



**UFPE**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA FARMACÊUTICAS**

**HELOIZA CRISTINA SOARES FERREIRA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DO DERIVADO DE  
TIOSEMICARBAZONAS PR-11 EM CÉLULAS DE CÂNCER DE PULMÃO**

**RECIFE-PE  
2023**

HELOIZA CRISTINA SOARES FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DO DERIVADO DE  
TIOSEMICARBAZONAS PR-11 EM CÉLULAS DE CÂNCER DE PULMÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

**Orientadora:** Prof. Dra. Michelly Cristiny Pereira

**Co Orientadora:** José Arion da Silva Moura

RECIFE-PE  
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Ferreira, Heloiza Cristina Soares.

Avaliação da atividade antineoplásica do derivado de tiossemicarbazonas PR-11 em células de câncer de pulmão / Heloiza Cristina Soares Ferreira. - Recife, 2023.

52 : il., tab.

Orientador(a): Michelly Cristiny Pereira

Coorientador(a): José Arion da Silva Moura

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Farmácia - Bacharelado, 2023.

Inclui referências, apêndices, anexos.

1. Câncer de Pulmão. 2. Tiossemicarbazonas. 3. Cisplatina. 4. Resistência. 5. Mecanismo de Ação. I. Pereira, Michelly Cristiny . (Orientação). II. Moura, José Arion da Silva. (Coorientação). IV. Título.

610 CDD (22.ed.)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA**



Aprovada em: 06 / 10 / 2023.

**BANCA EXAMINADORA**



Documento assinado digitalmente  
**MICHELLY CRISTINY PEREIRA**  
Data: 13/10/2023 21:12:22-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Prof. Dr. Michelly Cristiny Pereira**  
(Orientadora)  
Universidade Federal de Pernambuco



Documento assinado digitalmente  
**BETANIA LUCENA DOMINGUES HATZLHOFFER**  
Data: 09/10/2023 10:55:20-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Profa. Dra. Betânia Lucena Domingues Hatzlhofer**  
(Presidente e Examinador)  
Universidade Federal de Pernambuco



Documento assinado digitalmente  
**BARBARA DE OLIVEIRA SILVA**  
Data: 07/02/2024 16:15:40-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Dra. Bárbara de Oliveira Silva**  
(Examinadora)  
Universidade Federal de Pernambuco



Documento assinado digitalmente  
**ANA VITORIA ARAUJO LIMA**  
Data: 16/02/2024 10:48:40-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Dra. Ana Vitória Araújo Lima**  
(Suplente)  
Hospital Militar do Recife

Dedico este trabalho ao meu avô.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, sem Ele nada seria possível. A minha família, que sempre esteve ao meu lado, especialmente a minha mãe, Jaidete Soares que é meu maior exemplo de resiliência, ao meu pai, Alexsandro Cabral, a quem eu amo além da genética, aos meus irmãos, Maria Letícia, Cauã Soares, Júlia Souto, Maria Sofia e Benício Ferreira, que são a razão de minha persistência e a minha tia, Jaqueline Soares, que sempre me apontou o caminho da ciência. Ao meu namorado, Danillo, que me apoia em tudo que faço. Ao meu filho do coração, Abner, por me “reensinar” o que é amar. Aos meus colegas de faculdade, em especial Azael e Evelyn, que foram minha fortaleza nesses 5 anos de curso. Aos meus colegas do Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica - Suely Galdino, em especial Maryllia Morais, minha mentora de cultura de células e amiga e a Guaraná, por sempre me livrar da ansiedade com trechos musicais. À minha orientadora Michelly Pereira, por toda paciência, compreensão e confiança na minha capacidade. À Valéria Moura, minha coorientadora de iniciação científica e parceira de experimentos, por toda dedicação em me fazer uma profissional melhor e por ser minha inspiração acadêmica. A todos que me incentivaram a ser a farmacêutica que me tornei.

## RESUMO

O câncer de pulmão (CP) é a principal causa de mortalidade mundial dentre os cânceres, extremamente prevalente na maioria dos países. Aproximadamente 70% dos indivíduos acometidos com CP recebem um diagnóstico tardio, no estadiamento III e IV. O tratamento dessa patologia ocorre por meio de cirurgias, imunoterapia, radioterapia e quimioterapia. A quimioterapia é comumente realizada com derivados de platina, como a cisplatina, que apresenta efeitos adversos severos ao paciente. Diante disso, novas moléculas com atividade antineoplásica estão sendo desenvolvidas como alternativa para o tratamento do CP, dentre elas destacam-se os derivados de tiossemicarbazonas (TSCs). Dessa forma, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito antineoplásico do derivado de TSCs na linhagem de câncer de pulmão de células não pequenas A549 e H1299. Por meio da análise *in silico*, pelos softwares Swiss Target Prediction e Super-pred foram avaliados os principais alvos do derivado PR-11, além do programa Swiss ADME, que realizou a análise farmacocinética. Além disso, foram empregados ensaios de MTT para avaliar a citotoxicidade dos compostos nas linhagens H1299 e A549, assim como em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). Adicionalmente, foi avaliada a capacidade do composto interferir na proliferação e morte celular da linhagem A549. Na análise *in silico*, os parâmetros farmacocinéticos foram favoráveis para a biodisponibilidade do composto, assim como obedeceu às regras estabelecidas por Lipinski. A predição de alvos demonstrou que o composto se liga em maior quantidade às quinases dependentes de ciclinas (CDKs), as quais estão relacionadas com o ciclo celular. A concentração inibitória ( $IC_{50}$ ) do PR-11 em PBMCs foi de 15,65  $\mu$ M, enquanto na linhagem A549 foi 1,05  $\mu$ M e na linhagem H1299, 15,48  $\mu$ M. A linhagem A549 mostrou um bom índice de seletividade (14,9). As análises de ciclo e morte celular na linhagem A549 apresentaram resultados estatisticamente inesperados, de modo a entender que o composto não possui mecanismos relacionados às vias de morte celular por apoptose e necrose e do ciclo celular. O derivado apresenta efeito antineoplásico relevante nas linhagens tumorais de pulmão, porém ainda é necessária a busca para verificar por quais mecanismos de ação o composto exerce sua atividade anticancerígena.

**Palavras-chave:** Câncer de pulmão. Tiossemicarbonas. Cisplatina. Resistência. Mecanismo de ação.

## ABSTRACT

Lung cancer (LC) is the leading cause of mortality among cancers worldwide, extremely prevalent in most countries. Approximately 70% of individuals affected by CP receive a late diagnosis, in stages III and IV. Treatment of this pathology occurs through surgery, immunotherapy, radiotherapy and chemotherapy. Chemotherapy is commonly performed with platinum derivatives, such as cisplatin, which has severe adverse effects on the patient. Given this, new molecules with antineoplastic activity are being developed as an alternative for the treatment of PC, among which thiosemicarbazone derivatives (TSCs) stand out. Therefore, the objective of the study was to evaluate the antineoplastic effect of the TSCs derivative on the non-small cell lung cancer line A549 and H1299. Through *in silico* analysis, using the Swiss Target Prediction and Super-pred software, the main targets of the PR-11 derivative were evaluated, in addition to the Swiss ADME program, which performed the pharmacokinetic analysis. Furthermore, MTT assays were used to evaluate the cytotoxicity of the compounds on H1299 and A549 cell lines, as well as on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Additionally, the compound's ability to interfere with cell proliferation and death of the A549 lineage was evaluated. In the *in silico* analysis, the pharmacokinetic parameters were favorable for the bioavailability of the compound, as well as obeying the rules established by Lipinski. Target prediction demonstrated that the compound binds in greater quantities to cyclin-dependent kinases (CDKs), which are related to the cell cycle. The inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of PR-11 in PBMCs was 15.65  $\mu$ M, while in the A549 lineage it was 1.05  $\mu$ M and in the H1299 lineage, 15.48  $\mu$ M. The A549 strain showed a good selectivity index (14.9). Cell cycle and death analyzes in the A549 lineage presented statistically unexpected results, in order to understand that the compound does not have mechanisms related to cell death pathways through apoptosis and necrosis and the cell cycle. The derivative has a relevant antineoplastic effect on lung tumor lines, but research is still needed to verify through which mechanisms of action the compound exerts its anticancer activity.

**Keywords:** Lung cancer. Thiosemicarbazones. cisplatin. Resistance. Mechanism of action.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Adenocarcinoma pulmonar com padrão acinar, HE, 100x.....	15
Figura 2. Representação esquemática da entrada da cisplatina na célula e sua posterior ligação com o DNA no núcleo.....	22
Figura 3. Fórmula geral dos derivados de TSCs.....	23
Figura 4: Representação esquemática da apoptose, necrose e autofagia.....	25
Figura 5: Fluxograma representativo da metodologia utilizada para o estudo.....	27
Figura 6: Fórmula estrutural do composto N-(4-metoxifenil)-2-((5-nitrotiofen-2il)metileno)hidrazinacarbotioamida ou PR-11.....	28
Figura 7: Gráfico radar representando a biodisponibilidade da molécula do PR-11..	35
Figura 8: Viabilidade celular do PR-11 em PBMCs.....	37
Figura 9. Viabilidade celular das linhagens neoplásicas de pulmão A549 (A) e H1299 (B) após tratamento com o composto PR-11 nas concentrações de 1, 10, 50 e 100 $\mu\text{M}$ .....	38
Figura 10. Análise do ciclo celular na linhagem A549 após 24h (A) e 48h (B) de tratamento com o derivado PR-11 (IC50: 1 $\mu\text{M}$ ) e cisplatina (IC50: 33 $\mu\text{M}$ ).....	41
Figura 11: Avaliação da indução de apoptose e necrose na linhagem A549 após 24h e 48h de tratamento com o composto PR-11 (IC50: 1 $\mu\text{M}$ ) e cisplatina (IC50: 33 $\mu\text{M}$ )..	

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Representação dos medicamentos utilizados como segunda linha do tratamento do câncer de pulmão de células não pequenas.....	13
Tabela 2. Predição das propriedades farmacocinéticas do composto.....	22
Tabela 3. Previsão teórica da biodisponibilidade oral dos derivados de 2-(5-nitro-tiofeno)-tiossemicarbazona, segundo a “Regra dos 5” de Lipinski.....	22
Tabela 4. Previsão dos potenciais alvos terapêuticos dos derivados de 2-(5-nitro-tiofeno)-tiossemicarbazona.....	24
Tabela 5. Valores de IC50 ( $\mu\text{M}$ ) e índice de seletividade (IS) de novos derivados de tiossemicarbazonas em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e nas linhagens celulares A549 e H1299 (câncer de pulmão de células não pequenas)....	27

## LISTA DE SIGLAS

<b>CPCNP</b>	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas
<b>CPCP</b>	Câncer de Pulmão de Células Pequenas
<b>UFPE</b>	Universidade Federal de Pernambuco
<b>CP</b>	Câncer de Pulmão
<b>NUPIT-SG</b>	Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Sueli Galdino
<b>A549</b>	Linhagem Celular oriunda de câncer de pulmão
<b>H1299</b>	Linhagem Celular oriunda de câncer de pulmão
<b>CDKs</b>	Quinases dependentes de ciclinas
<b>PI</b>	Iodeto de propídeo
<b>IC50</b>	Concentração inibitória (50%)
<b>CYP</b>	Citocromo
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>LPSF</b>	Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos
<b>LINAT</b>	Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas
<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>ADME</b>	Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção
<b>BCRJ</b>	Banco de Células do Rio de Janeiro
<b>HEPES</b>	4-(2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid
<b>SFB</b>	Soro Fetal Bovino
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>MTT</b>	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>PBMC</b>	Células mononucleares do sangue periférico

<b>TSCs</b>	Tiossemicarbazonas
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
<b>PBS</b>	Phosphate-buffered saline
<b>PBMC</b>	Células mononucleares do sangue periférico
<b>OMS</b>	Organização mundial de saúde
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleíco
<b>Gy</b>	Gray
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>SMILES</b>	Sistema de entrada de linha de entrada molecular simplificado

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>16</b>
2.1 Câncer de pulmão.....	16
2.2 Fatores de risco.....	17
2.3 Tratamento.....	18
2.4 Tiossemicarbazonas.....	23
2.5 Mecanismos de ação do câncer.....	25
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
3.1 Objetivo geral.....	26
3.2 Objetivos específicos.....	27
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>27</b>
4.1 Desenho.....	27
4.2 Local do estudo.....	28
4.3 Derivado de TSCs.....	28
4.4 Comitê de ética.....	29
4.5 Cultura de células.....	29
4.6 Ensaio de citotoxicidade em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).....	30
4.6.1 Coleta de sangue.....	30
4.6.2 Isolamento das PBMCs.....	30
4.6.3 Ensaio de citotoxicidade em PBMCs.....	30
4.7 Ensaio de citotoxicidade in vitro em células neoplásicas.....	31
4.8 Análise do ciclo celular.....	32
4.9 Ensaio de indução de apoptose e necrose.....	32
4.10 Análise estatística.....	33
5.1 Análise in silico.....	33
5.1.1 Farmacocinética.....	33
5.1.2 Predição de alvos.....	36

5.2 Ensaio de citotoxicidade em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).....	37
5.3 Ensaio de citotoxicidade in vitro em células tumorais.....	39
5.4 Análise do ciclo celular.....	42
5.5 Apoptose e necrose.....	44
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>47</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de pulmão (CP) é um dos tipos de câncer mais incidentes mundialmente, sendo o mais comum nos homens e o terceiro nas mulheres. Além disso, é a principal causa mundial de mortalidade por câncer. No Brasil, o CP é o terceiro mais frequente em homens e o quarto em mulheres, retirando das estatísticas o câncer de pele não melanoma. O principal fator de risco do CP ainda é a exposição ao tabaco, mas fatores ambientais e ocupacionais também estão relacionados (Inca, 2022). O Global Cancer Observatory (GLOBOCAN) estima que a incidência para daqui 20 anos, nos casos de câncer de pulmão em ambos os sexos, tenha um aumento em cerca de 1,4 milhões de casos, nas idades de 0 a 85 anos.

O tratamento do CP é realizado por meio de cirurgia, radioterapia, quimioterapia e imunoterapia, sendo que atualmente, a quimioterapia é uma das mais empregadas, a qual utiliza esquemas terapêuticos contendo quimioterápicos como os derivados da platina (Silva, 2023). O tratamento atual do CPNPC baseia-se no estágio em que a doença se encontra, e um dos principais medicamentos utilizados é a cisplatina. pertencente à classe dos agentes alquilantes, esse medicamento age interferindo no ciclo celular das células através do dano ao ácido desoxirribonucleico (DNA). Porém, o tratamento com este fármaco ainda gera muita toxicidade, efeitos colaterais e resistência medicamentosa (American Cancer Society, 2023). Tais efeitos incluem nefrotoxicidade, cardiotoxicidade, hepatotoxicidade e neurotoxicidade, sendo que esses danos causam baixa adesão ao tratamento e conseqüentemente menor possibilidade de cura, além de comprometer a qualidade de vida do paciente (Aldossary, 2019).

Nesse contexto, faz-se necessário a pesquisa para a descoberta de novos antineoplásicos potenciais. Dessa forma, estudos demonstram que as tiossemicarbazonas (TSCs) apresentam potencial antineoplásico, uma vez que aumentam a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), diminuem a viabilidade de células neoplásicas e induzem a apoptose (Medina-Reyes, 2020). A alternativa do uso dos derivados de TSCs pode ser justificada devido a essa classe apresentar em sua estrutura um grupo funcional denominado bases de Schiff, sendo que uma de suas propriedades é a de formar complexos organometálicos, onde demonstram atividades antitumorais já relatadas, além de possuir a capacidade de

inibir enzimas importantes para a síntese do DNA e divisão celular, como a ribonucleotídeo redutase (Perondi, 2018).

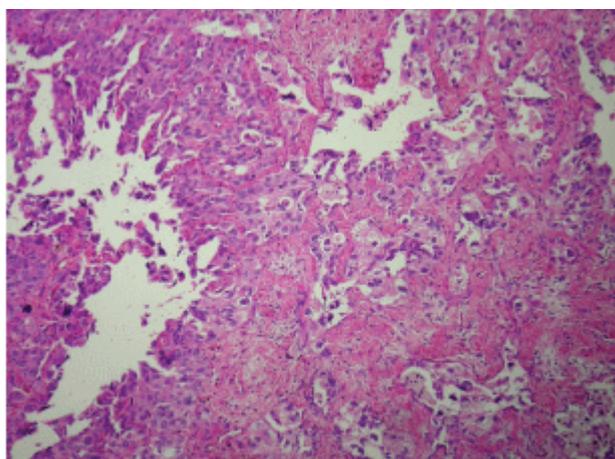
Diante disso, considerando o potencial terapêutico dos derivados de TSCs descrito na literatura, o presente trabalho busca verificar o mecanismo de ação do composto PR-11 frente à linhagem de câncer de pulmão de não pequenas células A549. Dessa forma, este estudo visa contribuir para a comunidade acadêmica e científica quanto às descobertas sobre os novos compostos que possam ser utilizados para a terapia do CP, como os derivados de TSCs, de maneira a diminuir os malefícios causados pelos tratamentos atuais, assim como o estudo se mostra urgente diante das estimativas de incidência para próximos anos.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Câncer de pulmão

O CP é uma doença maligna neoplásica que acomete as vias aéreas ou o parênquima pulmonar. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o CP é dividido em dois subtipos histológicos: câncer de pulmão de pequenas células (CPPC) e câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC), sendo este último o tipo mais comum de CP, representando 80% dos casos e é subdividido em adenocarcinomas (40%), carcinomas de células escamosas (epidermóide) (25%) e carcinomas de grandes células (15%) (Garcia, 2023).

**Figura 1:** Adenocarcinoma pulmonar com padrão acinar, HE, 100x.



**Fonte:** Milanez, 2008.

Os cânceres são definidos de acordo com o tecido de origem, dessa forma, neoplasias derivadas do epitélio são designados como carcinomas, sendo o tipo mais comum em seres humanos. Assim como os linfomas são oriundos do sistema linfático, os sarcomas do tecido mesenquimal, o mieloma da medula óssea, o melanoma dos melanócitos e assim por diante (Vieira, 2017).

Atualmente, o sistema TNM é o responsável por classificar o estadiamento do tumor segundo a extensão anatômica da doença, onde T- representa a extensão/características do tumor primário; N- avalia a existência ou falta de metástase bem como sua extensão em linfonodos regionais; e M - analisa a falta ou existência de metástase a distância. Dividindo-se em categorias de T0 a T4; de N0 a N3; e de M0 a M1 (Conitec, 2022).

O CPCNP inicia no revestimento epitelial do pulmão e considera-se um câncer de difícil tratamento devido ao seu potencial de metástase, aumento na taxa de recidiva e diagnóstico tardio, com sobrevida estimada em 5 anos em comparação a outras doenças malignas (Mittelmann, 2019). Dentre os acometidos com o CPCNP, aproximadamente 70% recebem um diagnóstico tardio e em estágios avançados da doença, comumente nos níveis III e IV, o que impacta fortemente no processo de tratamento do paciente, onde irá afetar diretamente a sobrevida do indivíduo, além de aumentar os custos da terapia (Franceschini, 2020).

## **2.2 Fatores de risco**

A evolução do CP começa a partir de injúrias teciduais que podem ser geradas por fatores biológicos, químicos ou físicos, que levam ao processo inflamatório do tecido, trazendo danos ao DNA. Além do principal fator, que é o tabagismo, há outros fatores que podem contribuir para a incidência do CP, como o sedentarismo, a má alimentação e o envelhecimento populacional (Mittelmann, 2019; Vgiana, 2021).

O principal fator de risco do CP é o tabagismo, frente ao qual as organizações governamentais realizam campanhas e constantes propagandas a fim de desestimular o uso do cigarro. De acordo com o Ministério da Saúde, em 2013 a porcentagem de fumantes foi de 14,9% e em 2019 foi de 12,8%, indicando uma redução significativa no consumo do tabaco (Brasil, 2021).

Apesar do tabagismo ainda ser considerado o principal fator de risco para o desenvolvimento do CP, há outras causas relacionadas a essa doença, dentre elas estão a poluição ambiental, mudanças epigenéticas, exposição ocupacional, comumente relacionada a minerais com amianto, níquel, arsênico e cromo (Christopher, 2021). Dentre a exposição ocupacional, alguns profissionais têm mais possibilidades de adquirir o câncer de pulmão dependendo do local do trabalho, como é o exemplo de trabalhadores de fábricas de cerâmicas, indústria do carvão, construção civil, pedreiros, fábricas de vidro, pintores, indústria de borracha, motoristas de caminhão, mineração de urânio e dentre outros (Shankar A, 2019).

Os genes estão intrinsecamente relacionados com as vias de inflamação que possam vir a combater o câncer, ou seja, a mutação em algum deles pode resultar na desregulação dessas vias e conseqüentemente o aparecimento de células cancerígenas. A exemplo disso, destacam-se as mutações no receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), já relatado na literatura como um dos principais eventos ontogenéticos que desencadeiam o câncer de pulmão de não pequenas células (Harrison PT, 2020).

### **2.3 Tratamento**

O tratamento do CP dependerá, principalmente, do estágio da doença e do perfil histológico que o tumor irá apresentar. A partir deste ponto será eleito o melhor tipo de tratamento de acordo com as características analisadas. Sendo assim, a terapêutica poderá ser cirurgia, quimioterapia, radioterapia, imunoterapia e/ou modalidades combinadas. No entanto, muitos pacientes não respondem à terapia existente, apresentando resistência, como ocorre com os derivados de platina, por exemplo (Inca, 2020).

Para os pacientes que se encontram em estágios iniciais ou que possuem tumores que não podem receber a intervenção cirúrgica, fica adotado a radioterapia, sendo a radioterapia estereotáxica do corpo pulmonar, a técnica de referência para o tratamento (Rodrigues, 2022). A terapêutica varia de 1-5 sessões por uma ou duas semanas, a depender da avaliação médica, com uma dose por fração de 10-34 Gy (Viani, 2022).

Além disso, a intervenção cirúrgica é o padrão ouro de tratamento para pacientes que se encontram no estágio I do CP, porém, apenas aproximadamente 16% dos pacientes com CPCNP são diagnosticados nos estágios iniciais. Além

disso, cerca de 20% do tumores encontrados nas fases iniciais são inoperáveis, pois o paciente é comumente idoso e apresenta comorbidades que comprometem o sucesso cirúrgico (Alcantud, 2019; Wang, 2021)

A imunoterapia se tornou uma alternativa indispensável no tratamento do CPCNP avançado, incluindo inibidores de ponto de controle imunológicos (ICIs) combinados com medicamentos derivados da platina ou não. Dentre os medicamentos mais comuns estão o anti-PD1/PD-L1, aprovados para o tratamento em primeira e segunda linha para melanomas, câncer renal, câncer de cabeça e pescoço, câncer esofágico e câncer de pulmão. Porém, esse tipo de terapêutica ainda necessita de estudos que busquem biomarcadores mais eficazes, a fim de diminuir a toxicidade nos pacientes que não são compatíveis com essa alternativa (Sesma, 2020).

No Brasil, o tratamento para o CPCNP inclui as terapêuticas baseadas na quimioterapia, imunoterapia e antiangiogênicos. Por sua vez, caso o paciente apresente progressão da doença após tratamento com a primeira linha a base de platina, os fármacos de segunda linha são escolhidos para proceder com o tratamento do CPCNP, sobretudo para a tipologia de células não escamosas, a saber: docetaxel, pemetrexed, erlotinibe, nivolumabe, pembrolizumabe e associações de docetaxel nintedanibe ou ramucirumabe (Tabela 1). O monitoramento do tratamento do CPCNP também traz informações quanto aos medicamentos excluídos do programa por estarem em processo de estudo. A lista contempla cerca de 53 antineoplásicos, o que coopera para a escassez terapêutica atual, firmando a necessidade de novas descobertas (Conitec, 2022).

Além desses, outro informe traz alguns outros medicamentos que são comumente utilizados no CPCNP, muitas vezes a terapêutica se estabelece com dois medicamentos, sendo um deles um dos derivados da platina cisplatina ou carboplatina, e outro de alguma outra classe (Oncoguia, 2023).

**Tabela 1.** Representação dos medicamentos utilizados como segunda linha do tratamento do CPCNP, principalmente para a tipologia de células não escamosas.

Medicamento	Tipo	Classe	Mecanismo de ação	Toxicidade
-------------	------	--------	-------------------	------------

Docetaxel	Quimioterápico	Taxano	Liga à beta-tubulina, inibindo a montagem adequada dos microtúbulos no fuso mitótico, interrompendo o ciclo celular durante G2/M. Também reduz a expressão do gene BCL2 (anti apoptótico)	Pneumonite intersticial bilateral aguda, dispneia aos esforços, tosse seca, febre e mal-estar.
Paclitaxel				
Pemetrexed				
Erlotinibe	Imunoterápico	Inibidor da tirosina quinase	Inibe fortemente a fosforilação intracelular do EGFR	Erupção cutânea, diarreia, anorexia, náusea, vômito, fadiga, estomatite, constipação, paroníquia, prurido, pele seca alopecia, DPI, leucopenia, neutropenia, anemia, elevação do AST e do ALT
Nivolumabe				
Pembrolizumabe				
Ramucirumabe	Antiangiogênico		Antagonista direto do VEGFR2	Eventos tromboembólicos, arteriais, hipertensão,

				reações à infusão, perfuração gastrointestinal, neutropenia, diarreia e epistaxe
Nintedanibe		Inibidor da tirosina quinase	Inibidor triplo da angioquinase, que tem como alvo a tirosina quinase de múltiplos receptores	Hepatotoxicidade e efeito gastrointestinal
Cisplatina	Quimioterápico	Derivados da platina	Ligação de grupos alquil às bases do DNA, formação das ligações cruzadas do DNA, indução de emparelhamento incorreto dos nucleotídeos	Hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e neutropenia.
Carboplatina				
Gemcitabina		Análogo do nucleosídeo	Incorpora o trifosfato de gencitabina na cadeia de DNA, inibe a ribonucleotídeo redutase, uma enzima responsável por catalisar as reações que geram o trifosfato de desoxicitidina para a síntese de DNA.	Mielossupressão, parestesia e erupção cutânea grave.
Vinorelbina		Alcalóide da vinca	Inibição da mitose na metáfase através da sua interação com a tubulina, interfere na segregação cromossômica durante a mitose, pausando as células nas fases <i>G2/M</i>	Granulocitopenia, trombocitopenia, neuropatia, eritema, dor local, descoloração das veias, falta de ar, náuseas, constipação, mialgia, astenia, hepatotoxicidade.
Etoposido		Derivado da podofilotoxina	Inibe a DNA topoisomerase II, inibindo assim a	Alopecia, prisão de ventre, diarreia, náuseas

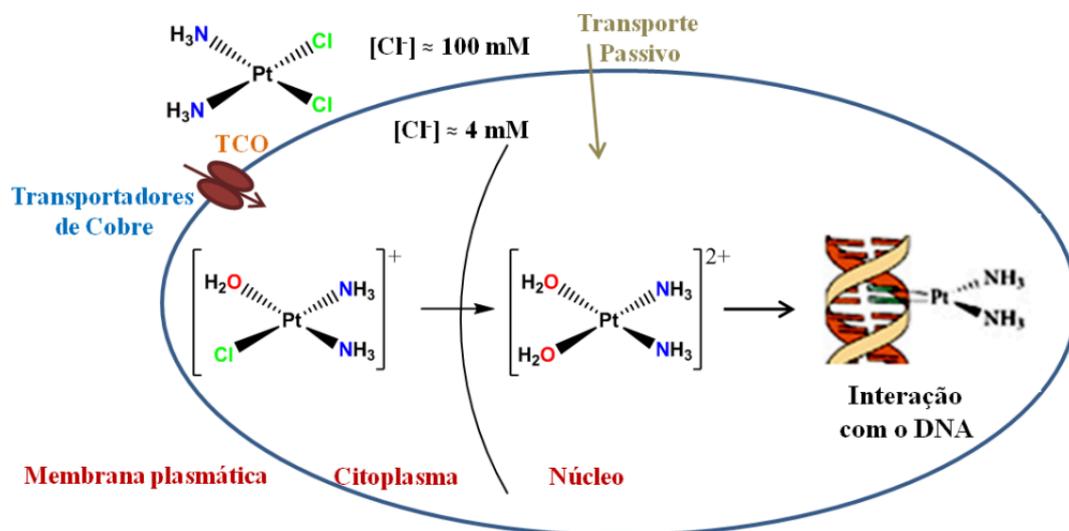
			relição do DNA, causando erros críticos na síntese de DNA na fase pré-mitótica da divisão celular e pode levar à apoptose da célula cancerosa	e vômitos e doenças malignas secundárias (leucemia)
--	--	--	---	---

Fonte: Drugbank (<https://go.drugbank.com/>) , 2023.

A cisplatina, denominada quimicamente como cis-diamina-dicloroplatina (II), é amplamente usada em tratamentos para câncer, incluindo o CP. O mecanismo de ação desse medicamento ocorre através de uma ligação covalente que se estabelece entre as moléculas de cisplatina e a célula cancerígena, e essa promove algumas alterações no DNA, como parada no ciclo celular e apoptose, que irão inibir o crescimento e proliferação das células neoplásicas (Ashrafizadeh, 2021).

Pertencente a classe dos alquilantes, a cisplatina tem o poder de adicionar grupos alquila a grupos funcionais eletronegativos. Desse modo, a cisplatina é capaz de parar o crescimento do tumor devido a formação de ligações cruzadas entre bases nitrogenadas, como a guanina, em fitas dupla hélice do DNA, atingindo o DNA de maneira mais direta e parando a replicação celular (Figura 2). Tais agentes alquilantes causam uma codificação incorreta do DNA, e, por serem inespecíficos, atingem qualquer ciclo celular ativo por mecanismos que resultam na interrupção do DNA e apoptose (PubChem, 2021).

**Figura 2.** Representação esquemática da entrada da cisplatina na célula e sua posterior ligação com o DNA no núcleo.



Fonte: Neves, 2011.

A cisplatina ainda participa das terapias adjuvantes e neoadjuvantes para o CPCNP, por possuir atividade antineoplásica e eficácia tolerável. Porém, observa-se um aumento em seus efeitos tóxicos à saúde do paciente, e sua resistência em combater os tumores, o que conseqüentemente altera o esquema terapêutico, levando ao aumento da dosagem do quimioterápico (Kryczka, 2021). Ademais, a resistência aos tratamentos convencionais aumentou em média 85% das mortes de indivíduos com esse tipo de câncer (Khalaji, 2022).

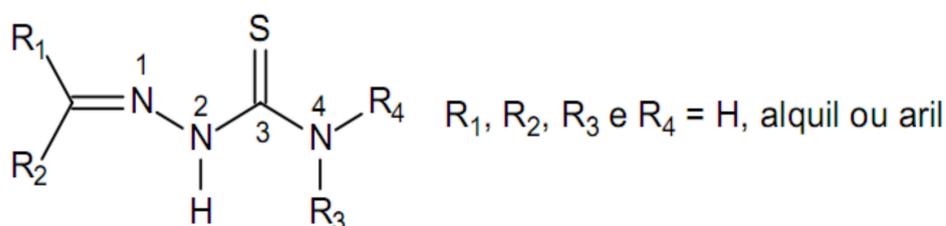
Apesar da eficácia comprovada da cisplatina contra o CP, seus efeitos tóxicos ainda são muito preocupantes para os pacientes que utilizam esse medicamento, assim como para a equipe multidisciplinar de cuidados oncológicos. Alguns dos principais efeitos adversos envolvem a nefrotoxicidade, neurotoxicidade, cardiotoxicidade e ototoxicidade. Além disso, os efeitos colaterais mais comuns, como náuseas e vômitos, também implicam na busca por novas moléculas terapêuticas (Tchounwou, 2021).

## 2.4 Tiossemicarbazonas

As TSCs são obtidas a partir da condensação da tiossemicarbazida com um aldeído ou cetona. São denominadas bases de Schiff em função da presença de ligações de carbono com nitrogênio, ligadas por dupla ligação. Os átomos de N e S

possuem elétrons livres, os quais ficam disponíveis para realizar interações moleculares, induzindo a formação de complexos metálicos que possuem atividade conhecida contra o câncer de pulmão, câncer de fígado, câncer de cólon, câncer de mama, neuroma e outros tumores. Além disso, o grupo tiouréia flexível possibilita a introdução de diferentes grupos funcionais na molécula, enriquecendo mais ainda a capacidade de coordenação da molécula e ampliando a possibilidade de síntese para diversas finalidades (Bai XG, 2022).

**Figura 3.** Fórmula geral dos derivados de TSCs.



**Fonte:** Silva, 2013.

As moléculas de TSCs têm baixo custo e alto rendimento, além de estudos demonstrarem que os derivados apresentam múltiplas atividades biológicas como, antiparasitária, antibacteriana, antitumoral, antiviral, anticonvulsivantes, antifúngico e propriedades antioxidantes. O modo como esse composto age ainda é controverso, no entanto, há informações de que seus derivados heterocíclicos, como a atropina que já está em fase de estudo clínico, têm ação direta em enzimas como a ribonucleotídeo redutase inibindo-a o que impacta a síntese de DNA (Özbek, 2023).

Há três mecanismos em que os agentes alquilantes podem estabelecer sua atividade, são eles: a interação de grupos funcionais alquila com bases nitrogenadas do DNA, comprometendo a integridade do mesmo e induzindo a fragmentação por enzimas de reparo, o que consequentemente impede a síntese de DNA e a transcrição de RNA; também pode causar danos no DNA através de ligações cruzadas entre átomos do DNA, impossibilitando a síntese e a transcrição; e a indução de mutações por emparelhamento defeituoso dos nucleotídeos (PubChem, 2021).

Ademais, as moléculas de TSCs servem como ligantes para diversos metais como zinco, níquel e cobre. Porém, é comumente relatado que o cobre tem atividades mais significativas devido a sua menor toxicidade e capacidade de interação facilitada com sistemas biológicos. O cobre é encontrado em enzimas, dentre elas as oxidases e oxigenases, como também funciona como um agente de sinalização em resposta a estímulos que levam a cuprolasia e cuproptose. Estudos também demonstram que a complexação com cobre gera EROs a partir da interferência com o ciclo redox, levando a morte celular, demonstradas em linhagens de CP A549 e NCI-H460 (Bajaj, 2023; Bai XG, 2022).

Além da produção de EROs, as TSCs impactam na supressão da ribonucleotídeo redutase, a qual é uma enzima dependente de ferro, sendo vantajoso para a função quelante da tiossemicarbazona; inibição da topoisomerase II, enzima importante na replicação do DNA; ruptura de estrutura, desencadeada também pela geração de EROs; e inibição de proteínas relacionadas à resistência a múltiplas drogas, no qual é regulado pela glicoproteína P (Khan T, 2022).

## **2.5 Processos alterados no câncer: ciclo e morte celular**

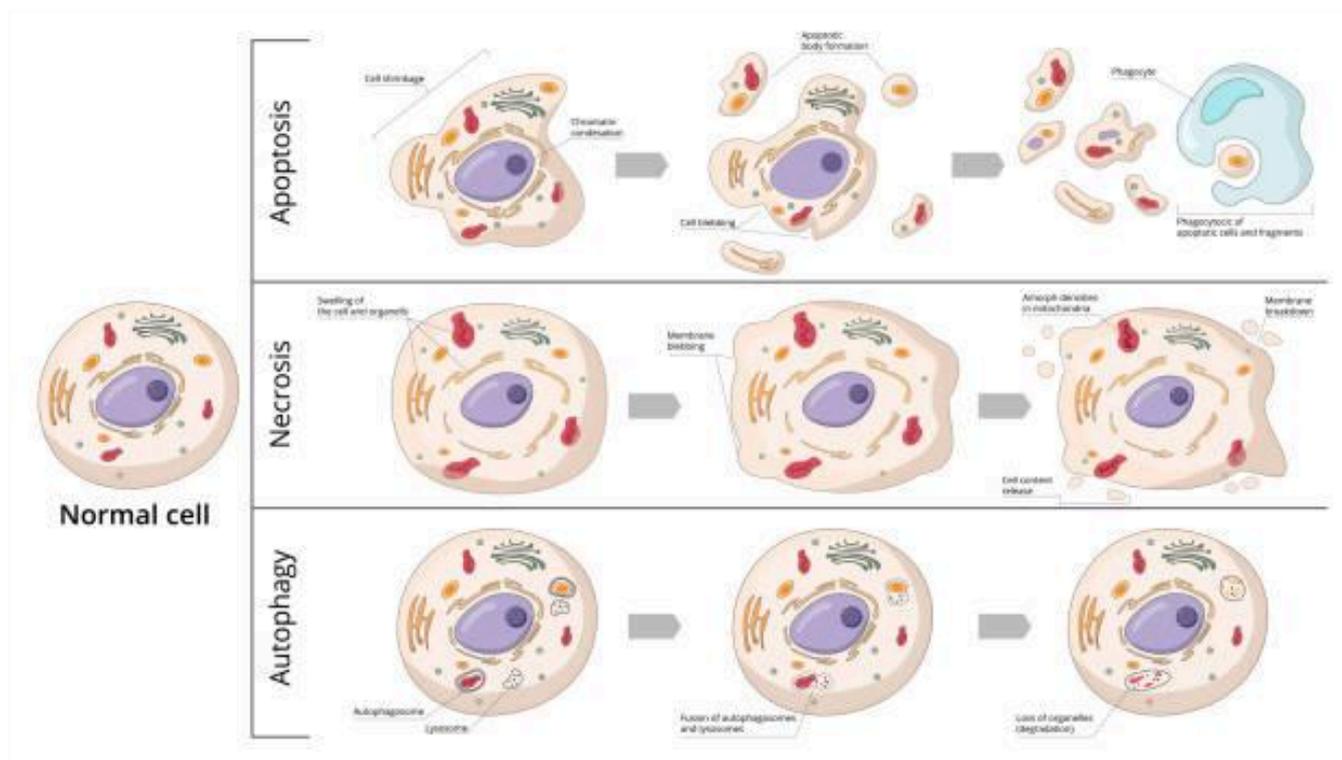
O ciclo celular é um processo que ocorre de maneira constante no corpo humano, resultando na duplicação e transmissão do código genético de geração em geração de células. O ciclo celular é altamente regulado e dividido em algumas fases, onde, basicamente, na fase G1 a célula se encontra em preparação e crescimento para a próxima fase, na fase S ocorre a duplicação do DNA, na fase G2 ocorre o segundo intervalo, onde a célula cresce ainda mais e produz elementos para o próximo evento, e na fase M ocorre a divisão celular propriamente dita. Além disso, o ciclo celular conta com mecanismos de regulação a fim de promover a duplicação de maneira controlada, porém, quando os pontos de checagem passam por mutações, essa produção de células se torna irregular e pode levar a origem de células indesejadas, possibilitando a formação de um tumor (Matthews, 2022).

As CDKs são uma família de proteínas quinase que estão intrinsecamente ligadas à regulação do ciclo celular e conseqüentemente à proliferação celular. Logo, em organismos saudáveis, o funcionamento dessas proteínas impede a geração de células anormais. Um dos mecanismos conhecidos do câncer é a desregulação dessas macromoléculas, fazendo com que ocorra um crescimento desordenado das

células, procedendo para a formação de um tumor. Dito isto, a inibição das quinases como terapia contra o câncer é uma das formas relatadas para se alcançar a cura (Yuan K, 2021).

Além disso, a morte celular é um mecanismo de extrema importância para o corpo humano, pois mantém o equilíbrio, eliminando células indesejáveis para o organismo. Os mecanismos de morte são, basicamente, a apoptose, a autofagia e a necrose. A apoptose refere-se a uma série de eventos regulados designada pelo encolhimento celular, formação de bolhas na membrana, perda de organelas, condensação e fragmentação do DNA. Já a necrose é um evento não programado e regulado por fatores externos, como lesões físicas, infecções e toxinas, que podem desencadear processos inflamatórios e alterações morfológicas (Yan, 2020).

**Figura 4:** Representação esquemática da apoptose, necrose e autofagia.



**Legenda:** Normal cell: célula normal; Apoptosis: apoptose; Necrosis: necrose; Autophagy: autofagia.

**Fonte:** IStock (<https://www.istockphoto.com>), 2023.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar *in vitro* o efeito antineoplásico do derivado de tiossemicarbazona PR-11 em células neoplásicas de pulmão.

#### **3.2 Objetivos específicos**

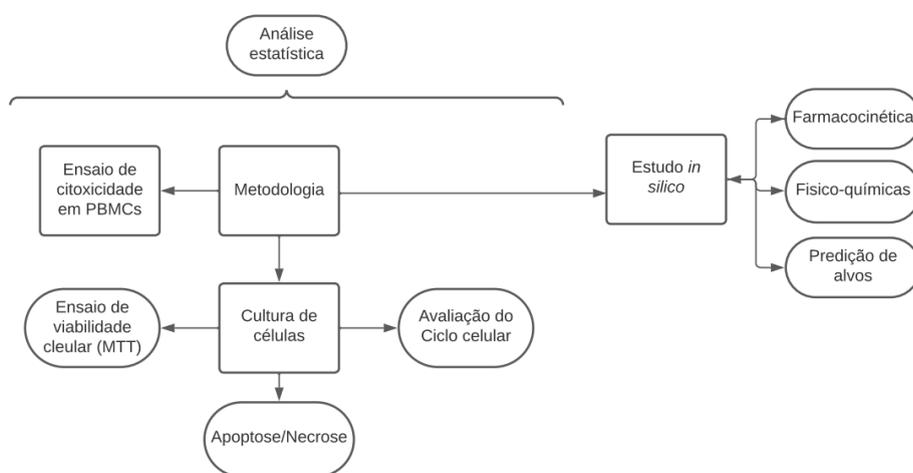
- Analisar *in silico* as propriedades farmacocinéticas e os possíveis alvos do derivado de TSCs;
- Avaliar os efeitos citotóxicos da molécula derivada de TSCs em linhagens celulares de pulmão, H1299 e A549, e em células mononucleares do sangue periférico (PBMC);
- Verificar a capacidade da molécula derivada de TSCs induzir apoptose e necrose nas linhagens de pulmão H1299 e A549, assim como alterar o ciclo celular.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Desenho

O estudo foi realizado em cerca de 1 ano, onde iniciou com o estudo *in silico*, seguido pelo ensaio de citotoxicidade em PBMCs e cultura celular para avaliar a viabilidade pelo ensaio do MTT, além da capacidade de interferir no ciclo celular e induzir apoptose e necrose.

**Figura 5:** Fluxograma representativo da metodologia utilizada para o estudo.



Fonte: Autora, 2023.

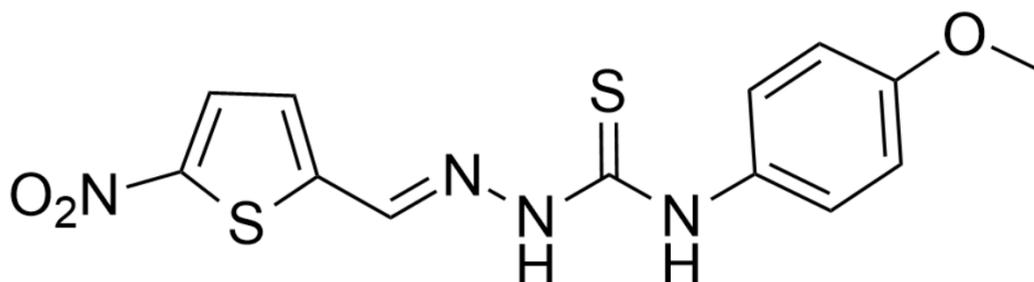
### 4.2 Local do estudo

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT) do Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica - Suely Galdino (NUPIT-SG) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

### 4.3 Derivado de TSCs

O estudo investigou o composto PR-11, um derivado de TSCs, de fórmula molecular, C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S, o qual foi cedido cordialmente pela Professora Dra. Maria do Carmo Alves de Lima que pertence ao Laboratório de Química e Inovação Terapêutica (LQIT)/UFPE.

**Figura 6:** Fórmula estrutural do composto N-(4-metoxifenil)-2-((5-nitrotiofen-2il)metileno)hidrazinacarbotoamida ou PR-11.



**Fonte:** Autora, 2023.

#### 4.4 Comitê de ética

O projeto foi previamente aprovado pelo comitê de ética em pesquisa em seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE), sob o registro 38505920.3.3001.5192, em nome da Prof. Dra. Michelly Cristiny Pereira do Departamento de Farmacologia, parecer (5.312.069). Houve consentimento dos participantes, comprovado pelo termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

#### 4.4 Análise *in silico*

O programa Swiss Target Prediction e o Super Pred foram utilizados para a predição dos principais alvos terapêuticos do derivado de TSCs PR-11 (SWISS TARGET PREDICTION, 2022; Super Pred, 2022). Além disso, foram analisadas suas propriedades farmacocinéticas (ADME - absorção, distribuição, metabolização e excreção) e físico-químicas utilizando o software SwissADME (SWISS ADME, 2022). Juntamente, foi avaliado se os compostos seguem a regra dos cinco de Lipinski, que estabelece parâmetros sobre as características e desenvolvimento de fármacos. Desse modo, a regra determina que os compostos devem obedecer cinco critérios para serem considerados com boa biodisponibilidade oral, esses são: a) peso molecular  $\leq 500$  Da; b)  $\text{LogP} \leq 5$  (ou  $\text{MLogP} \leq 4,15$ ); c) número de aceitadores

de ligações de hidrogênio  $\leq 10$ ; d) número de doadores de ligação de hidrogênio  $\leq 5$  (Lipinski et al., 1997).

#### **4.5 Cultura de células**

As linhagens celulares A549 e H1299, ambas de adenocarcinoma de não pequenas células, foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ). O cultivo da A549 foi realizado em meio F12K, contendo 2 mM de L-glutamina, 10 mM de HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), 1 mM de piruvato de sódio, 1.500 mg/L de bicarbonato de sódio, 1% de penicilina/estreptomicina 200 U/ml e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Já a célula NCI-H1299, foi suplementada em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute), que contém 2mM de L-glutamina, 10mM de HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), 1 mM de piruvato de sódio, 1.500 mg/L de bicarbonato de sódio, 1% de penicilina/estreptomicina 200 U/mL além da adição de 10% de soro fetal bovino (SFB). Ambas as linhagens foram mantidas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> e temperatura 37°C.

#### **4.6 Ensaio de citotoxicidade em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)**

##### *4.6.1 Coleta de sangue*

A coleta de sangue foi realizada no NUPIT-SG com autorização prévia dos voluntários. Para isso, membros da equipe explicaram o objetivo do estudo e a importância da sua participação. Após a assinatura do TCLE foram coletados 27 mL de sangue em tubos de heparina de cada um dos voluntários (n=3).

##### *4.6.2 Isolamento das PBMCs*

As PBMCs foram obtidas através da técnica de centrifugação por gradiente de densidade, utilizando o reagente Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) a 450 g por 45 min, aceleração 4 e freio 0. Após a formação do anel de PBMCs, este foi colhido

e lavado duas vezes seguidas com tampão fosfato-salino (PBS) 1x nas seguintes condições: 350g por 20 min, aceleração 6, freio 4 na primeira lavagem; 350 g por 15 min, aceleração 6, freio 4 na segunda lavagem. Terminadas as lavagens, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi ressuscitado em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Gibco), HEPES 10 mM (Gibco) e Penicilina e Estreptomicina 200 U/mL (Gibco) para realização da contagem das células em câmara de Neubauer.

#### *4.6.3 Ensaio de citotoxicidade em PBMCs*

Após a contagem de células, a densidade celular de  $5 \times 10^5$  por poço foi distribuída em placas de 96 poços, com posterior tratamento com o composto PR-11 nas concentrações de 1, 10, 50 e  $100 \mu\text{M}$  por um período de 48h em estufa úmida a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Após isso,  $20 \mu\text{l}$  da solução de MTT foi adicionado e as placas foram incubadas em estufa de  $\text{CO}_2$  por 3h. Posteriormente, foi adicionado  $130 \mu\text{L}$  de SDS a 20% para dissolver os cristais formados. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm e os resultados foram analisados no GraphPad Prism® (v9.3.0). Cada concentração foi comparada com os resultados do DMSO a 0,1% e 0,2%, uma vez que os compostos foram diluídos neste solvente.

#### **4.7 Ensaio de citotoxicidade in vitro em células neoplásicas**

Para avaliação da citotoxicidade do composto, foi utilizado o método colorimétrico de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio (MTT) em cristais de formazan. Portanto, a partir da contagem das células, estabeleceu-se a densidade celular de  $5 \times 10^3$ /poço para a linhagem celular A549 e H1299, onde foi distribuída a alíquota de  $100 \mu\text{L}$  por poço em placa de 96 poços. As placas foram mantidas em estufa úmida a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Após 24h do plaqueamento, foi adicionado  $50 \mu\text{L}$  do composto em cada poço das placas nas concentrações de 1, 10, 50 e  $100 \mu\text{M}$  e as placas foram incubadas por um período de 72h em estufa úmida a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Após isso,  $20 \mu\text{l}$  da solução de MTT foi adicionado às placas, as quais foram incubadas novamente em estufa por 3h.

Posteriormente, foi adicionado 130  $\mu$ L de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 20% para dissolver os cristais formados e possibilitar a leitura da absorbância no espectrofotômetro após 24h, que foi realizada no comprimento de onda de 570 nm. Após a realização de três experimentos independentes de redução do MTT, foi calculada a concentração inibitória (IC<sub>50</sub>) do composto, utilizando o programa GraphPad Prism (versão 9.3.0). Cada concentração foi comparada com os resultados do DMSO a 0,1% e 0,2%, uma vez que os compostos foram diluídos neste solvente.

#### **4.8 Análise do ciclo celular**

As células neoplásicas foram dispostas em placas de 12 poços com densidade celular de  $8 \times 10^4$  por poço e mantidas em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e temperatura 37°C por 24h. Procedendo com o tratamento com o valor da IC<sub>50</sub> do composto PR-11 e da cisplatina para a linhagem A549, utilizada como controle positivo. Posteriormente, foram novamente incubadas durante 24 e 48h em estufa nas mesmas condições já citadas. Precedendo esse tempo, as células foram tripsinizadas (tripsina-EDTA a 0,25%), lavadas 2 vezes com PBS 1x (phosphate buffered saline) e fixadas em etanol 70% por 24h a -20°C. Para avaliação do ciclo celular, as células foram lavadas 2 vezes com PBS 1x e marcadas com iodeto de propídeo (PI) (Invitrogen) por 20 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz. O passo seguinte sucedeu para a adquirir as células e o conteúdo de DNA celular foi quantificado no citômetro de fluxo Attune™ (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) e a interpretação dos dados foi realizada pelo software FlowJo™ (v10.8.1). Cada concentração foi comparada com os resultados do DMSO a 0,1%, uma vez que os compostos foram diluídos neste solvente.

#### **4.9 Ensaio de indução de apoptose e necrose**

A linhagem celular A549 foi plaqueada na densidade de  $8 \times 10^4$  células por poço em placas de 12 poços e incubadas em estufa a 37°C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante o período de 24h. Procedeu-se então ao tratamento da placa com os

valores da IC<sub>50</sub> do PR-11 e da cisplatina, utilizada como controle positivo, onde foram incubadas novamente nas mesmas condições citadas anteriormente por 24 e 48h. Em seguida, foram lavadas com PBS 1x, tripsinizadas (tripsina-EDTA a 0,25%) e ressuspensas em Binding Buffer 1x. Após esta etapa foi adicionada a solução de Anexina V-APC/ PI e as placas foram incubadas por 15 minutos na ausência de luz. Posterior ao tempo determinado, as células foram adquiridas no citômetro de fluxo Attune™ (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) e os dados foram analisados pelo software FlowJo™ (v10.8.1). Cada concentração foi comparada com os resultados do DMSO a 0,1%, uma vez que os compostos foram diluídos neste solvente.

#### **4.10 Análise estatística**

Os procedimentos de avaliação da citotoxicidade em PBMCs e MTT foram realizados em triplicata e em três experimentos independentes. Já o experimento de morte celular foi realizado em duplicata em dois experimentos independentes e o ensaio de ciclo celular foi realizado em duplicata em apenas um experimento. Todos os dados foram analisados no software GraphPad Prism® (versão 9.3.0), sendo que o teste paramétrico t (Student) foi utilizado para os resultados que obedecerem a distribuição normal e o teste qui-quadrado para os resultados não paramétricos. O nível de significância adotado foi  $p < 0,05$ .

### **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **5.1 Análise *in silico***

##### *5.1.1 Farmacocinética*

As análises *in silico* objetivaram avaliar propriedades da molécula de modo a realizar suas predições farmacocinéticas de Absorção, Distribuição, Metabolização e Excreção (ADME) e os cálculos de suas propriedades físico-químicas, *druglikeness*, utilizando o programa SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php>), para o composto derivado de TSCs em estudo, PR-11, (SMILES COC1=CC=C(NC(=S)N\N=C\C2=CC=C(S2)[N+][[O-])=O)C=C1). Dessa maneira, foram obtidos parâmetros preditos de absorção intestinal, permeação à barreira

hematoencefálica, substrato da glicoproteína P, inibição das CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4 (Tabela 2), além dos parâmetros propostos por Lipinski et al. (1997) e as propriedades físico-químicas (Tabela 3). Como mencionado anteriormente, o estudo *in silico* é capaz de prever diversas propriedades inerentes a molécula selecionada, possibilitando que a seleção do composto para proceder com estudos *in vitro* tenha um potencial mais garantido, diminuindo, dessa forma, o tempo de desenvolvimento do estudo e o custo com outros ensaios relacionados à pesquisa (Costa, 2022).

Foi observado na análise *in silico* realizada que o derivado de TSCs demonstrou uma baixa absorção gastrointestinal, porém, essa característica não é de relevância para a clínica, já que a maior parte dos tratamentos quimioterápicos ocorrem pela via intravenosa e sob acompanhamento médico. Além disso, os compostos citados anteriormente não têm interação com a glicoproteína P, a qual é uma importante bomba de efluxo, logo, essas moléculas possuem resultados satisfatórios em relação à disponibilidade. Vale destacar que o derivado não apresentou permeabilidade à barreira hematoencefálica, o que pode causar efeitos colaterais em decorrência da interação com o sistema nervoso central, sendo mais um aspecto positivo no estudo do derivado.

A família da CYP450, importante enzima de metabolização, possui algumas isoenzimas essenciais para os sistema ADME, dentre essas estão os citocromos: CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4. Na Tabela 1 é possível ver que o PR-11 inibe as CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP3A4 e não inibe a CYP2D6. As enzimas, comumente localizadas no fígado, são responsáveis por metabolizar cerca de 80% dos medicamentos utilizados na clínica. Sabendo que CYPs já foram detectadas em células cancerígenas, tumores e linhagens neoplásicas, entende-se que os citocromos são um dos alvos dos medicamento anticâncer, onde medicamentos como paclitaxel e docetaxel são metabolizados pela CYP3A4 e CYP2C8, respectivamente. O composto PR-11 foi capaz de inibir 4 das 5 CYPs avaliadas (Tabela 2), demonstrando que a molécula pode influenciar no metabolismo do possível medicamento, aumentando sua biodisponibilidade de modo a ultrapassar as faixas terapêutica, podendo se tornar tóxico por acúmulo e diminuição da excreção (Zhao, 2021). Desse modo, pode-se sugerir que a molécula que inibe as enzimas citadas possuem uma maior capacidade de provocar eventos adversos, já que ficaria por mais tempo no organismo, impedindo o clearance de modo mais

efetivo e resultando em concentrações fora da janela terapêutica e dentro dos valores de toxicidade.

**Tabela 2.** Predição das propriedades farmacocinéticas do composto PR-11.

Cod	Abs. GI	Perm. BHE	Subs. Pgp	CYP1A2	CYP2C19	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4
PR-11	B	N	N	S	S	S	N	S

**Legenda:** B: baixa; N: não; S: sim para inibição; Abs. GI: absorção gastrointestinal; Perm. BHE: permeabilidade na barreira hematoencefálica; Cod: código da molécula.

**Fonte:** Autora, 2023.

O princípio estabelecido pela regra de Lipinski (1997), permite avaliar de forma rápida e eficaz os parâmetros para biodisponibilidade de um fármaco, baseado em 5 regras, instruindo que, basicamente, o peso molecular não pode ultrapassar 500 g mol<sup>-1</sup>, o LogP deve ser menor que 5, o número de aceptores de hidrogênio deve ser inferior a 10 (soma de N e O) e o número de grupos doadores de hidrogênio deve ser inferior a 5 (soma dos grupos OH e NH). Dessa forma, observa-se nos resultados obtidos que a molécula do PR-11 cumpriu com os parâmetros de *druglikeness* postulados por Lipinski e colaboradores (Daina, 2017), demonstrando o potencial positivo do composto como futuro quimioterápico.

**Tabela 3.** Previsão teórica da biodisponibilidade oral dos derivados de 2-(5-nitro-tiofeno)-tiossemicarbazona, segundo a “Regra dos 5” de Lipinski.

Código	PM (g/mol)	Log P	HBD	HBA
PR-11	336.39	0.70	2	4

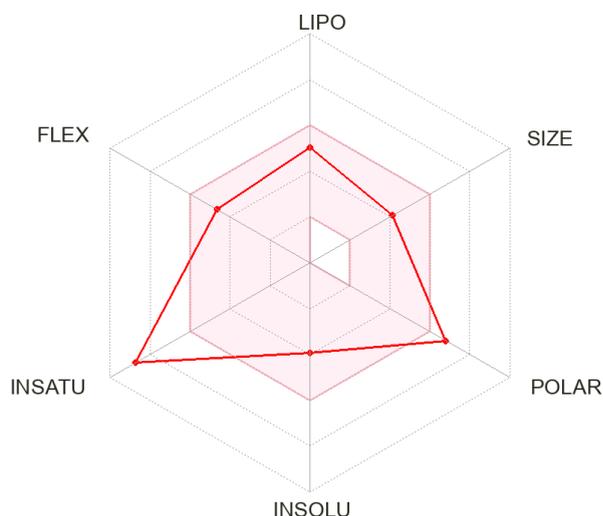
**Legenda:** PM - Peso molecular; HBD - Número de doadores de ligação de hidrogênio; HBA - Número de aceptores de ligação de hidrogênio.

**Fonte:** Autora, 2023.

O gráfico radar (Figura 7) é capaz de elucidar a importância do equilíbrio dos parâmetros de tamanho molecular, lipossolubilidade, flexibilidade, insaturação, polaridade e solubilidade, como parte fundamental para a boa biodisponibilidade da molécula. Percebe-se que o PR-11 foi capaz de obedecer de forma aproximada cinco dos seis critérios estabelecidos. Em relação ao tamanho, é sabido que quanto maior a dimensão da molécula, mais difícil é para que ocorra a passagem através da

membrana para o meio intracelular, do mesmo modo que a lipossolubilidade e insolubilidade estão relacionadas com a capacidade esperada do transporte da molécula pelas barreiras biológicas, logo, estão relacionadas com a distribuição e absorção do fármaco no organismo (Souza, 2022). Relacionado à polaridade, observa-se que o composto não atendeu a este parâmetro, sendo que essa característica pode estar associada com a baixa biodisponibilidade do derivado pela via oral, reforçando a hipótese de administração por outras alternativas, como a endovenosa (SwissADME, 2023).

**Figura 7:** Gráfico radar representando a biodisponibilidade da molécula do PR-11.



**Legenda:** A área em rosa representa as características ideais para um bom fármaco, já o traçado em vermelho representa o resultado demonstrado pelo software SwissADME para o composto PR-11.

**Fonte:** SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php>)

### 5.1.2 Predição de alvos

Assim como a predição das características estruturais, a análise *in silico* também é capaz de avaliar e predizer as moléculas quanto a alvos, podendo ser genes e proteínas envolvidas na sua resposta farmacológica. A busca por alvos concedida pelo software SwissTargetPrediction resultou em cerca de 100 resultados, e o software Super-Pred resultou em um total de 104 resultados, onde foram filtrados para a busca direcionada para CP, apurando por fim 16 resultados.

Desse modo, analisando os alvos mais predominantes em cada software, foram selecionados os alvos demonstrados na Tabela 3. Basicamente, a predição esclareceu que, os alvos mais relacionados são as quinases dependentes de ciclinas (CDKs), as quais participam da regulação do ciclo celular. De modo a filtrar mais ainda a busca, foi correlacionado o levantamento feito pelos softwares com os achados na literatura, sendo que a classe das quinases CDK4 foi selecionada para melhor elucidação do comportamento do alvo.

**Tabela 4.** Previsão dos potenciais alvos terapêuticos do derivado PR-11

<b>Classe dos alvos</b>	<b>Alvos</b>
CDKs	CDK1; CDK2/Ciclina E1; CDK1/Ciclina B1; CDK2/Ciclina A; CDK1/Ciclina B; CDK2; CDK4.

**Fonte:** SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction>); Super-Pred (<https://prediction.charite.de/index.php>), 2023.

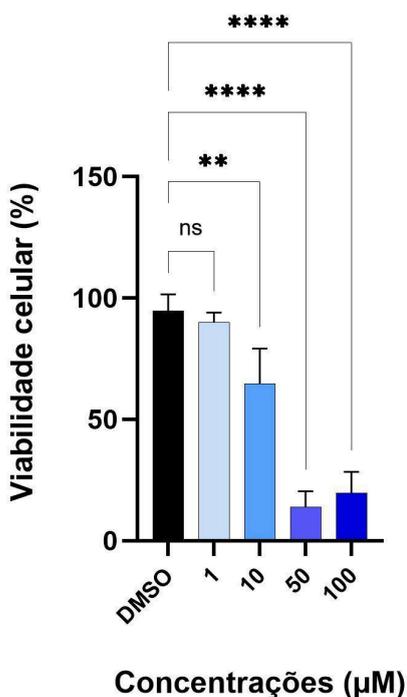
Cada tipo de CDK regula uma fase específica do ciclo celular, dessa forma, a CDK4 regula a transição da fase G1 para a fase S em células saudáveis. A inibição da proteína pode levar a diminuição da fosforilação, induzindo a apoptose. No entanto, na maioria dos cânceres é visto que há uma desregulação desta proteína, se tornando um alvo promissor na descoberta de novos antineoplásicos. Alguns inibidores da CDK4 já foram estudados em ensaios clínicos em humanos, porém os resultados ainda carecem de estudos complementares básicos (Zhang J, 2021).

## **5.2 Ensaio de citotoxicidade em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)**

O ensaio em PBMCs buscou avaliar nos linfócitos e monócitos o potencial de citotoxicidade do PR-11 a partir do ensaio de redução do MTT em cristais de formazan, de modo que possibilitou o cálculo da viabilidade celular e, com isso, demonstrou o potencial tóxico do composto para essas células normais do organismo humano. Na Figura 8 é possível notar que a partir da dose de 10  $\mu\text{M}$  há um decaimento da viabilidade celular, onde foi calculada a  $\text{IC}_{50}$  de 15,65  $\mu\text{M}$ , logo, faz-se necessário que o tratamento com o composto em questão ocorra em concentrações abaixo desta. Na concentração de 1  $\mu\text{M}$ , o composto manteve o

percentual de células viáveis semelhante ao do controle, que é o solvente dimetilsulfóxido (DMSO), o que sugere que os ensaios devem proceder nas concentrações entre os valores de 1  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ .

**Figura 8:** Viabilidade celular do PR-11 em PBMCs.



**Fonte:** Autora, 2023.

Um estudo que testou um derivado de TSCs ligado ao cobre, relatou que nas PBMCs a toxicidade foi aceitável, servindo então como parâmetro para a realização dos experimentos com a linhagem U937 (monócitos humanos obtidos de derrame pleural), para a qual o derivado apresentou efeito citotóxico (Singh, 2020). Outro estudo relatou que um composto derivado de tiossemicarbazona testado em células tumorais de câncer de mama (MDA-MB-231) não foi tóxico para PBMCs, o que permitiu avaliar a especificidade antineoplásica desta molécula (El majzoub, 2019).

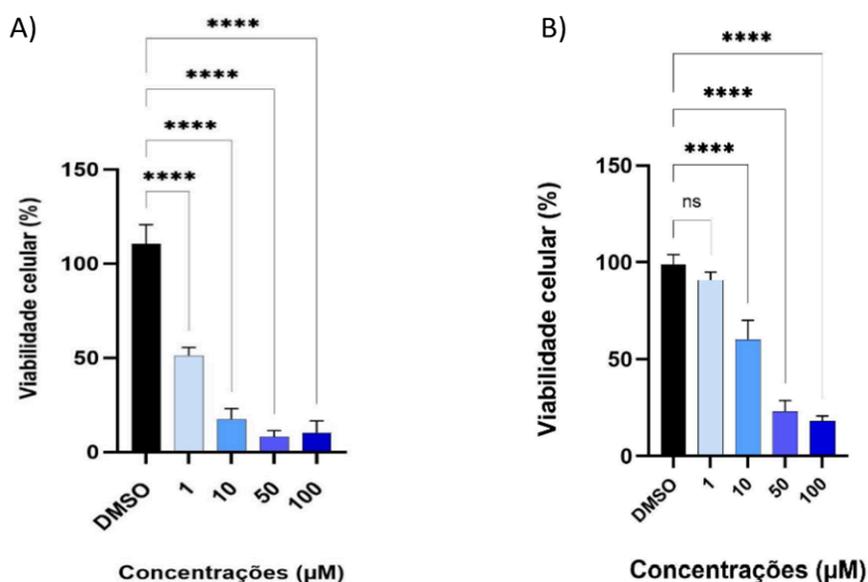
Os resultados apurados neste ensaio foram utilizados para realizar o cálculo da  $\text{IC}_{50}$  do PR-11 em PBMCs (15,65  $\mu\text{M}$ ), conforme demonstrado na Tabela 5. Além disso, o valor desta  $\text{IC}_{50}$  serviu para calcular o índice de seletividade (IS) do composto nas linhagens H1299 e A549 em estudo.

### 5.3 Ensaio de citotoxicidade *in vitro* em células tumorais

O ensaio colorimétrico de redução do MTT em cristais de formazan foi utilizado para avaliação da citotoxicidade, onde, de acordo com a intensidade da cor, o potencial de morte celular causado pelos compostos testados pôde ser calculado. Logo, pode-se observar na Figura 9 a viabilidade celular das linhagens de carcinoma pulmonar de células não pequenas A549 (Fig. 9A) e H1299 (Fig. 9B), respectivamente, após tratamento com o derivado de TSCs PR-11 testado nas concentrações de 1, 10, 50 e 100  $\mu\text{M}$ .

Como destacado na Figura 9A, o derivado PR-11 foi capaz de reduzir drasticamente a viabilidade celular na linhagem A549, especialmente na concentração de 50  $\mu\text{M}$ , onde a viabilidade foi reduzida para cerca de 10%. A Figura 9B por sua vez demonstra que a linhagem celular H1299 foi um pouco mais resistente à ação do composto, mas de toda forma, foi possível observar o decaimento das células viáveis à medida que a concentração foi aumentando. Vale ressaltar que a redução da viabilidade celular da linhagem A549 foi significativa ( $p < 0,001$ ) para todas as concentrações do composto que foram testadas. Enquanto para a linhagem H1299, a diminuição foi significativa a partir da concentração de 10  $\mu\text{M}$ .

**Figura 9.** Viabilidade celular das linhagens neoplásicas de pulmão A549 (A) e H1299 (B) após tratamento com o composto PR-11 nas concentrações de 1, 10, 50 e 100  $\mu\text{M}$ .



**Legenda:** \*\*\*\* (valor de  $p < 0,001$ )

Fonte: Autora, 2023.

Além de avaliar a viabilidade celular, o ensaio de citotoxicidade por redução do sal MTT permite calcular a  $IC_{50}$ , ou seja, o valor da concentração de um inibidor necessária para reduzir pela metade a população celular. Logo, quanto menor o valor de  $IC_{50}$  em células tumorais, mais eficiente será o composto. Da mesma forma, é possível estimar o IS, que é o quociente resultante da razão da  $IC_{50}$  de células normais e a  $IC_{50}$  de células tumorais, predizendo dessa forma, se o composto será mais tóxico para células tumorais ou para células normais (Berrouet C, 2020).

Desse modo, para a linhagem tumoral A549, o derivado apresentou  $IC_{50}$  significativo (1  $\mu$ M), além de resultar em um IS dentro dos limites de aceitação (IS: 14,9), provando o grande potencial da molécula já relatado na literatura, onde um derivado de TSCs, conjugado ao cobre, apresentou efeitos antiproliferativos seletivos com a linhagem A549 (Andres, 2020). Porém, na linhagem H1299, embora o composto tenha apresentado  $IC_{50}$  relativamente favorável (15,48  $\mu$ M), quando calculado o IS, foi observado que o resultado na H1299 não foi satisfatório (IS: 2,24).

**Tabela 5.** Valores de  $IC_{50}$  ( $\mu$ M) e índice de seletividade (IS) de novos derivados de TSCs em PBMC e nas linhagens celulares A549 e H1299 (câncer de pulmão de células não pequenas).

Compostos	Linhagem celular		
	A549	H1299	PBMC
PR-11	1 $\pm$ 0,31	15,48 $\pm$ 5,22	15,65 $\pm$ 4,34
IS	14,9	1,0	-

**Legenda:** IS=  $IC_{50}$  células normais/  $IC_{50}$  células tumorais; desvio padrão ( $\pm$ );  $IC_{50}$ : concentração inibitória mínima de 50% da população de células expressa em  $\mu$ M.

Fonte: Autora, 2023.

A linhagem celular H1299 possui uma mutação onde há uma deleção parcial homozigota da proteína P53, impedindo sua expressão. A P53 exerce função sobre a morte celular, regulando vias relacionadas, no entanto, no estudo a resistência da linhagem ao composto de TSCs pode, ou não, ser associada a essa característica (Assim, 2023). Portanto, sabendo que a linhagem celular H1299 não atendeu aos critérios estabelecidos na literatura, os ensaios com o composto PR-11 procederam apenas para a linhagem A549.

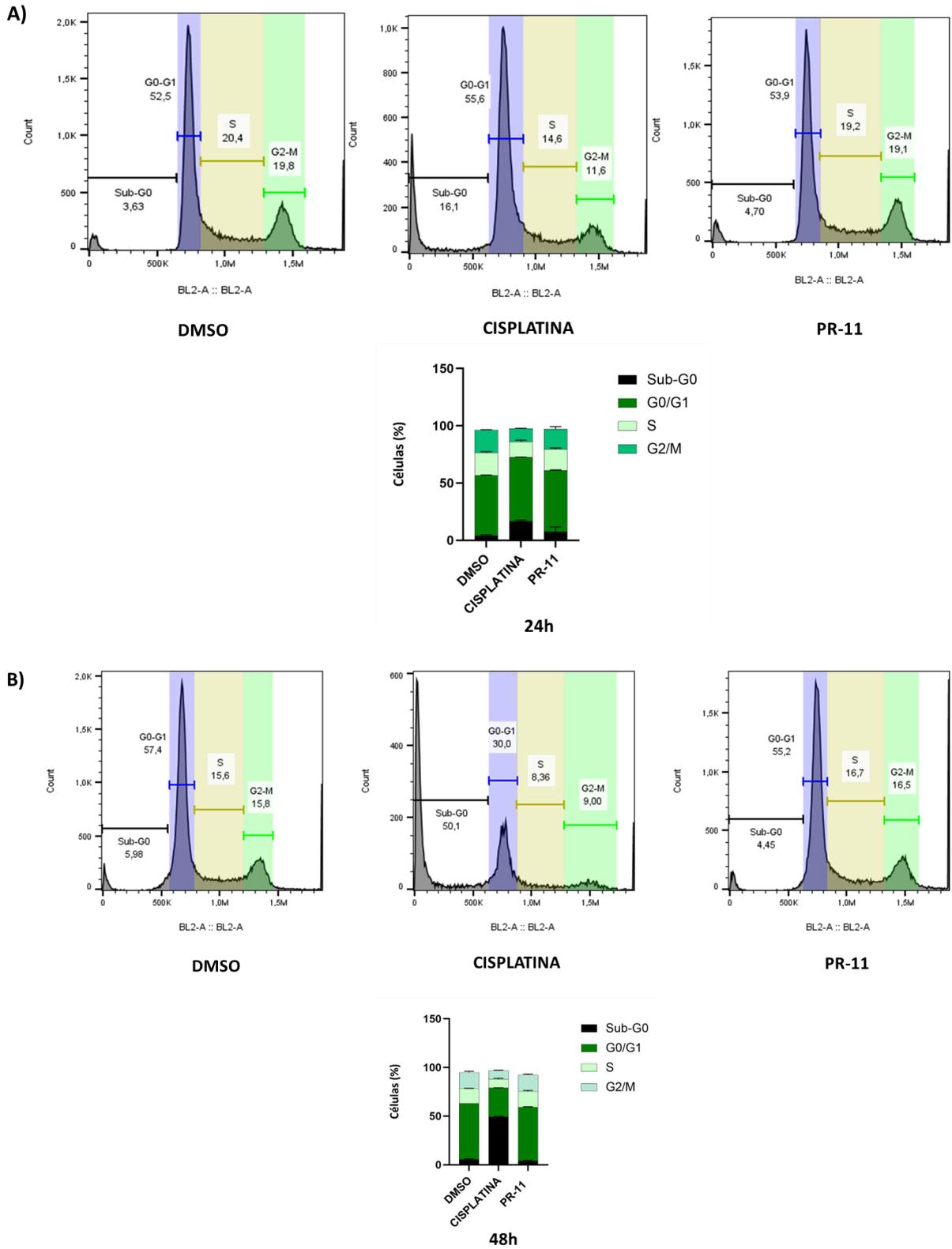
Já se encontra descrito na literatura estudos com derivados de TSCs para avaliação antineoplásica na linhagem celular de câncer de pulmão de células não pequenas A549, onde os resultados se mostraram positivos e satisfatórios, observando que três compostos derivados de TSCs demonstraram efeitos citotóxicos e apoptóticos em células neoplásicas de pulmão. O estudo destaca que a molécula substituída com cloro, em posições específicas, mostrou melhor citotoxicidade na linhagem A549 (Sever, Belgin, 2020).

Um estudo que utilizou TSCs como ligantes para os metais cobre, níquel e zinco, relatou que em ensaios de MTT, a linhagem celular A549 sofreu danos quando tratada com o composto ligado ao cobre. O mesmo estudo testou em fibroblastos de pulmão saudável, IMR-90, onde o grau de citotoxicidade foi 20 vezes menor do que para a linhagem tumoral, reforçando o potencial do cobre no mecanismo de ação do antineoplásico citado anteriormente (Andres, 2020).

#### **5.4 Análise do ciclo celular**

É possível observar na Figura 10 a análise do ciclo celular referente aos efeitos do composto PR-11 na linhagem A549 em comparação com o tratamento com a cisplatina ( $IC_{50}$ : 33  $\mu$ M), que serve de controle positivo para a análise. Além disso, como o composto foi diluído em DMSO, este reagente foi utilizado como controle. Observa-se que no tempo de 24h (Fig. 10A) não houve alteração relevante nos picos demonstrados para os gráficos gerados das respectivas fases do ciclo celular, exceto o pico de Sub-G0 da cisplatina, onde observa-se um aumento. Isso é melhor demonstrado no gráfico de barras, onde pode-se observar que apenas a cisplatina foi capaz de reduzir levemente a fase G2/M e aumentar Sub-G0.

**Figura 10.** Análise do ciclo celular na linhagem A549 após 24h (A) e 48h (B) de tratamento com o derivado PR-11 ( $IC_{50}$ : 1  $\mu$ M) e cisplatina ( $IC_{50}$ : 33  $\mu$ M).



Fonte: Autora, 2023.

A Figura 10B mostra que a cisplatina reduziu o pico referente a fase G0/G1 em 48h, diminuindo em cerca de 28% o percentual de células nessa fase, também representado no gráfico de barras. Além disso, este fármaco aumentou o número de células na fase Sub-G0, representando a morte celular. No entanto, nota-se mais uma vez, que o composto PR-11 não ocasionou alteração nos picos das fases do ciclo celular, da mesma forma fica evidenciado no gráfico de barras. Por isso, sugere-se que o composto não possui mecanismo que afeta diretamente o ciclo celular, apesar de ser demonstrado na análise *in silico*, que um dos alvos do composto seria as CDKs. Visto isso, faz-se necessário uma análise mais fidedigna, de modo a avaliar também o tempo de 72h, pois estudos relatam a parada do ciclo celular nas fases S e G2/M na linhagem A549 (Mohammed, 2021).

Em contrapartida, também é descrito na literatura que um derivado de TSCs não apresenta interferência do ciclo celular na linhagem A549, sugerindo que o composto pode não ser um agente antiproliferativo específico para as células pulmonares tumorais. Do mesmo modo, no estudo é relatado a atividade apoptótica, por indução do acúmulo de células na fase G0/G1 nas linhagens MCF-7 (adenocarcinoma de mama) e U2OS (sarcoma ósseo). Além disso, foi levantada a hipótese de o composto ser um modulador de genes envolvidos na regulação do ciclo celular, e o resultado demonstrou que a molécula reduz a expressão da CDK2B na linhagem A549. Sendo assim, os resultados para esta linhagem celular de CPNPC é controverso (Bozgeyik, 2020).

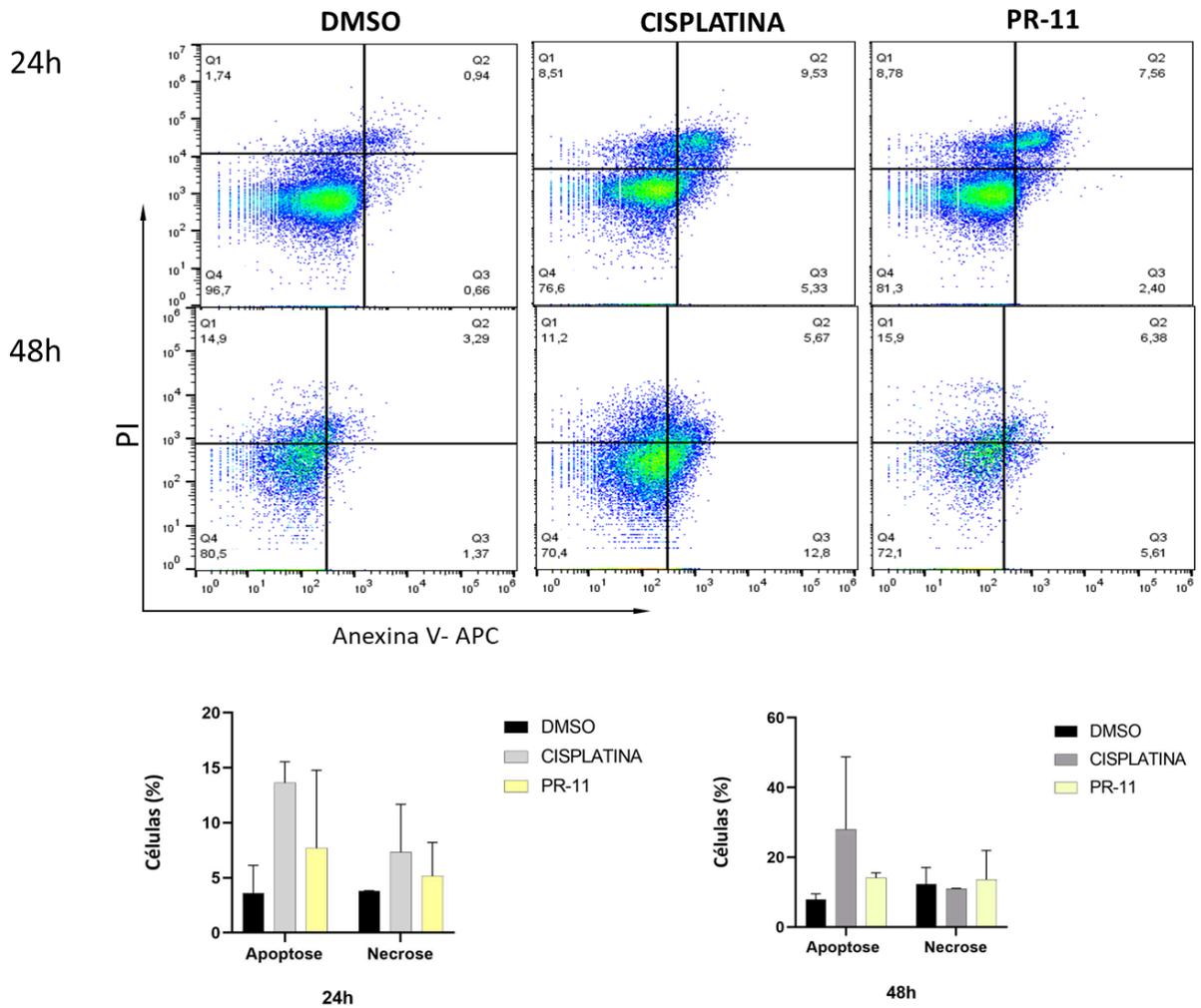
## 5.5 Apoptose e necrose

Dentre as características adquiridas pelas células no processo de morte, destaca-se a perda da assimetria da membrana plasmática, onde há a exposição do fosfolípido fosfatidilserina (PS). Esse componente tem alta afinidade com a Anexina V, que conjugada com o fluoróforo alofocianina (APC), representa na citometria de fluxo as células que se encontram em estágio de apoptose. Já o PI é um corante vital, ou seja, células viáveis não são coradas por este reagente, sendo outro marcador de morte celular, indicando apoptose tardia (quando é positivo para PI e anexina) e necrose (quando positivo apenas para PI) (Mirzaahmad, 2019).

Embora o gráfico de barras (Figura 11) tenha demonstrado que o PR-11 induziu a morte celular, quando calculado estatisticamente, o valor de p se mostrou discrepante aos dados brutos do ensaio, pois não atendeu ao valor adotado de  $p <$

0,05 para que se demonstre a credibilidade dos resultados. Dessa forma, seria interessante repetir os ensaios para obtenção de mais informações a fim de consolidar uma resposta mais fidedigna.

**Figura 11:** Avaliação da indução de apoptose e necrose na linhagem A549 após 24h e 48h de tratamento com o composto PR-11 (IC<sub>50</sub>: 1 µM) e cisplatina (IC<sub>50</sub>: 33 µM).



**Legenda:** PI: iodeto de propídeo; Q1: PI (+); Anexina (-); Q2: PI (+); Anexina (+); Q3: PI (-); Anexina (+); Q4: PI (-); Anexina (-); Anexina V- APC: anexina V conjugada com o fluoróforo alofocianina.

**Fonte:** Autora, 2023.

Ademais, já foi relatado que um dos mecanismos de ação das TSCs é pela indução de morte celular por apoptose (Sever, Belgin, 2020). Outro estudo relatou que um derivado de TSCs contendo ouro (I) induziu a apoptose da linhagem Hela 229, por mecanismos de inibição da proliferação celular, assim como o composto demonstrou a inibição da enzima tioredoxina redutase (González et al., 2020).

Um estudo realizado com um derivado de TSCs nas linhagens A549, MCF-7 e U2OS, verificou a possibilidade da indução da apoptose envolvidas nestas células. Porém, apenas as linhagens MCF-7 e U2OS demonstraram apoptose significativa, já

a linhagem A549 não demonstrou valores estatisticamente favoráveis. No entanto, o estudo avaliou também a expressão dos genes BCL2, BCLXL, BAX, CASP3 e CASP9 pela metodologia de reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR), onde foi observado que, na linhagem A549, os genes CASP3 e CASP9 estavam com sua expressão aumentada. Entretanto, mais uma vez, os valores se mostraram estatisticamente não significativos (Bozgeyik, 2020).

## 6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, nota-se a relevância do composto PR-11 na análise *in silico*, no ensaio de avaliação da toxicidade em PBMCs e no teste de viabilidade celular por MTT nas linhagens neoplásicas de pulmão. Os demais ensaios, de análise do ciclo celular e avaliação da apoptose e necrose, demonstraram resultados interessantes que incentivam a proceder com as buscas, de modo a repetir os testes para verificar por quais mecanismos de ação o composto exerce sua atividade antineoplásica. Além disso, o estudo foi de devida importância para o desenvolvimento das pesquisas acerca da descoberta das novas moléculas antineoplásicas, de forma a contribuir com resultados sobre os novos derivados da TSCs com impacto no CP.

## REFERÊNCIAS

ABDELGALIL, Ahmed A.; AL-KAHTANI, Hamad M.; AL-JENOABI, Fahad I. Erlotinib. In: **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology**. Academic Press. p. 93-117. 2020.

ALCANTUD, José Carlos R. et al. **Análise da sobrevida de casos de ressecções de câncer de pulmão com teoria dos conjuntos fuzzy e soft na tomada de decisão cirúrgica**. Plos one , v. 14, n. 6, pág. e0218283, 2019.

ALDOSSARY, Sara A. **Revisão sobre farmacologia da cisplatina: uso clínico, toxicidade e mecanismo de resistência da cisplatina**. Revista Biomédica e Farmacologia, v. 12, n. 1, pág. 7-15, 2019.

ANDRES, Sarah A. et al. **Synthesis, characterization, and biological activity of hybrid thiosemicarbazone–alkylthiocarbamate metal complexes**. Inorganic Chemistry, v. 59, n. 7, p. 4924-4935, 2020.

ASHRAFIZADEH, Milad et al. **Células de câncer de pulmão e sua sensibilidade/resistência à quimioterapia com cisplatina: Papel dos microRNAs e mediadores upstream**. Sinalização celular, v. 78, p. 109871, 2021.

ASSIM, Keum-Young; Ah, Seon-Hee. **A citotoxicidade induzida por arsenito é regulada pela ativação da poli-ADP ribose polimerase 1 e parthanatos em células H1299 deficientes em p53: Os papéis da autofagia e do p53**. Comunicações de Pesquisa Bioquímica e Biofísica , v. 78-85, 2023.

BAJAJ, Kritika et al. **Physical structure of constitutional isomers influences antiproliferation activity of thiosemicarbazone-alkylthiocarbamate copper complexes**. Journal of Inorganic Biochemistry, p. 112288, 2023.

Bai XG, Zheng Y, Qi J. **Advances in thiosemicarbazone metal complexes as anti-lung cancer agents**. Front Pharmacol. 2022.

BERROUET, Catherine et al. **Comparação dos efeitos inibitórios de drogas (IC 50) em culturas de monocamada e esferóides**. Boletim de biologia matemática , v. 82, n. 6, pág. 68, 2020.

BOZGEYIK, Esra et al. **Novel thiosemicarbazone derivative 17B interferes with the cell cycle progression and induce apoptosis through modulating downstream signaling pathways**. Gene Reports, v. 18, p. 100578, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Como está o percentual do uso de tabaco no Brasil?** - Brasil, 2021.

WOODMAN, Christopher et al. **Aplicações e estratégias em nanodiagnóstico e nanoterapia no cancro do pulmão**. In: Seminários em biologia do câncer . Imprensa Acadêmica. p. 349-364. 2021.

COSTA, Felipe Ribaldo Ferreira da. **Investigação de moléculas híbridas para o tratamento anticâncer.** 2022.

MITTELMANN, Tamíres Hillesheim et al. **Câncer De Pulmão e Sistema Purinérgico.** Semana Acadêmica do Curso de Medicina da UFFS-Campus Chapecó, v. 2, n. 2, 2019.

DAINA, Antoine; MICHIELIN, Olivier; ZOETE, Vincent. **SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules.** Scientific reports, v. 7, n. 1, p. 42717, 2017.

EL MAJZOUN, Rania et al. **Um derivado de tiosemicarbazona induz apoptose de células de câncer de mama triplo negativo: possível papel do miRNA-125a-5p e do miRNA-181a-5p.** Genes & genômica , v. 41, p. 1431-1443, 2019.

FRANCESCHINI, Juliana Pereira; SANTORO, Ilka Lopes. **Estadiamento do câncer de pulmão: uma visão epidemiológica brasileira.** Jornal Brasileiro de Pneumologia, v. 46, 2020.

GARCIA, Rayane Manoel et al. **Análise epidemiológica da mortalidade por Câncer de Pulmão em Mato Grosso, Brasil, 2011 a 2021.** Research, Society and Development, v. 12, n. 6, p. e27312642286-e27312642286, 2023.

GONZÁLEZ-BARCIA, Luis M. et al. **Comparative study of the antitumoral activity of phosphine-thiosemicarbazone gold (I) complexes obtained by different methodologies.** Journal of Inorganic Biochemistry, v. 203, p. 110931, 2020.

GLOBOCAN - Global Cancer Observatory. **Cancer Tomorrow.** Disponível em: <https://gco.iarc.fr/>. Acessado em 2023. 2023.

PERREIRA DA ROCHA, Aline, et al. **Monitoramento do horizonte tecnológico.** Maio, 2022.

Harrison PT, Vyse S, Huang PH. **Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer.** Semin Cancer Biol. 2020.

IGUEIREDO, et al. **Real-world data from the Portuguese Nivolumab Expanded Access Program (EAP) in previously treated Non Small Cell Lung Cancer (NSCLC).** Real-world data from the Portuguese Nivolumab Expanded Access Program (EAP). v. 26, p. 10-17, 2020.

INCA - **Estimativa 2022: incidência de câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer.** José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2022

KHALAJI, Amirreza et al. **Um estudo baseado em bioinformática sobre as células de câncer de pulmão resistentes à cisplatina; quais são os orquestradores desse fenômeno?** Gene, pág. 146668, 2022.

LIMA, Andresa Alves de. **Síntese, avaliação da atividade antiproliferativa e estudo da interação frente ao DNA de um composto de prata contendo a tiossemicarbazona derivada da isatina.** 2022.

Matthews, HK, Bertoli, C. & de Bruin, RAM. **Controle do ciclo celular no câncer.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 23 , 74–88. 2022.

Medina-Reyes, El, Mancera-Rodríguez, MA, Delgado-Buenrostro, NL *et al.* **Novas tiossemicarbazonas induzem alta toxicidade em células de câncer de mama positivas para receptores de estrogênio (MCF7) e exacerbam a eficácia da cisplatina em células de mama triplo-negativas (MDA-MB231) e de adenocarcinoma de pulmão (A549).** *Investir em novos medicamentos* 38 , 558–573, 2020.

MILANEZ, Fernanda Manente *et al.* **Adenocarcinoma pulmonar, dermatomiosite e síndrome miastênica de Lambert-Eaton: uma rara associação.** *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 34, p. 333-336, 2008.

MIRZAAHMADI, Azadeh *et al.* **New series of water-soluble thiosemicarbazones and their copper (II) complexes as potentially promising anticancer compounds.** *Journal of Molecular Liquids*, v. 293, p. 111412, 2019.

MOHAMMED, Faten Zahran *et al.* **Design, synthesis, cytotoxic screening and molecular docking studies of novel hybrid thiosemicarbazone derivatives as anticancer agents.** *Chemistry & Biodiversity*, v. 18, n. 12, p. e2100580, 2021.

Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia. **Resumo do composto PubChem para CID 5460033, cisplatina.**  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5460033> . Acessado em 31 de outubro de 2022.

NEVES, Amanda P.; VARGAS, Maria D. **Complexos de platina (II) na terapia do câncer.** *Revista Virtual de Química*, v. 3, n. 3, p. 196-209, 2011.

OLIVEIRA, Gabriela Porto de. **Complexos de Pd (II) e Pt (II) contendo tiossemicarbazonas derivadas do tiofeno: síntese, caracterização, investigação da citotoxicidade e modo de ação.** 2022.

ONCOGUIA. **Quimioterapia para câncer de pulmão de não pequenas células.** Março de 2023.

ÖZBEK, Oguz; BERKEL, Caglar. **Sensor Properties of Thiosemicarbazones in Different Analytical Methods.** *Polyhedron*, p. 116426, 2023.

RODRIGUES, Thalita Victor Carvalho; PASSOS, Marco Aurélio Ninômia. **Câncer de pulmão de não pequenas células: radioterapia estereotáxica, sobrevida dos pacientes e atuação da enfermagem.** *Revista JRG de Estudos Acadêmicos*, v. 5, n. 11, p. 279-287, 2022.

SESMA, Andréa et al. **Da carga mutacional tumoral ao receptor de células T no sangue: em busca do melhor biomarcador preditivo no câncer de pulmão tratado com imunoterapia.** Cânceres , v. 12, n. 10, pág. 2974, 2020.

SEVER, BELGİN et al. **Design, synthesis and biological evaluation of new bis (thiosemicarbazone) derivatives as potential targeted anticancer agents for non-small cell lung cancer.** JOURNAL OF RESEARCH IN PHARMACY, v. 24, n. 5, 2020.

Shankar A et al. **Environmental and occupational determinants of lung cancer.** Transl Lung Cancer Res. 2019.

SILVA, Ana Maria Fantini et al. **Pemetrexede no tratamento inicial do adenocarcinoma de pulmão avançado-experiência da clínica privada.** Revista Brasileira de Oncologia Clínica Vol, v. 7, n. 22, 2010.

SILVA, Ludimila Thayane Paes. **Síntese, caracterização e estudos de citotoxicidade e alvo biológico de complexos quadráticos planos contendo Tiossemicarbazonas.** 2019.

SINGH, Narendra Kumar et al. **Potência anticancerígena de complexos de cobre (II) de tiosemicarbazonas.** Jornal de Bioquímica Inorgânica , v. 210, p. 111134, 2020.

SOUZA, Rafael Aparecido Carvalho et al. **Estudos das superfícies de Hirshfeld, docking molecular e análise de parâmetros farmacocinéticos de ADME de complexos de Níquel (II) com tiossemicarbazonas.** 2022.

TCHOUNWOU, Paul B. et al. **Advances in our understanding of the molecular mechanisms of action of cisplatin in cancer therapy.** Journal of experimental pharmacology, v. 13, p. 303, 2021.

VIANA, Douglas Carvalho Francisco et al. **Análise do Mercado de Oncológicos e Novas Substância Ativas para o Tratamento do Câncer Oncology Market Analysis and New Active Substances for Cancer Treatment.** Brazilian Journal of Development, v. 7, n. 12, p. 110107-110117, 2021.

VIANI, Gustavo Arruda et al. **Radioterapia estereotáxica corporal vs. cirurgia para câncer de pulmão de células não pequenas em estágio inicial: meta-análise atualizada envolvendo 29.511 pacientes incluídos em estudos comparativos.** Jornal Brasileiro de Pneumologia, v. 48, p. e20210390, 2022.

VIEIRA, Vanessa et al. **Câncer de Pulmão de não pequenas células.** ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, v. 14, n. 25, 2017.

WANG, Kai; YU, Boxin; PATHAK, Janak L. **Uma atualização na utilização clínica da terapia fotodinâmica para câncer de pulmão.** Revista do Câncer , v. 12, n. 4, pág. 1154, 2021

Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, Lo EJ, Marcu A, Grant JR, Sajed T, Johnson D, Li C, Sayeeda Z, Assempour N, Iynkkaran I, Liu Y, Maciejewski A, Gale N, Wilson A, Chin L, Cummings R, Le D, Pon A, Knox C, Wilson M. **DrugBank 5.0: uma grande atualização no banco de dados DrugBank para 2018.** Nucleic Acids Res. 8 de novembro de 2017.

Yuan K, Wang X, Dong H, Min W, Hao H, Yang P. **Selective inhibition of CDK4/6: A safe and effective strategy for developing anticancer drugs.** Acta Pharm Sin B. 2021.

Zhang J, Xu D, Zhou Y, Zhu Z, Yang X. **Mechanisms and Implications of CDK4/6 Inhibitors for the Treatment of NSCLC.** Front Oncol. Jul 30. 2021.

Zhao Y, Cheng B, Chen Z, Li J, Liang H, Chen Y, Zhu F, Li C, Xu K, Xiong S, Lu W, Chen Z, Zhong R, Zhao S, Xie Z, Liu J, Liang W, He J. **Perfil de toxicidade dos inibidores da tirosina quinase do receptor do fator de crescimento epidérmico parapacientes com câncer de pulmão: uma revisão sistemática e meta-análise de rede.** Crit Rev Oncol Hematol. 2021.

ZHAO, Mingzhe et al. **Cytochrome P450 enzymes and drug metabolism in humans.** International journal of molecular sciences, v. 22, n. 23, p. 12808, 2021.