidazolidine compounds.	Human cancer cell lines - MCF-7 (estrogen receptor positive breast cancer and HER-2 negative), MDA-MB-231 (triple negative breast cancer), and lung cancer lines A549 (lung adenocarcinoma) NCI-H460 (large cell lung cancer)	Induction of neoplastic cell death.
Ali *et al.*	2020	To investigate the effect of hydantoins as modulating agents for the ABCB1 efflux pump, cytotoxic, antiproliferative effects on resistant T cell lymphoma.	Mouse T-cell lymphoma L5178Y	ABCB1 inhibition, Pgp pump stimulation, cell death induction, antiproliferative effect, inhibition of cyclin D1 gene expression and stimulation of p53 expression.

The synthesis was performed from the cleavage of the Imidazolidine ring.The structure induced monocyclic complexes by reacting with hydrated salts or appropriate acetylacetonates of Al (III), Fe (III), Ga (III) and In (III) ions. They evaluated the cytotoxic potential of those molecules in KB-3-1 cells of human epidermal carcinoma and verified the drug resistance with colchicine in the KB-8-5 (RMF) cell line.

The molecule displayed levels of cytotoxicity only when complexed with In (III) ion, in KB 8-5 cell line. In contrast, the evaluation in KB-3-1 cell lines significantly induced cytotoxic activity. These data were the first to unveil the Imidazolidine structure towards the study of cancer therapy.

Ghosh *et al*., (1997) evaluated the anticancer activity of the 1-[2-{bis(2'-chloroethyl)amino}ethyl]spiro[imidazolidine-4,2'-(1'H),3', 4'-dihydronaphthalenel-2,5-dione,(4,β-tethymurtine, represented in Structure **3**. They inoculated the compound in female Swiss mice cells from carcinoma Ascetic Erlich, sarcoma-18 and Hodgkin lymphoma for 7 days in a dose ranging from 4 to 8mg/kg. The results revealed an expressive tumor remission on cells treated with the derivate [30, 31].

A decade later, in 2009, Kavitha *et al*. evaluated the ability of spirohydantoin derivatives 8-(3,4-difluorobenzyl)-10-(pent-4-enyl)-8-azaspiro{bicyclo[3.2.1] octane-3,40-imidazolidine}-20,50-dione (DFH) and 8-(3,4-dichlorobenzyl)-10-(pent-4-enyl)-8-azaspiro[bicyclo[3.2.1] octane-3,40-imidazolidine}-20,50-dione (DCH) inhibit cell growth and apoptosis of leukemia cells lines (Structure **4A** and **B**, respectively).

Cell cytotoxicity was confirmed in leukemia cells as much as the anti-tumoral activity was revealed by the inhibition of cell cycle and DNA replication in the same cell line.

In the same year Mukherjee *et al*. studied the molecule 3-[2-{3-(2-chloroethyl)-3-nitrosouriedo}ethyl]-spiro[5,9'-fluorenyl]imidazolidine-2,4-dione, called fluoren-NU(Structure **5**). The analysis lodged a DNA binding partner molecule with a significant cytotoxic activity in human neuroblastoma SK-N-SH cell line. Encouraged by this, researchers also performed *in vivo* tests with Swiss female rats, which received grafts with liver cancer cells and sarcoma-180 cells. The use of synthesized molecules showed an increase in the animals' life span and regression of tumors. The ideal dose was 40 mg/kg through seven days of the treatment [32, 33].

El-Sawy and collaborators (2010) synthesized the 1-benzoyl-3-heterocyclice molecule (Structure **6**). Cytotoxic tests were performed with a concentration range from 7 to 10 mol / L against human ovarian cancer strains (OVCAR3 and BG-1). They observed a higher cell mortality rate of 99.9% of the OVCAR3 cell line and 99.8% for the BG-1 cell line, 48 hours after administration of the imidazolidine derivative. *In vivo* analysis demonstrated that mice treated with a dose of 1 mmol / day per gram of body achieved an inhibition of 96.9% of the growth of the tumor mass, indicating a tumor suppression activity [34].

In 2013 Shah *et al*., performed studies to characterize four molecules from imidazolidines chemical structures in order to verify their interaction with DNA structure. The molecules were represented as 5-benzylideneimidazolidine-2,4-dione (NBI), 5-(2-hydroxybenzylidene)imidazolidine-2,4-dione (HBI), 5-(4-methoxybenzylidene)imidazolidine-2,4-dione (MBI) and 5-(3,4-di-methoxybenzylidene)imidazolidine-2,4-dione (DBI) (Structure **7**). Treatment with the compounds mentioned above-outlined DNA damage and cell death-inducing actions.

In the same year, Sakthivel and Guruvayoorappan aimed to prove the anticancer activity of imidazolidine molecules (2-(methylthio)-5-(furylmethylidene)-N(3)-(2'-chlorobenzyl-4-imidazolidine) obtained from natural extracts of *Acacia ferruginea*. In the study, (no structure displayed in the paper),mice were subjected to intraperitoneal injection of Dalton's Lymphoma (LDA) cells and underwent treatment for 14 days with intraperitoneal application of the ferrugin layer (10 mg/kg). They observed a considerable reduction in the size of the tumor mass and an increase in the lifetime period of mice [35]. Additionally, they quantified a decrease in serum biochemical markers such as aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), Glutamyl Transferase (γ-GT), and Nitric Oxide (NO) enzymes. Of note, the molecules augmented the production of inflammatory response such as interleukin-2 (IL-2), interferon-gamma (IFN-γ) serum levels and CD4 + T cells in animals with solid tumors [36].

According to the studies by Kavitha *et al*., 2013, the imidazolidine derivate ASHD - propyl-2-(8-(3,4-difluorobenzyl)-29,59-dioxo-8-azaspiro[bicyclo[3.2.1]octane-3,49-imidazolidine]-19-yl)acetate (Structure **8**) showed an anticancer activity *in vitro*. Cell cytotoxicity was evaluated using MTT assays and the anti-tumoral activity was performed by the analysis of cell cycle inhibition, cellular staining with annexin V, JC1. The ASHD molecule (with alkyl ester group) showed a potent cytotoxicity activity against the K562 leukemic cells line. Moreover, the molecules demonstrated significant inhibition of DNA replication and cell cycle inhibition. The presence of apoptotic cells was analyzed from DNA fragmentation, chromatin condensation, apoptotic bodies, and a group of cells in phase G1 [37].

The treatment with ASHD revealed an increased expression of pro-apoptotic BAD proteins, a reduction in anti-apoptotic BCL2 proteins, and activation of caspase 9.

According to the studies of ČIŽEKOVÁ, *et al*. (2014), the compound 3,6-bis ((1-alkyl-5-oxo-imidazolidin-2-yliden) imino) acridine hydrochlorides (AcrDIMs) (Structure **9**), disclosed a photosensitizing potential for antitumor therapy. DNA interaction was confirmed in A2780 human ovarian cancer cell lines and L1210 mouse lymphocytic leukemia cell lines. After treatment with AcrDIMs and irradiation in both strains aforementioned, they did not observe damage of DNA. Intriguing, the molecule was found in the cytoplasm region of the cells but not in the nucleus. However, the compound showed aspects compatible with the induction of the process of apoptosis (condensation of chromatin, decreased cell volume, vacuoles in the cell membrane) [38, 39].

In 2015, IVANENKOV and collaborators evaluated the molecular characteristics and anticancer activity of 2-thioxo-5*H*-dispiro[imidazolidine-4,3-pyrrolidine-2,3-indole]-2,5(1H)-diones (Structure **10**). The compound was tested to evaluate its cytotoxic potential through the MTT assay, using hepatocellular carcinoma cell lines (HepG2), renal embryonic cancer cells (Hek-293), breast cancer adeno (MCF-7), cervical cancer (SiHa) and colorectal carcinoma (HCT-116).

The selectivity of the compounds was not observed. The researchers used ICM-Pro software for 3D analysis of molecular couplings in an attempt to elucidate possible binding affinities and proposed an interaction and function-inhibition with MDM2 / p53 complex. Assuming that such a complex plays a pivotal role in cancer signaling, the authors suggested a promising molecule for testing in anticancer therapies [40].

Studies of Dar, Shamsuzzaman, and Khan (2016) aimed at reporting the synthesis of new steroidal imidazolidines derivatives (Structure **11**). The characterization and functional analysis of the molecules were evaluated by spectral UV-Vis techniques, measurements of physical-chemical characteristics, electrophoresis and molecular docking. In electrophoresis studies, the DNA cleavage capacity was analyzed using pBR322 DNA probes. The DNA concentrations were kept constant (300 ng), with a variation of the compound ranging from 1 to 5 μM. The concentrations above 2 μM resulted in the activation of nuclease enzymes, allowing the condensation of DNA strand. In the concentrations close to 5 μM they observed a complete conversion to linear strand DNA. The staining

with methyl green revealed an association with the minor groove of the DNA molecule, confirmed by molecular docking assays [41].

Cytotoxicity tests were performed using breast adenocarcinoma cell lines (MCF-7), cervical adenocarcinoma (HeLa), acute promyelocytic leukemia (HL-60), type B colorectal adenocarcinoma (SW480) and hepatocellular carcinoma (HepG2). The compound showed cytotoxic potential in all cell lines [41]. They also stated morphological changes compatible with apoptosis process.

Lafayette and collaborators in 2017 evaluated the DNA-binding capacity of 5- (1*H*-indol-3-ilmetilene) -2-tioxo-imidazolidin-4-ona (Structure **12**), synthetized from *1H* -indole-3-carbaldehyde.

The study used MTT methodology in HL60 (acute promyelocytic leukemia), K562 (chronic myeloid leukemia), T47D (breast ductal carcinoma) and MCF7 (breast adenocarcinoma) cell lines. The authors confirmed cytotoxic activity in all cell lines, with a higher selectivity for the HL60.A UV-Vis analysis showed deleterious alteration in the conformation of DNA strand after binding with the derivative and an impairment in tumor cell progression [42].

In 2018, Aboeldahab et. al, synthesized two series of spirohydantoin molecules (3',4'-dihydro-2'*H*-spiro[imidazolidine-4,1'-naphthalene]-2,5-dione (Structure **13**), and evaluated not only the antiproliferative potential *in vitro*, but also the mode of binding and inhibition of histone deacetylases (HDACs). The antiproliferative assays were performed using the MTT method in MCF7 (breast adenocarcinoma) and HepG2 (hepatocellular carcinoma) cell lines.

The MTT results revealed that only the spirohydantoin derivatives 5a-f inhibited the MCF7 cell line progression, with its IC 50 values ranging from 2.56 µM to 2.18 µM. In the HDAC inhibition study, again, only the compound 5f was able to inhibit histone deacetylases isoforms with IC 50 in the range of 0.027 µM to 0.261 µM [43].

According to the studies of Chemeva *et al*. (2020), they synthesized a platinum compound (Pt) which was called 3'-methyl-4-thio-1H-tetrahydropyranspiro- 5'-hydantoin (Structure **14**). The molecule was characterized by infrared methods and showed inhibition capacity for the enzyme xanthine oxidase. Cytotoxicity was confirmed in cell lines of chronic myeloid leukemia (K-562 strains) and lymphocytic leukemia (REH strains) [44].

Yao *et al*. (2020) developed a mold compound called β-carboline-1-one hydantoins, and by that synthesized **(6b)** 6-(4-Methoxybenzyl)-2-phenyl-1H-imidazo[1',5' :1,6 pyrido[3,4-b]indole-1,3,5 (2H,6H)-trione (Structure **15a**) and **(6c)** 4-[(1,3,5-Trioxo-2-phenyl-1,2,3,5-tetrahydro-6H-imidazo[1',5':1,6] pyrido[3,4-b]indole-6-yl)methyl]benzonitril (Structure **15b**).

In the study, cell cytotoxicity and anti-tumoral activity were confirmed in MCF-7 (estrogen-positive and HER-2 negative breast cancer), MDA-MB-231 (triple negative breast cancer), and Lung Cancer A549 (lung adenocarcinoma), NCI-H 460 (large cell carcinoma of the lung) [45].

Ali and collaborators (2020) conducted a robust study of synthesis, physical-chemical analysis and biological effects of Methyl 2-(2,5-dioxo-4,4-diphenyl -3-(4-(phenylselanyl)butyl)imidazolidin-1-yl)acetate (C5) (structure16a), methyl 2-(2,5-dioxo-4,4-diphenyl-3-(6-(phenylselanyl)hexyl)imidazol ididin-1-yl)acetate (C6) (Structure **16b**) and 1'-methyl-3'-(4-(phenylselanyl)butyl)spiro[fluorene-9,4'-imidazolidine]-2',5'-dione (C7) (Structure **16c**).

The influence of compounds C5, C6 and C7 on the ABCB1 gene was evaluated, which has a regulatory correlation in resistance to multiple drugs, such influence was evaluated by fluorescence assays, as a positive control the well-known 20 µM verapamil chemotherapy was used, compounds C5, C6 and C7 were tested at concentrations ten times lower (2 µM), which showed strong inhibition of the ABCB1 gene [46].

In the study by Yao *et al*. (2020) tests were performed on the interference of compounds C5, C6 and C7 on the activity of the Pgp pump ATPase enzyme and possible increases in ATP consumption, for this the luminescence method was used, using 200 µM of verapamil as a positive control and caffeine as a negative control, as a result it was observed that both compounds showed a significant increase in Pgp activity in relation to the control, which allows us to state that these compounds did not inhibit the Pgp pump.

Cytotoxicity and migration studies of compounds C5, C6 and C7 were performed in T5 lymphoma cell lines of L5178Y mice, where a very high cytotoxic effect of the compounds was observed. migration tests, positive results were observed beyond those expected, with compound C6 also standing out here [46].

For presenting better performance in relation to the other compounds, compound C6 was evaluated for its interference in the cell cycle in the gene expression of cyclin D1 and protein p53 in immortalized Jukart cell lines and, using the qRT-PCR assay, it was found that expression of cyclin D1 and protein p53, it is observed that compound 6C reduced the expression of cyclin D1 and induced the expression of p53, a fact that contributes to inhibitting the progression of the cell cycle and cell proliferation [46].

These findings of the studies by Ali *et al*. (2020) allow us to affirm that the developed compounds have a high potential for anticancer application and progression to further studies and perhaps future prospects of chemotherapy drugs.

Recently, Upadhyay *et al*. (2021), synthesized the compound 1-(2-(3,5-Diphenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)-2-oxoethy) imidazolidine-2,4-dione (H13), diaril|pirazolines and imidazolidine-2,4-diona (hidantoin) derivative (Structure **17**). The molecules displayed a significant cytotoxicity effect in tumor cells from breast cancer cell lines (MCF-7), chronic myeloid leukemia (k562) and rectal adenocarcinoma (HT-29) [47]. Additionally, H13 was incubated with the K562 cell line for 72 hours in order to evaluate its apoptotic effect. As a result, not only the authors observed a significant expression of caspases in the assay, but also, H13 declined the expression of Bcl-2, in a Bcl-2 protein expression assays, endorsing an apoptotic activity of H13 [47].

In the analysis of the cell cycle, H13 were incubated for 72 hours with K562 cell lines in different concentrations. They observed an interruption of cell cycle through a decrease in the number of cells in the G2 / M phase compared to the control. Further, H13 increased ATM protein phosphorylation and DNA strand breakage [47]. Thus, the aforementioned results highlighted the potential speculation of H13 as an antitumor agent.

CONCLUSION

With the help of diversified tools and cell lines, it was possible to achieve a clear-cut comprehension of the dynamic features of imidazolidine derivatives in the context of cancer therapies. However, the goal of standing this molecule in the field of cancer still requires an extensive knowledge pertaining to the specificity, selectivity and efficacy of the compounds. Additional findings are yet warranted about clinical trials using such derivatives. Nonetheless, even if further studies must be performed to dig into a better comprehension of imidazolidine derivatives, the present review stepped into a compilation of studies enlightening the directions of such molecules for the future of cancer treatment.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

FUNDING

None.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

Declared none.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is available on the publisher's website along with the published article.

REFERENCES

[1] INCA, Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2017. http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf

[2] Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.*, **2018**, *68*(6), 394-424. https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21492

[3] Sierra, M.S.; Soerjomataram, I.; Antoni, S.; Laversanne, M.; Pineros, M.; de Vries, E.; Forman, D. Cancer patterns and trends in Central and South America. *Cancer Epidemiol.*, **2016**, *44*(Suppl. 1), S23-S42. http://dx.doi.org/10.1016/j.canep.2016.07.013 PMID: 27678320

[4] Freitas, R.M.; Rodrigues, A.M.X.; Matos, A.F.Jr; Oliveira, G.A.L. Risk factors and main cytopathological changes in oral cancer: A literature review. *RBAC*, **2016**, *48*(1), 13-8.

[5] Czerny, R.C.N.; Pinto, M.E.; Pompeo, D.A.; Bereta, D.; Cardoso, L.V.; Silva, D.M. Prostate cancer risk factors: population from a basic health unit. *Cogitare enferm.*, **2017**, *22*(4), 1-10.

[6] Matos-Rocha, T.J.; Lima, M.C.A.; Veras, D.L.; Santos, A.F.; Silva, A.L.; Almeida Júnior, A.S.A.; Pitta-Galdino, M.R.; Pitta, I.R.; Pitta, M.G.R.; Alves, L.C.F.; Brayner, F.A. *In vivo* study of schistosomicidal action of (Z)-1-(2-chloro-6-fluoro-benzyl)-5-thioxo-4-(2,4,6-trimethoxy-benzylidene)-imidazolidin-2-one. *Braz. J. Biol.*, **2020**, *80*(1), 187-189. http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.190062 PMID: 31166369

[7] Santos, S.L.F.D.; Alves, H.H.D.S.; Pessoa, C.V.; Saraiva, H.S.T.T.; Barros, K.B.N.T. Evidências do cuidado farmacêutico na prática clínica da oncologia. *Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba*, **2018**, *20*(2), 77-81. http://dx.doi.org/10.23925/1984-4840.2018v20i2a4

[8] Cho, S.; Kim, S.H.; Shin, D. Recent applications of hydantoin and thiohydantoin in medicinal chemistry. *Eur. J. Med. Chem.*, **2019**, *164*, 517-545. http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.12.066 PMID: 30622025

[9] Munder, A.; Moskovitz, Y.; Redko, B.; Levy, A.R.; Ruthstein, S.; Gellerman, G.; Gruzman, A. Antiproliferative effect of novel aminoacridine-based compounds. *Med. Chem.*, **2015**, *11*(4), 373-382. http://dx.doi.org/10.2174/1573406411666141217110946 PMID: 25524547

[10] Kwan, J.Y.; Nyhof-Young, J.; Catton, P.; Giuliani, M.E. Mapping the future: towards oncology curriculum reform in undergraduate medical education at a Canadian medical school. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **2015**, *91*(3), 669-677. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijrobp.2014.11.017 PMID: 25583687

[11] da Silva, L.C.A.; Signor, A.C.; Pilati, A.C.L.; Dullollo, B.R.; Oliveira, D.R. Educational approach to cancer patients: Strategies for guidance on chemotherapy treatment. *Rev. Bras. Cancerol.*, **2019**, 65(1), e-06305. http://dx.doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2019v65n1.305

[12] Leite, M.A.C.; Nogueira, D.A.; Terra, F.S. Aspectos sociais e clínicos de pacientes oncológicos de um serviço quimioterápico. *Rev Rene.*, **2015**, *16*(1), 38-45. http://dx.doi.org/10.15253/2175-6783.2015000100006

[13] National Comprehensive Cancer Network (NCCN). NCCN guidelines. [Internet]. Philadelphia; c2017. Available from: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp [cited 2017 May 6].

[14] European Society for Medical Oncology (ESMO) Clinical practice guidelines [Internet]. Lugano: ESMO; c2017. Available from: http://www.esmo.org/Guidelines [cited 2017 May 5].

[15] Kaliks, R.A.; Matos, T.F.; Silva, V.A.; Barros, L.H.C. Diferenças no tratamento sistêmico do câncer no Brasil: meu SUS é diferente do teu SUS. *Braz J Oncol.* **2017**, *13*(44), 1-12.

[16] Hand, C.M.; Kim, S.; Waldow, S.M. Overview of radiobiology.*Washington CM, Leaver D, editores. Principles and practice of radiation therapy*. 2nd ed; Mosby: Missouri, **2004**, pp. 55-85.

[17] Paredes, W.E.; Andrade, D.; Geraldo, A. Radioterapia Oncológica: efectos y repercusión en la cavidad bucal. **2017**.

[18] Spezzia, S. O uso do bolus na radioterapia. *Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba*, **2016**, *18*(4), 183-186.

[19] Guedes, J.B.R.; Guerra, M.R.; Alvim, M.M.; Leite, I.C.G. Factors associated with adherence and persistence to hormonal therapy in women with breast cancer. *Rev. Bras. Epidemiol.*, **2017**, *20*(4), 636-649. http://dx.doi.org/10.1590/1980-5497201700040007 PMID: 29267749

[20] Pellegrini, I.; Sarradon-Eck, A.; Soussan, P.B.; Lacour, A.C.; Largillier, R.; Tallet, A.; Tarpin, C.; Julian-Reynier, C. Women's perceptions and experience of adjuvant tamoxifen therapy account for their adherence: breast cancer patients' point of view. *Psychooncology.* **2010**, *19*(5), 472-479. http://dx.doi.org/10.1002/pon.1593 PMID: 19507263

[21] Liu, H.; Yang, Z.; Pan, Z. Synthesis of highly substituted imidazolidine-2,4-dione (hydantoin) through Tf2O-mediated dual activation of Boc-protected dipeptidyl compounds. *Org. Lett.*, **2014**, *16*(22), 5902-5905. http://dx.doi.org/10.1021/ol502900j PMID: 25357005

[22] Šmit, B.M.; Pavlović, R.Z. Three-step synthetic pathway to fused bicyclic hydantoins involving a selenocyclization step. *Tetrahedron*, **2015**, *71*(7), 1101-1108. http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2014.12.068

[23] Castro, N.R.; Marçal, L.L. Estudo da síntese de derivados de imidazolidinas-2, 4-dionas e obtenção de novos derivados. *Revista Eletrônica Perspectivas da Ciência e Tecnologia*, **2018**, *10*, 150. ISSN: 1984-5693

[24] Caterino, M.C.; Perillo, I.A.; Boiani, L.; Pezaroglo, H.; Cerecetto, H.; González, M.; Salerno, A. Imidazolidines as new anti-Trypanosoma cruzi agents: biological evaluation and structure-activity relationships. *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, *16*(5), 2226-2234. http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2007.11.077 PMID: 18083035

[25] Rogawski, M.A.; Löscher, W. The neurobiology of antiepileptic drugs for the treatment of nonepileptic conditions. *Nat. Med.*, **2004**, *10*(7), 685-692. http://dx.doi.org/10.1038/nm1074 PMID: 15229516

[26] Moguilewsky M.; Bertagna, C.; Hucher, M.. Pharmacological and clinical studies of the antiandrogen anandron. *J. Steroid Biochem.*, **1910**, *1954*(27), 871-875.

[27] Bakalova, A.G.; Buyukliev, R.T.; Nikolova, A.T.; Momekov, G.T. Synthesis, characterization and cytotoxic activity of new palladium complexes with 3-Thiolanespiro- 5''-Hydantoin and 4-Thio-1h-Tetrahydropyranespiro-5''-Hydantoin. *Ame. J. Pharm. Res.*, **2014**, *4*

[28] Matos-Rocha, T.J.; Alves de Lima, M.C.; Lauro da Silva, A.; Ferreira de Oliveira, J.; Gouveia, A.L.A.; Ribeiro da Silva, V.B.; Alves de Almeida Júnior, A.S.; Brayner, F.A.; Cardoso, P.R.G.; Pitta-Galdino, M.R.; Pitta, I.R.; Rêgo, M.J.B.M.; Alves, L.C.; Pitta, M.G.R. Synthesis and biological evaluation of novel imidazolidine derivatives as candidates to schistosomicidal agent. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, **2017**, *59*, e8.

[29] López-López, L.I.; de Loera-Carrera, D.A.; de Jesús Rivera-Ávalos, E.; Suárez-Galindo, A. Hydantoin and derivatives as structures of importance in medicinal chemistry: Recent advances. *Affinity: J. Theoret. Appl. Chem.*, **2018**, *75*(584), 279-289.

[30] Sharma, V.; Cruickshaw, C.L.; Piwnica-Worms, D. Effects of multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein expression levels and coordination metal on the cytotoxic potency of multidentate (N4O2) (ethylenediamine)bis(propyl(R-benzylimino))metal(III) cations. *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*(18), 3483-3490. http://dx.doi.org/10.1021/jm950823c PMID: 8784446

[31] Kavitha, C.V.; Nambiar, M.; Ananda Kumar, C.S.; Choudhary, B.; Maniyappa, K.; Rangappa, K.S.; Raghavan, S.C. Novel derivatives of spirohydantoin induce growth inhibition followed by apoptosis in leukemia cells. *Biochem. Pharmacol.*, **2009**, *77*(3), 348-363. http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2008.10.018 PMID: 19014909

[32] Ghosh, M.; Bhattacharya, S.; Sadhu, U.; Datta, S.; Sanyal, U. Evaluation of β-tethymastine, a new anticancer compound, in marine tumour models. *Cancer Lett.*, **1997**, *119*(1), 7-12. http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3835(97)00244-9 PMID: 18372515

[33] Mukherjee, A.; Datta, S.; Chashoo, G.; Bhagat, M.; Saxena, A.K.; Sanyal, U. Evaluation of fluoren-NU as a novel antitumor agent. *Oncol. Res.*, **2009**, *17*(9), 387-396. http://dx.doi.org/10.3727/096504009788912516 PMID: 19718945

[34] El-Sawy, E.; Bassyouni, F.; Abu-Bakr, S.; Rady, H.; Abdlla, M. Synthesis and biological activity of some new 1-benzyl and 1-benzoyl-3-heterocyclic indole derivatives. *Acta Pharmaceutica*, **2010**, *60*(1), 55-71.

[35] Shah, A.; Nosheen, E.; Munir, S.; Badshah, A.; Qureshi, R.; Rehman, Z.U.; Muhammad, N.; Hussain, H. Characterization and DNA binding studies of unexplored imidazolidines by electronic absorption spectroscopy and cyclic voltammetry. *J. Photochem. Photobiol. B.* **2013**, *120*, 90-97. http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2012.12.015 PMID: 23474470

[36] Sakthivel, K.M.; Guruvayoorappan, C. Acacia ferruginea inhibits tumor progression by regulating inflammatory mediators-(TNF-α, iNOS, COX-2, IL-1β, IL-6, IFN-γ, IL-2, GM-CSF) and pro-angiogenic growth factor- VEGF. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **2013**, *14*(6), 3909-3919. http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2013.14.6.3909 PMID: 23886206

[37] Kavitha, C.V.; Nambiar, M.; Narayanaswamy, P.B.; Thomas, E.; Rathore, U.; Ananda Kumar, C.S.; Choudhary, B.; Rangappa, K.S.; Raghavan, S.C. Propyl-2-(8-(3,4-difluorobenzyl)-2',5'-dioxo-8-azaspiro[bicyclo[3.2.1] octane-3,4'-imidazolidine]-1'-yl) acetate induces apoptosis in human leukemia cells through mitochondrial pathway following cell cycle arrest. *PLoS One*, **2013**, *8*(7), e69103. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0069103 PMID: 23922684

[38] Cižková, L.; Grolmusová, A.; Ipóthová, Z.; Barbieriková, Z.; Brezová, V.; Huníková, L.; Imrich, J.; Janovec, L.; Dovinová, I.; Paulíková, H. Novel 3,6-bis(imidazolidine)acridines as effective photosensitizers for photodynamic therapy. *Bioorg. Med. Chem.*, **2014**, *22*(17), 4684-4693. http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2014.07.013 PMID: 25096820

[39] Koczor, C.A.; Shokolenko, I.N.; Boyd, A.K.; Balk, S.P.; Wilson, G.L.; LeDoux, S.P. Mitochondrial DNA damage initiates a cell cycle arrest by a Chk2-associated mechanism in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, **2009**, *284*(52), 36191-36201. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.036020 PMID: 19840931

[40] Ivanenkov, Y.A.; Vasilevski, S.V.; Beloglazkina, E.K.; Kukushkin, M.E.; Machulkin, A.E.; Veselov, M.S.; Chufarova, N.V.; Chernyaginab, E.S.; Vanzcool, A.S.; Zyk, N.V.; Skvortsov, D.A.; Khutornenko, A.A.; Rusanov, A.L.; Tonevitsky, A.G.; Dontsova, O.A.; Majouga, A.G. Design, synthesis and biological evaluation of novel potent MDM2/p53 small-molecule inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2015**, *25*(2), 404-409. http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.09.070 PMID: 25479770

[41] Dar, A.M.; Shamsuzzaman, ; Khan, S. Spectroscopic, viscositic, DNA binding and cytotoxic studies of newly synthesized steroidal imidazolidines. *J. Fluoresc.*, **2016**, *26*(2), 639-649. http://dx.doi.org/10.1007/s10895-015-1750-7 PMID: 26698876

[42] Lafayette, E.A.; de Almeida, S.M.V.; Cavalcanti Santos, R.V.; de Oliveira, J.F.; Amorim, C.A.D.C.; da Silva, R.M.F.; Pitta, M.G.D.R.; Pitta, I.D.R.; de Moura, R.O.; de Carvalho Júnior, L.B.; de Melo Rêgo, M.J.B.; de Lima, M.D.C.A. Synthesis of novel indole derivatives as promising DNA-binding agents and evaluation of antitumor and antitopoisomerase I activities. *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, *136*, 511-522. http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.05.012 PMID: 28531811

[43] Aboelidahab, A.M.A.; Beshr, E.A.M.; Shoman, M.E.; Rabea, S.M.; Aly, O.M. Spirohydantoins and 1,2,4-triazole-3-carboxamide derivatives as inhibitors of histone deacetylase: Design, synthesis, and biological evaluation. *Eur. J. Med. Chem.*, **2018**, *146*, 79-92. http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.021 PMID: 29396364

[44] Cherneva, E.; Atanasova, M.; Buyukliev, R.; Tomovic, K.; Smelcerovic, Z.; Bakalova, A.; Smelcerovic, A. 5'-Methyl-4-thio-1H-tetrahydropyranspiro-5'-hydantoin platinum complex as a novel potent anticancer agent and xanthine oxidase inhibitor. *Arch. Pharm. (Weinheim)*, **2020**, *353*(7), e2000039. http://dx.doi.org/10.1002/ardp.202000039 PMID: 32329137

[45] Yao, C.H.; Hsieh, T.C.; Song, J.S.; Lee, J.C. Design, synthesis and anticancer evaluation of β-carboline-1-one hydantoins. *Future Med. Chem.*, **2020**, *12*(3), 183-192. http://dx.doi.org/10.4155/fmc-2019-0276 PMID: 31813284

[46] Ali, W.; Spengler, G.; Kincses, A.; Nové, M.; Battistelli, C.; Latacz, G.; Starek, M.; Dąbrowska, M.; Honkisz-Orzechowska, E.; Romanelli, A.; Rosile, M.M.; Szymańska, E.; Jacob, C.; Zwergel, C.; Handzlik, J. Discovery of phenylselenoether-hydantoin hybrids as ABCB1 efflux pump modulating agents with cytotoxic and anti-proliferative actions in resistant T-lymphoma. *Eur. J. Med. Chem.*, **2020**, *200*, 112435. http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112435 PMID: 32505850

[47] Upadhyay, N.; Tilekar, K.; Loiodice, F.; Anisimova, N.Y.; Spirina, T.S.; Sokolova, D.V.; Smirnova, G.B.; Choe, J.Y.; Meyer-Almes, F.J.; Pokrovsky, V.S.; Lavecchia, A.; Ramaa, C.S. Pharmacophore hybridization approach to discover novel pyrazoline-based hydantoin analogs with anti-tumor efficacy. *Bioorg. Chem.*, **2021**, *107*, 104527. http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104527 PMID: 33317839

DISCLAIMER: The above article has been published, as is, ahead-of-print, to provide early visibility but is not the final version. Major publication processes like copyediting, proofing, typesetting and further review are still to be done and may lead to changes in the final published version, if it is eventually published. All legal disclaimers that apply to the final published article also apply to this ahead-of-print version.