

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

TAYLA HIROKI KAWATOKO

Investigação dos efeitos citotóxicos de novos compostos
sintéticos em células tumorais de mama

São Carlos
2025

TAYLA HIROKI KAWATOKO

Investigação dos efeitos citotóxicos de novos compostos
sintéticos em células tumorais de mama

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Instituto de Física de São Carlos da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Bacharel em
Ciências Físicas e Biomoleculares
Orientador: Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo

São Carlos
2025

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

RESUMO

O câncer de mama é a principal causa de morte por câncer entre as mulheres, sendo os subtipos triplo-negativo e triplo-positivo os que apresentam maiores desafios terapêuticos. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos citotóxicos de compostos sintéticos derivados de tiazol em linhagens celulares de câncer de mama (MDA-MB-231 e MCF-7), assim como em células hepáticas (HepG2) e fibroblastos (HFF-1). Para isso, foram realizados ensaios *in vitro* de viabilidade celular para determinação dos valores de IC_{50} , além de testes de inibição da polimerização da tubulina. Como abordagem complementar, empregaram-se estudos *in silico*, incluindo ancoragem molecular, análise de propriedades físico-químicas. Dos 11 derivados de tiazol avaliados, os compostos 2, 8, 9 e 10 se destacaram pela atividade inibitória significativa e pela seletividade promissora contra a linhagem MCF-7 ($IC_{50} < 5 \mu M$; $IS > 10$). Esses compostos demonstraram, em ensaio de polimerização da tubulina, um perfil de desestabilização dos microtúbulos semelhante ao da colchicina, indicando possível interferência no ciclo celular, especialmente na fase G2/M, com potencial indução de apoptose. Em alinhamento com esses resultados, a ancoragem molecular revelou que os derivados de tiazol, especialmente os compostos 2 e 8, apresentam alta afinidade pelo sítio da colchicina na tubulina, destacando-se como potenciais inibidores da polimerização dessa proteína. Além disso, esses compostos mostraram propriedades físico-químicas compatíveis com boa absorção intestinal e ausência de permeabilidade à barreira hematoencefálica, evidenciando perfil favorável para desenvolvimento farmacológico. Dessa forma, os derivados de tiazóis avaliados combinam eficácia antiproliferativa, seletividade e características farmacocinéticas adequadas, consolidando-se como candidatos promissores para o desenvolvimento de novos agentes antitumorais, especialmente para os subtipos mais agressivos do câncer de mama.

Palavras-chave: Câncer de mama. Tiazóis. Atividade antitumoral.

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado de células anormais, que podem invadir tecidos adjacentes e se espalhar para outras partes do corpo através da metástase. Estima-se que para 2025 o impacto dessa doença corresponda a mais de 80 % dos 20 milhões de novos casos, ou seja, 1 em cada 5 indivíduos irão desenvolver algum tipo de câncer antes dos 75 anos [1]. Atualmente, o câncer de mama é o mais diagnosticado e o que mais causa mortes entre mulheres. Segundo estimativas do *Global Cancer Observatory* (GCO), uma em cada 20 mulheres no mundo será diagnosticada com a doença, e projeções indicam cerca de 3 milhões de novos casos e 1 milhão de mortes até 2050 [2,3]. No Brasil, conforme dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), há uma estimativa de 74 mil novos casos de câncer de mama para o ano de 2025 [4].

Os subtipos de câncer de mama são classificados com base na expressão de receptores hormonais e proteínas. Um dos mais agressivos é o câncer de mama triplo negativo, (TNBC, do inglês *Triple Negative Breast Cancer*), que corresponde a 10-15% dos casos. Esse subtipo não expressa receptores de estrogênio, progesterona ou receptor tipo 2 de crescimento epidérmico humano (HER2, do inglês, *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*), destacando-se por ser o mais invasivo e com alto índice mitótico limitando as opções terapêuticas e tornando a quimioterapia a principal abordagem [5,6]. Em contraste, o câncer de mama triplo positivo, inclui receptores de estrogênio na superfície celular e permite o uso de terapia hormonal como parte do tratamento. Esse subtipo representa cerca de 10% de todos os casos diagnosticados e ele é agressivo mas ao mesmo tempo responsivo às terapias existentes [7,8].

Um dos maiores desafios no tratamento desses cânceres é a resistência às terapias disponíveis. Enquanto alguns subtipos não respondem à terapia hormonal devido à falta de receptores, outros desenvolvem mutações que permitem às células cancerígenas escaparem da apoptose [9,10]. Em relação às opções de tratamento disponíveis para o câncer de mama, a radioterapia e a cirurgia, embora amplamente utilizadas, são procedimentos invasivos e que podem não remover completamente o tumor, o que leva à recidiva da doença. Assim, a quimioterapia surge como uma alternativa a esses tratamentos, uma vez que visa aumentar a chance de cura e diminuir o risco de recorrência [11]. Apesar disso, os fármacos quimioterápicos existentes têm uma desvantagem significativa, a sua baixa seletividade, o que faz com que atinjam tanto células saudáveis quanto células cancerígenas, fazendo com que sua eficácia seja limitada e compromete a qualidade de vida dos pacientes [12,13].

Diante das limitações, a busca por desenvolver compostos químicos que possam afetar especificamente os processos biológicos relacionados ao câncer é crucial, e a tubulina se destaca como um alvo importante. Essa proteína desempenha um papel essencial na formação dos microtúbulos, um componente do citoesqueleto, formados pela polimerização de heterodímeros de α - e β -tubulina, que são estruturas fundamentais para diversas funções celulares, como proliferação celular, transporte intracelular, tráfego de organelas e angiogênese. No sistema microtubular, a formação dos microtúbulos ocorre em um equilíbrio dinâmico entre a polimerização e a despolimerização dos heterodímeros de α/β -tubulina. Nesse âmbito, os moduladores de tubulina têm um papel chave na regulação da dinâmica e organização dessas estruturas. No contexto do tratamento do câncer, interferir na estabilidade dinâmica dos microtúbulos é de suma importância, pois isso afeta diretamente processos como a formação do fuso mitótico, essencial para a divisão celular, levando à interrupção desse ciclo e, conseqüentemente, à apoptose das células cancerígenas [14-17]. Além disso, como as células cancerosas estão em fase de divisão com maior frequência do que as células normais, elas são mais sensíveis a agentes anti-tubulina.

Os fármacos da classe dos moduladores de tubulina podem ser classificados a partir dos locais distintos de ligação à tubulina, 8 sítios já foram descritos na literatura (colchicina, gatorbulina, laulimalida, maitansina, pironetina, taxano, todalam e vinca) [18]. Outra forma de classificar os moduladores de tubulina é de acordo com seu mecanismo de ação em duas categorias principais: estabilizadores e desestabilizadores de microtúbulos. Os moduladores de tubulina que tem como alvo o sítio da colchicina são um exemplo de desestabilizadores de microtúbulos [19,20].

Além da modulação da tubulina, outra estratégia promissora no desenvolvimento de fármacos antitumorais é a utilização de heterociclos, como os tiazóis, que apresentam relevância significativa no tratamento do câncer de mama. Aproximadamente 75% dos medicamentos aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) para câncer de mama contém heterociclos com nitrogênio e enxofre. Dentre os heterociclos, os tiazóis e seus derivados demonstraram uma ampla gama de atividades farmacológicas, incluindo efeitos antitumorais, antibacterianos e anti-inflamatórios [21-23]. A identificação de novas moléculas contendo tiazóis pode levar ao desenvolvimento de compostos otimizados, com potencial para tratar subtipos de câncer, como o triplo-negativo e o triplo-positivo. Portanto, a caracterização da atividade dessas moléculas e a elucidação de seus mecanismos de ação são passos fundamentais para a descoberta de novos fármacos, oferecendo a possibilidade de terapias mais eficazes e com menos efeitos colaterais.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

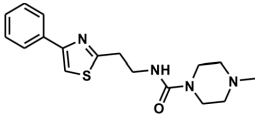
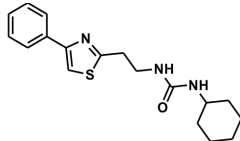
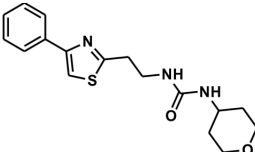
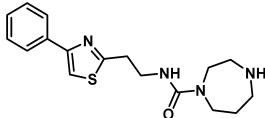
2.1 Linhagens celulares

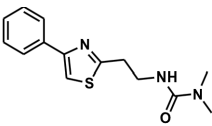
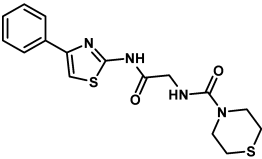
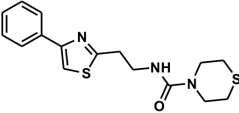
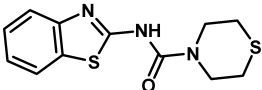
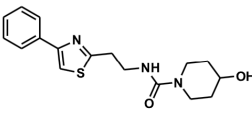
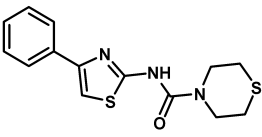
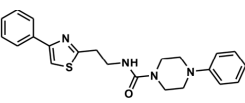
Para realização dos ensaios de citotoxicidade *in vitro*, foram empregadas 4 linhagens celulares: (I) MDA-MB-231 (ATCC N. HTB-26), células tumorais de câncer de mama triplo negativo; (II) MCF-7 (ATCC N. CCL-171), células tumorais de mama humana; (III) HFF-1 (ATTC SCRS-1041), fibroblasto não-tumoral de pele humana; (IV) HepG-2 (ATCC N. HB-8065), carcinoma hepatocelular. As linhagens (I), (III) e (IV) foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium – Cultilab®). A linhagem (II) foi mantida em meio RPMI 1640 (RoswellPark Memorial Institute – Cultilab®). Ambos os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco™) e 1% de estreptomicina (100 µg/mL), e penicilina (200 U/mL) (Sigma-Aldrich®). As células em cultura foram mantidas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂.

2.2 Compostos químicos

Os compostos testados foram sintetizados e disponibilizados pelo Prof. Dr. Celso de Oliveira Rezende Júnior ao Laboratório de Química Medicinal e Computacional (LQMC). Os compostos representados na Tabela 1 são: TJL146 (1); TJL149 (2); TJL152 (3); TJL161 (4); TJL163 (5); TJL168 (6); TJL169 (7); TJL172 (8); TJL267 (9); TJL270 (10); TJL296 (11). As soluções estoque dos compostos foram preparadas na concentração de 10 mM em 100% de dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídas em meio de cultura com concentração indicada para os diferentes ensaios. A concentração final de DMSO foi de 1% em cada amostra.

Tabela 1. Compostos sintéticos da classe dos tiazóis.

Compostos	Código	Estrutura	Compostos	Código	Estrutura
1	TJL146		7	TJL169	
2	TJL149		8	TJL172	

3	TJL152		9	TJL267	
4	TJL161		10	TJL270	
5	TJL163		11	TJL296	
6	TJL168				

2.3 Ensaios *in vitro*

2.3.1 Ensaios de Viabilidade Celular

Foram semeadas uma densidade celular de 2×10^4 células/poço em placas de 96 poços das linhagens MDA-MB-231 e MCF-7, respectivamente. As placas foram incubadas durante 24h em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Transcorrido este período, com os compostos testes foram adicionados nas concentrações 0,0625 - 64 µM. A colchicina 10 – 0,0097 µM e doxorrubicina (20 – 0,0195 µM) foram utilizadas como controles positivos. Em seguida, as placas foram incubadas por 72 h (37 °C e 5% CO₂). Após o período de incubação, 20 µL de resazurina (Sigma-Aldrich), foram adicionados em cada poço e as placas incubadas por 4h. Após, as placas foram lidas em fluorímetro de microplacas (Spectramax Gemini EM , Molecular Devices) em um comprimento de onda de excitação de 536 nm e emissão em 588 nm. Os valores de concentração citotóxica para 50% (CC₅₀), foram calculados automaticamente a partir das curvas de dose-resposta usando o logaritmo da concentração de inibidor versus a resposta normalizada entre 0 e 100%, utilizando o software GraphPad Prism 8.2.1 (GraphPad Software Inc., Estados Unidos).

2.3.2 Ensaios de citotoxicidade em hepatócitos e seletividade em fibroblastos

Fibroblastos humano (HFF-1) e células hepáticas (HepG2) foram semeadas na concentração de 2×10^4 e 4×10^4 células/poços, respectivamente em placas de 96 poços em meio DMEM e incubadas por 24h (37 °C e 5% de CO₂), para adesão celular. No dia seguinte, os compostos foram

adicionados em diluição seriada (11 concentrações de 64 a 0,0625 μM) e as placas incubadas por 72h (37 °C, 5% de CO_2). A doxorubicina (20 a 0,0195 μM) e a colchicina (10 a 0,0097 μM) foram utilizadas como controle positivo. Após o período de incubação, 20 μL de resazurina (Sigma-Aldrich), foram adicionados aos poços e as placas incubadas por 4h. Em seguida, as placas foram lidas em fluorímetro de microplacas (Spectramax Gemini EM , Molecular Devices) em um comprimento de onda de excitação de 536 nm e emissão em 588 nm. Os valores de concentração citotóxica para 50% (CC_{50}), foram calculados automaticamente a partir das curvas de dose-resposta usando o logaritmo da concentração de inibidor versus a resposta normalizada entre 0 e 100%, utilizando o software GraphPad Prism 8.2.1 (GraphPad Software Inc., Estados Unidos).

2.3.3 Ensaio de Polimerização da Proteína Tubulina

A modulação da tubulina foi avaliada por meio da polimerização da proteína *in vitro*. Foram realizados ensaios de fluorescência utilizando kits da Cytoskeleton (Denver, CO, USA, código BK011P). Os ensaios foram realizados em microplacas pretas de meia área com 96 poços. Em cada poço foram adicionados 5 μl de composto solubilizado em 10% de DMSO e 45 μl de mistura reacional (2 mg/ml de tubulina; 80 mM PIPES; 0,5 mM EGTA; 1 mM GTP; 2 mM MgCl_2 , 15% de glicerol e 10 μM de DAPI; em pH 6,9) com o auxílio de uma pipeta multicanal. A concentração final de DMSO no ensaio foi de 1% a fim de permitir a solubilização dos compostos no meio reacional sem afetar a cinética de reação dos ensaios. Em seguida, a placa foi colocada no fluorímetro SpectraMax Gemini EM (Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA) pré-aquecido a 37°C e analisadas utilizando-se os comprimentos de onda de excitação em de 340 e emissão em 460 nm. Foram executados 70 ciclos de leitura com intervalos de 45s entre duas leituras do mesmo poço.

2.4 Ensaios *in silico*

2.4.1 Ancoragem Molecular

Os compostos foram desenhados no programa de licença acadêmica MarvinSketch (Chemaxon, v.24.3.0) com ajustes de pH baseado no pH fisiológico (pH 6.9) do alvo proteico (PDB) e otimizada no Avogadro 1.2.0 (campo de força MMFF94, $dE = 1 \times 10^{-7}$ kJ/mol) [24], depois exportada como arquivos MOL2. A estrutura da proteína tubulina (PDB ID: 3DU7, resolução 4.10 Å) foram baixadas do Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein

Data Bank (RCSB PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb>), e distribuições de carga de superfície em pH fisiológico foram calculadas empregando o solucionador adaptativo de Poisson-Boltzmann (APBS) e servidores PDB2PQR (<https://server.poissonboltzmann.org/pdb2pqr>), com o campo de força PARSE [25]. Simulações de ancoragem molecular foram realizadas usando GOLD v.2024.1.0, empregando ChemPLP (com ASP como função de rescore). Cada experimento de ancoragem consistiu em 10 execuções independentes por estrutura, com poses classificadas com base em funções de pontuação e prevalência, analisadas no PLIP web server (<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>). Previsões de ancoragem com desvio quadrático médio (RMSD) inferior a 2,0 Å foram consideradas plausíveis, pois esse valor indica alta similaridade entre a pose prevista e a conformação experimental do ligante [26]. Todas as moléculas de água foram removidas antes do encaixe, e o sítio ativo foi definido pelo centro geométrico do ligante cocrystalizado dentro de uma grade esférica de 10 Å, valor escolhido por abranger os resíduos-chave do sítio de ligação e permitir flexibilidade na orientação do ligante, sem incluir regiões irrelevantes. Os resultados foram analisados e visualizados usando o software de visualização molecular Pymol v.3.1.4.1.

2.4.2 Propriedades Físico-químicas

O servidor web SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) foi utilizado para análise de propriedade do ADMET e regra de cinco de Lipinski. Foi utilizado o formato de entrada de linha molecular simplificada (SMILES) para a pesquisa.

3 RESULTADOS

Ensaio de Viabilidade Celular

Os compostos **1** a **11** foram sintetizados no Laboratório de Síntese de Candidatos a Fármacos (LaSFar), sob orientação do prof. Celso Rezende. A atividade citotóxica e antiproliferativa *in vitro* dos derivados de tiazóis foi investigada por meio do ensaio de Alamar Blue. Este ensaio baseia-se na capacidade das desidrogenases mitocondriais das células viáveis de reduzir o corante azul não fluorescente, resazurina (fenoxazin-3-ona), em resorufina, um composto de coloração rosa [27].

A triagem fenotípica dos compostos foi realizada em linhagens tumorais de mama (MDA-MB-231 e MCF-7), em linhagem não tumoral (HFF-1) e em linhagem tumoral de fígado

(HepG-2). Os compostos que apresentaram menor resposta quantitativa relacionada ao valor IC_{50} (concentração inibitória capaz de reduzir 50% da viabilidade celular) e maior seletividade foram escolhidos para prosseguir com ensaios de mecanismo de ação. Neste trabalho, adotou-se o índice de seletividade (IS) ≥ 10 como critério para seleção dos compostos-líderes. Os valores de IC_{50} obtidos correspondem após 72h de tratamento das células em diferentes concentrações dos compostos, sendo apresentado na Tabela 2. A doxorrubicina e a colchicina foram utilizadas como fármaco de referência.

Comparando os valores de IC_{50} dos compostos frente a linhagem MCF-7, é possível observar que os quatros compostos (**2**, **8**, **9** e **10**) apresentaram os menores valores IC_{50} com 2,88; 4,13; 3,82 μ M e 4,7 μ M, respectivamente e um índice de seletividade (IS) acima do valor de referência (IS >10). Já para a linhagem MDA-MB-231, os derivados de tiazóis exibiram valores de IC_{50} variando de 10 a 38 μ M. Os compostos (**1**, **3**, **4**, **5**, **6**, **7** e **11**) da série exibiram atividade inibitória moderada para a linhagem MCF-7.

Ao desenvolver um novo candidato a fármaco, devemos considerar não apenas a interação do composto frente às células tumorais, mas também sua citotoxicidade em relação às demais células saudáveis do corpo humano. Assim, a linhagem HepG2-2 foi inserida na triagem fenotípica com objetivo de mimetizar condições toxicológicas do fígado humano [28], e o fibroblasto HFF-1 para simular condições de células normais. Com a investigação da citotoxicidade foi possível observar que tais células apresentaram baixa toxicidade para os compostos de **1-11**. Isso é um bom indicativo, uma vez que os compostos testados não são hepatotóxicos e, por consequência, podem ser considerados mais seguros para tratamento. Conforme observado na Tabela 2, os valores de CC50 (Citotóxica para 50% de uma população de células) para os compostos foram acima de 64 μ M para os fibroblastos HFF-1, exceto para o composto **11**. De acordo com os resultados obtidos, a presença do esqueleto tiazol é essencial para atividade biológica.

Tabela 2. Atividade antiproliferativa dos compostos **1** a **11** diante das linhagens celulares MDA-MB-231, MCF-7, HFF-1 e HepG-2.

Compostos	IC_{50} (μ M)		CC_{50} (μ M)		IS	
	MDA-MB-231	MCF-7	HFF-1	HepG-2	MDA-MB-231	MCF-7
1	34,12 \pm 3,62	18,78 \pm 5,79	> 64	> 64	1,88	3,41
2	37,69 \pm 0,59	2,88 \pm 0,05	> 64	> 64	1,70	22,25
3	25,29 \pm 0,55	27,15 \pm 6,8	> 64	> 64	2,53	2,36

4	16,48 ± 3,95	19,9 ± 1,45	> 64	> 64	3,88	3,22
5	37,37 ± 0,54	15,54 ± 3,8	> 64	> 64	1,71	4,12
6	15,12 ± 3,66	9,54 ± 0,85	> 64	> 64	4,23	6,72
7	17,48 ± 2,31	8,43 ± 2,89	> 64	> 64	3,66	7,59
8	37,50 ± 0,19	4,13 ± 0,11	> 64	> 64	1,71	15,51
9	15,82 ± 0,36	3,82 ± 1,17	> 64	> 64	4,05	16,74
10	10,89 ± 5,83	4,70 ± 0,68	> 64	> 64	5,87	13,63
11	11,35 ± 1,43	6,88 ± 2,71	18,70 ± 7,25	> 64	5,64	2,72
Doxorrubicina	0,397 ± 0,115	0,13 ± 0,02	0,21 ± 0,03	0,19 ± 0,04	0,52	1,62
Colchicina	0,030 ± 0,005	1,16 ± 0,61	0,12 ± 0,07	0,38 ± 0,08	4,0	0,33

IC₅₀ - Concentração inibitória de 50%; CC₅₀ - Concentração citotóxica de 50%; IS - Índice de seletividade. Os valores de IC₅₀ (µM) são a média ± DP de dois experimentos individuais.

Alvo molecular

A avaliação da modulação da tubulina foi realizada com os compostos mais ativos da triagem de citotoxicidade inicial. Assim, os compostos **2**, **8**, **9** e **10** foram selecionados para um ensaio de polimerização *in vitro* da proteína, uma técnica que se baseia na capacidade do composto fluorescente DAPI de se ligar preferencialmente aos microtúbulos, apresentando uma afinidade maior do que pela tubulina livre. Durante a polimerização *in vitro*, à medida que os microtúbulos se formam, há um aumento significativo na fluorescência, detectado com excitação a 350 nm e emissão a 460 nm. Esse método permite observar curvas características que mostram a ação de compostos estabilizadores ou desestabilizadores de microtúbulos, além de quantificar o quanto essas substâncias interferem no processo de polimerização da tubulina [29].

Assim, na Figura 1 observou-se que os compostos mais ativos possuem comportamento semelhante a colchicina, um desestabilizador de microtúbulos. Isso traz algumas vantagens, como uma possível interferência no ciclo celular, mais especificamente na fase G2/M, o que pode levar as células à morte programada, ou seja, apoptose [30]. É comum que moduladores de tubulina ajam no ciclo celular, não só na fase G2 mas também na fase pré-G1 ou S, como há exemplos na literatura do trabalho de Salem e colaboradores, assim como El-Naggar e colaboradores. [22,31]

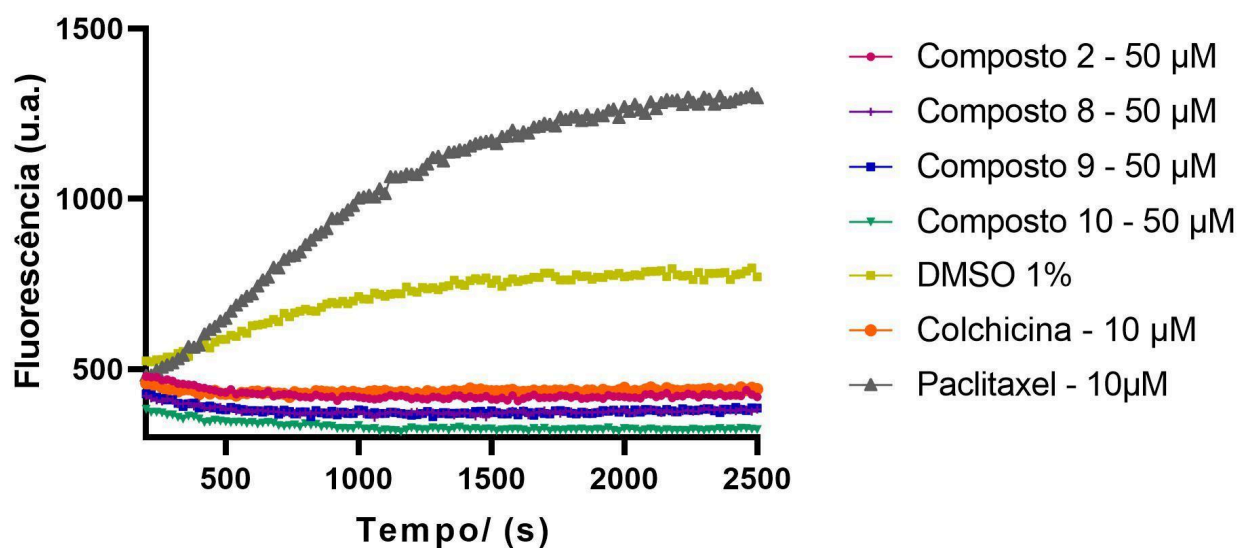


Figura 1. Ensaio de polimerização da tubulina com os compostos **2**, **8**, **9**, **10**, os controles paclitaxel e colchicina e DMSO.

Ancoragem molecular

Para investigar, em nível molecular, as interações dos compostos mais ativos relacionados à colchicina com a tubulina, foi empregada a ancoragem molecular. Essa técnica permite prever a orientação dos ligantes no sítio de ligação e estimar sua afinidade, contribuindo para auxiliar na compreensão do possível mecanismo de ação que os compostos possam estar envolvidos. Para validar o protocolo de ancoragem, foi realizado uma ancoragem do próprio ligante cocristalizado (CN2, 2-Mercapto-N-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetra-hidro-benzo(A)heptalen-7-il)acetamida) no sítio da colchicina da tubulina (PDB ID: 3DU7). A pose prevista apresentou um RMSD de 0,8366 Å em relação à conformação cristalográfica, confirmando a precisão do método. O ligante estabeleceu ligações de hidrogênio com os resíduos Leu248 e Cys241, além de interações apolares ocorrem com Leu255 e Ala250, conforme mostrado na Tabela 3.

Após a validação do protocolo, investigou-se a ligação teórica dos compostos **2**, **8**, **9** e **10** com a tubulina. Conforme mostrado na Figura 2, o composto **2** estabeleceu interações apolares entre o grupo oxano e os resíduos Leu248 e Lys254, e entre o anel benzênico e os resíduos Ala250, Leu255 e Val318. Também foram observadas ligações de hidrogênio entre os grupos amina do composto e o resíduo Asn249, com distâncias de 3,02 Å e 3,92 Å, além de uma ligação adicional entre o grupo oxano e o mesmo resíduo, com distância de 2,78 Å. Essas interações contribuíram para a

estabilização do composto **2** no sítio ativo da tubulina.

Tabela 3. Pontuações dos modos de ligação previstos para os compostos sintéticos da classe dos tiazóis, obtidas após o encaixe no sítio da colchicina da tubulina (PDB ID: 3DU7; resolução: 4,10 Å).

Compostos	Pontuação	Ligações de Hidrogênio			Interações Apolares		
		Resíduo	AA	Distância (Å)	Resíduo	AA	Distância (Å)
CN2	57,72	241B	Cys	3,76	250B	Ala	2,93
		248B	Leu	3,08		Leu	3,30
		-	-	-	255B	Leu	3,46
2	61,62		Asn	2,06	248B	Leu	3,89
		249B	Asn	3,23	250B	Ala	3,36
			Asn	2,07	254B	Lys	3,23
		-	-	-	255B	Leu	3,80
		-	-	-	318B	Val	3,83
8	61,92	249B	Asn	2,06	250B	Ala	3,36
		-	-	-	255B	Leu	3,83
		-	-	-	318B	Val	3,50
		-	-	-	354B	Ala	3,71
9	53,06	-	-	-	250B	Ala	3,38
		-	-	-	255B	Leu	3,94
		-	-	-	318B	Val	3,77
10	46,64	-	-	-	254B	Leu	3,35
		-	-	-	250B	Ala	3,32
		-	-	-	255B	Leu	3,57

CN2: ligante cocrystalizado (2-Mercapto-N-(1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetraidro-benzo[a]heptalen-7-il)acetamida).

O composto **8**, mostrado na Figura 3, estabeleceu uma ligação de hidrogênio entre o anel diazepínico e o resíduo Asn249. Além disso, o mesmo anel participou de uma interação apolar com Leu255. Interações apolares adicionais foram observadas entre o anel benzênico e os resíduos Ala250 e Val318, enquanto o grupo etila apresentou interação apolar com Ala354.

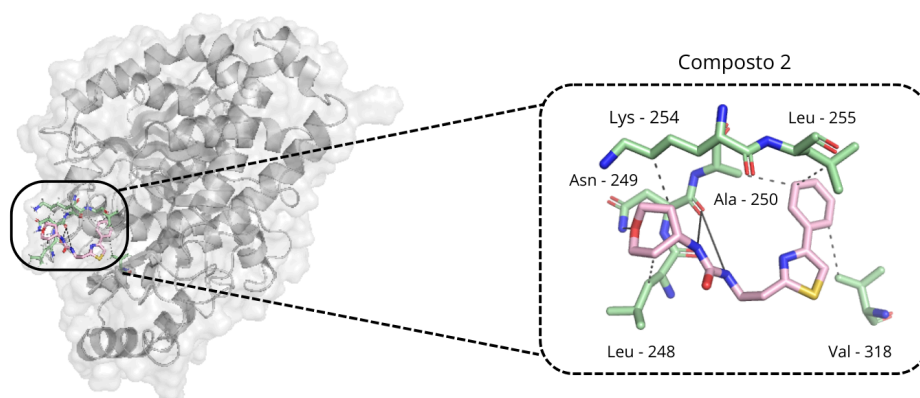


Figura 2. Interação entre o composto **2** e as interações com os resíduos da proteína tubulina.

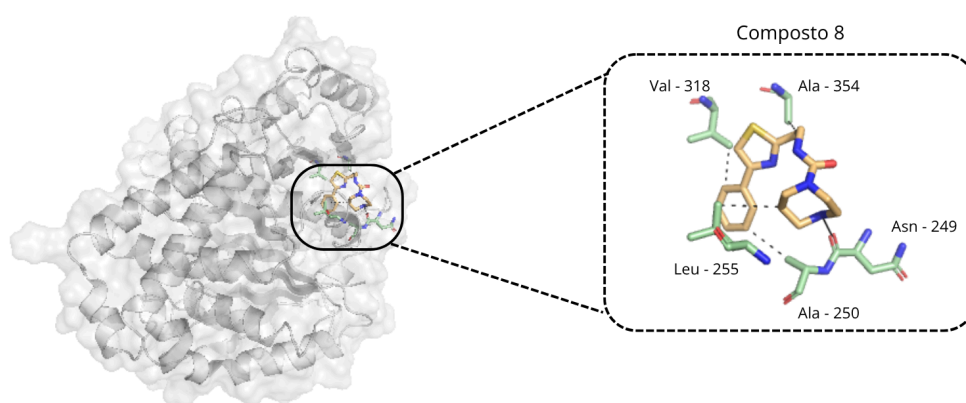


Figura 3. Interação entre o composto **8** e as interações com os resíduos da proteína tubulina.

Os compostos **9** e **10**, nas Figuras 4 e 5 respectivamente, estabeleceram exclusivamente interações apolares. No composto **9**, os resíduos Ala250, Leu255 e Val318 interagem com o anel benzênico, enquanto no composto **10** as interações apolares ocorre com os resíduos Leu254, Ala250 e Leu255, também envolvendo o anel benzênico.

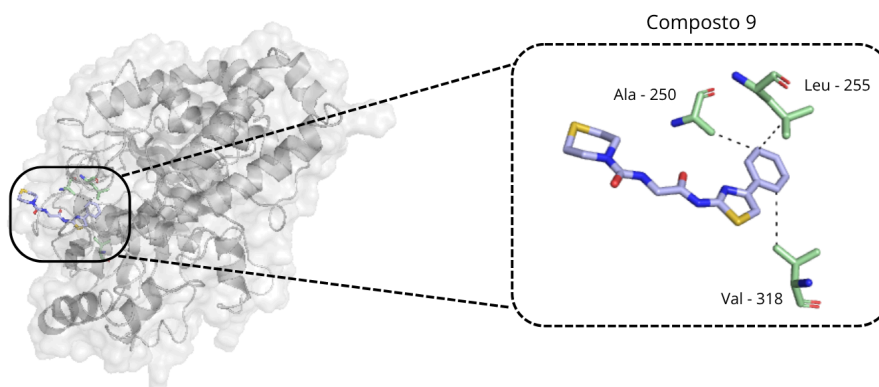


Figura 4. Interação entre o composto **9** e as interações com os resíduos da proteína tubulina.

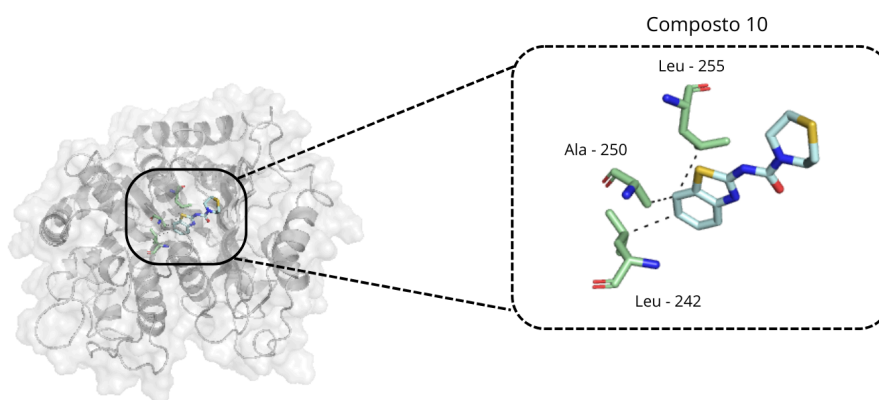


Figura 5. Interação entre o composto **10** e as interações com os resíduos da proteína tubulina.

De forma consistente com os achados deste estudo, El-Abd e colaboradores [17] demonstraram que derivados de tiazol apresentaram potente atividade citotóxica (IC_{50} variando de 3,35 a 18,69 μM) contra quatro linhagens celulares de câncer humano, a saber, HepG2, MCF-7, HCT116 e HeLa e notável capacidade de inibir a polimerização da tubulina ($IC_{50} < 3 \mu M$). Os mesmos autores também realizaram estudos de ancoragem molecular, cujos resultados corroboram os dados in vitro, ao revelarem alta afinidade dos compostos pelo sítio da colchicina na tubulina e modos de encaixe favoráveis. Assim como no estudo de El-Abd e colaboradores, este trabalho revelou o envolvimento de resíduos conservados no reconhecimento molecular, como Leu248, Leu255, Ala250, Lys254 e Asn249, reforçando sua importância na estabilidade dos complexos ligante-tubulina. O composto **2** destacou-se ao apresentar pontuação de ancoragem superior à do ligante cocrystalizado (**CN2**), com interações de hidrogênio envolvendo Asn249,

também apontado como crucial para ligações específicas. A recorrência desses resíduos em ambos os estudos indica sobreposição significativa nas regiões-chave do sítio da colchicina. Enquanto o estudo anterior relatou ligações areno-H e interações mediadas por átomos de enxofre ligados ao anel tiazol, aqui não foram observadas essas interações, provavelmente pela ausência desses grupos nos compostos testados. Contudo, houve complementaridade relevante entre interações hidrofóbicas e ligações por ponte de hidrogênio, especialmente nos compostos **2** e **8**, sugerindo que diferentes grupos funcionais podem modular a afinidade pelo sítio. Os compostos **9** e **10**, apesar de apresentarem apenas interações apolares, posicionaram-se adequadamente no sítio, interagindo com resíduos hidrofóbicos como Ala250, Leu254, Leu255 e Val318, perfil consistente com o estudo anterior.

Esses achados colocam os derivados de tiazol como farmacóforos relevantes na interação com a tubulina, contribuindo para a atividade antiproliferativa observada e servindo como ponto de partida promissor para o desenho racional de novos inibidores da polimerização da tubulina.

As propriedades físico-químicas

De acordo com a Tabela 3, as propriedades físico-químicas dos compostos mais ativos foram avaliadas, e nenhum deles violou a Regra dos 5 de Lipinski (peso molecular < 500 Da, LogP < 5, ≤ 5 doadores e ≤ 10 aceptores de hidrogênio) [33]. Essa regra, amplamente utilizada na descoberta de fármacos, indica que compostos com tais características tendem a apresentar boa biodisponibilidade oral. Além disso, os compostos analisados demonstraram alta absorção intestinal e ausência de permeabilidade à barreira hematoencefálica, características que reforçam seu potencial para o desenvolvimento farmacológico.

Assim, os compostos **2**, **8**, **9** e **10** apresentaram alta absorção intestinal e nenhuma permeabilidade da barreira hematoencefálica, o que sugere que os compostos podem ter um perfil adequado para desenvolvimento farmacológico.

Tabela 3. Propriedades físico-químicas dos compostos mais ativos calculadas com o SwissADME.

Compostos	TPSA	PAINS	WLOGP	NRB	HBD	HBA	GI	BBB	Lipinski
2	91,49	0	2,83	7	2	3	Alto	Não	0 violação
8	85,50	0	1,60	6	2	3	Alto	Não	0 violação
9	127,8 7	0	1,94	7	2	3	Alto	Não	0 violação
10	98,77	0	2,31	3	1	2	Alto	Não	0 violação
Colchicina	83,09	0	2,55	6	1	6	Alto	Não	0 violação

TPSA: Área de superfície polar topológica. **PAINS:** Estruturas de interferência do ensaio Pan; **WLOGP:** Pentâmetro de lipofilicidade WLOGP; **NRB:** Número de ligações rotativas; **HBD:** Número de aceptadores de ligações de hidrogênio; **HBA:** Número de doadores de hidrogênio; **GI:** Absorção gastrointestinal; **BBB:** Permeabilidade da barreira hematoencefálica; **Lipinski:** Regra de 5 de Lipinski.

4 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A investigação identificou os compostos **2**, **8**, **9** e **10** como candidatos promissores para o tratamento do câncer de mama triplo positivo, devido à seletividade na inibição da viabilidade celular da linhagem MCF-7, com menor atividade na MDA-MB-231 e sem toxicidade para células saudáveis (HFF-1). Ensaios de polimerização da tubulina confirmaram que esses compostos atuam como desestabilizadores de microtúbulos, com mecanismo semelhante ao da colchicina, sugerindo interferência no ciclo celular e indução de apoptose. Análises *in silico* reforçaram esses achados ao mostrar afinidade dos compostos pelo sítio da colchicina, especialmente dos compostos 2 e 8, que interagiram com resíduos-chave do ligante cocrystalizado. Além disso, os derivados de tiazol apresentaram perfil físico-químico favorável, atendendo à Regra de Lipinski, com boa absorção gastrointestinal e ausência de permeabilidade à barreira hematoencefálica, indicando potencial para desenvolvimento farmacológico. Como próximos passos, recomendam-se ensaios de ciclo celular e apoptose para validar os mecanismos de ação sugeridos.

REFERÊNCIAS

[1] Disponível online: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>. (acessado em 17 fevereiro de 2025).

- [2] KIM, J., HARPER, A., MCCORMACK, V. et al. Global patterns and trends in breast cancer incidence and mortality across 185 countries. **Nat Med** (2025). DOI: 10.1038/s41591-025-03502-3.
- [3] BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 74, n. 3, p. 229-263, 2024. DOI: 10.3322/caac.21834
- [4] Disponível online:
<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/gestor-e-profissional-de-saude/controlado-cancer-de-mama/dados-e-numeros/incidencia>. (acessado em 18 fevereiro de 2025).
- [5] ZAGAMI, Paola; CAREY, Lisa Anne. Triple negative breast cancer: Pitfalls and progress. **NPJ breast cancer**, v. 8, n. 1, p. 95, 2022. DOI: 10.1038/s41523-022-00468-0
- [6] FOULKES, William D.; SMITH, Ian E.; REIS-FILHO, Jorge S. Triple-negative breast cancer. **New England journal of medicine**, v. 363, n. 20, p. 1938-1948, 2010. DOI: 10.1056/NEJMra1001389
- [7] Disponível online:
<https://www.mdanderson.org/cancerwise/what-is-triple-positive-breast-cancer--6-insights.h00-159622590.html>. (acessado em 04 março de 2025).
- [8] MOLANI GOL, Roghayeh; KHEIROURI, Sorayya. The effects of quercetin on the apoptosis of human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231: A systematic review. **Nutrition and Cancer**, v. 74, n. 2, p. 405-422, 2022. DOI: 10.1080/01635581.2021.1897631
- [9] HERYNK, Matthew H.; FUQUA, Suzanne AW. Estrogen receptors in resistance to hormone therapy. **Breast Cancer Chemosensitivity**, p. 130-143, 2007. DOI: 10.1007/978-0-387-74039-3_10
- [10] PHOENIX, John T. et al. Hormone resistance in cancer. **Frontiers in Endocrinology**, v. 14, p. 1272932, 2023. DOI:10.3389/fendo.2023.1272932
- [11] HASSAN, M. S. U. et al. Chemotherapy for breast cancer. **Oncology reports**, v. 24, n. 5, p. 1121-1131, 2010. DOI: 10.3892/or_00000963
- [12] Disponível online:
<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/radiation-therapy/side-effects>. (acessado em 05 março 2025).

[13] Disponível online:

<https://www.cancer.org/cancer/managing-cancer/treatment-types/chemotherapy/chemotherapy-side-effects.html>. (acessado em 05 março 2025).

[14] DUMONTET, Charles; JORDAN, Mary Ann. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. **Nature reviews Drug discovery**, v. 9, n. 10, p. 790-803, 2010. DOI: 10.1038/nrd3253

[15] PEERZADA, Mudasir Nabi; DAR, Mohammad Sultan; VERMA, Saurabh. Development of tubulin polymerization inhibitors as anticancer agents. **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 33, n. 11, p. 797-820, 2023. DOI: 10.1080/13543776.2023.2291390

[16] WANG, Guangcheng et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel thiazole-naphthalene derivatives as potential anticancer agents and tubulin polymerisation inhibitors. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 36, n. 1, p. 1693-1701, 2021. DOI: 10.1080/14756366.2021.1958213

[17] EL-ABD, Azhar O. et al. Synthesis and molecular docking study of new thiazole derivatives as potential tubulin polymerization inhibitors. **ACS omega**, v. 7, n. 37, p. 33599-33613, 2022. DOI: 10.1021/acsomega.2c05077

[18] MÜHLETHALER, Tobias et al. Comprehensive analysis of binding sites in tubulin. **Angewandte Chemie**, v. 133, n. 24, p. 13443-13454, 2021. DOI: 10.1002/anie.202100273

[19] ČERMÁK, Vladimír et al. Microtubule-targeting agents and their impact on cancer treatment. **European journal of cell biology**, v. 99, n. 4, p. 151075, 2020. DOI: 10.1016/j.ejcb.2020.151075

[20] ALPÍZAR-PEDRAZA, Daniel et al. Microtubules destabilizing agents binding sites in tubulin. **Journal of Molecular Structure**, v. 1259, p. 132723, 2022. DOI: 10.1016/j.molstruc.2022.132723

[21] MITCHELL, Melissa P; PRIYANKA, Sharma. The Use of Surgery and Radiotherapy as Treatment of Regional Nodes in Breast Cancer Patients. **Oncology**, v. 32, n. 6, 2018. PMID: 29940065.

[22] SALEM, Manar G. et al. Novel 1, 3-thiazole analogues with potent activity against breast cancer: A design, synthesis, in vitro, and in silico study. **Molecules**, v. 27, n. 15, p. 4898, 2022. DOI: 10.3390/molecules27154898

[23] PETROU, Anthi; FESATIDOU, Maria; GERONIKAKI, Athina. Thiazole ring—A biologically active scaffold. **Molecules**, v. 26, n. 11, p. 3166, 2021. DOI: 10.3390/molecules26113166

- [24] HANWELL, Marcus D. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of cheminformatics**, v. 4, p. 1-17, 2012. DOI: 10.1186/1758-2946-4-17
- [25] DOLINSKY, Todd J. et al. PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations. **Nucleic acids research**, v. 35, n. suppl_2, p. W522-W525, 2007. DOI: 10.1093/nar/gkm276
- [26] BATISTA, Victor S. et al. Construção, otimização e ancoragem molecular de substâncias bioativas em biomacromoléculas: um tutorial prático. **Química Nova**, v. 45, n. 02, p. 223-234, 2022. DOI: 10.21577/0100-4042.20170821
- [27] Berrouet, Catherine et al. “Comparison of Drug Inhibitory Effects (IC50) in Monolayer and Spheroid Cultures.” *Bulletin of mathematical biology* vol. 82,6 68. 3 Jun. 2020, doi:10.1007/s11538-020-00746-7
- [28] NAKAYAMA, G.R.; CATON, M.C.; NOVA, M.P.; PARANDOOSH, Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro, **Journal of Immunological Methods**, v. 204, n. 2, p. 205-208, 1997. DOI:10.1016/S0022-1759(97)00043-4.
- [29] ARZUMANIAN, Viktoriia A.; KISELEVA, Olga I.; POVERENNAYA, Ekaterina V. The curious case of the HepG2 cell line: 40 years of expertise. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 23, p. 13135, 2021. DOI:10.3390/ijms222313135
- [30] Disponível online: <https://www.cytoskeleton.com/bk011p>. (acessado em 05 maio 2025).
- [31] MCNALLY, Francis J. Modulation of microtubule dynamics during the cell cycle. **Current opinion in cell biology**, v. 8, n. 1, p. 23-29, 1996. DOI: 10.1016/S0955-0674(96)80044-5
- [32] EL-NAGGAR, Abeer M. et al. Design, eco-friendly synthesis, molecular modeling and anticancer evaluation of thiazol-5 (4 H)-ones as potential tubulin polymerization inhibitors targeting the colchicine binding site. **RSC advances**, v. 10, n. 5, p. 2791-2811, 2020. DOI: 10.1039/C9RA10094F
- [33] LIPINSKI, Christopher A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced drug delivery reviews**, v. 23, n. 1-3, p. 3-25, 1997. DOI: 10.1016/S0169-409X(96)00423-1