



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

AGÊNCIA DE INOVAÇÃO, EMPREENDEDORISMO, PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INTERNACIONALIZAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DO ADULTO

MESTRADO ACADÊMICO



**EFEITO ANTITUMORAL DE DUAS GUANIL-HIDRAZONAS
EM LINHAGENS DE CÂNCER DE MAMA HUMANO**

DANRLEY MORAES TEIXEIRA

SÃO LUÍS

2024

DANRLEY MORAES TEIXEIRA

**EFEITO ANTITUMORAL DE DUAS GUANIL-HIDRAZONAS EM LINHAGENS DE
CÂNCER DE MAMA HUMANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Saúde do Adulto da
Universidade Federal do Maranhão para
obtenção do título de Mestre em Saúde do
Adulto.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Silva de
Azevedo dos Santos

Coorientadora: Profa. Dra. Josélia Alencar Lima

Área: Processos biológicos em saúde

Linha de pesquisa: HPV e câncer

SÃO LUÍS

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Teixeira, Danrley Moraes.

Efeito Antitumoral de Duas Guanil-hidrazonas Em
Linhagens de Câncer de Mama Humano / Danrley Moraes
Teixeira. - 2024.

62 f.

Coorientador(a) 1: Josélia Alencar Lima.

Orientador(a): Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Saúde do Adulto/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luís, 2024.

1. Câncer de Mama. 2. Guanil-hidrazonas. 3.
Antitumoral. 4. Cultura de Células. 5. . I. Lima,
Josélia Alencar. II. Santos, Ana Paula Silva de Azevedo
dos. III. Título.

DANRLEY MORAES TEIXEIRA

**EFEITO ANTITUMORAL DE DUAS GUANIL-HIDRAZONAS EM LINHAGENS DE
CÂNCER DE MAMA HUMANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Saúde do Adulto da
Universidade Federal do Maranhão para
obtenção do título de Mestre em Saúde do
Adulto.

A banca examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada em sessão pública,
considerou o candidato aprovado em:

____/____/____.

Profa. Dra. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos
(Orientadora) Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Josélia Alencar Lima
(Coorientadora) Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Marcelo Souza de Andrade
(Examinador) Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Haissa Oliveira Brito
(Examinadora) Universidade Federal do Maranhão

Dra. Ethe de Araujo Portilho
(Examinadora) Universidade Federal do Maranhão

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer aos meus pais pelo apoio incondicional ao longo desses dois anos de pós-graduação, além de todo afeto, amor e carinho. Dedico a vocês esse trabalho.

À minha orientadora, professora Ana Paula, e à minha coorientadora, professora Josélia, pela oportunidade, pelo conhecimento e, acima de tudo, pela paciência.

Ao professor Marcelo, pela paciência e por todo o auxílio a mim prestado no decorrer desse curso de mestrado.

A todos os membros do LIAC: André, Sulayne, Ana Luiza, Larissa, entre outros. Vocês foram muito importantes para a realização deste trabalho. Desejo sucesso a todos.

A todos os membros do LCC: Lila, Rafael e Monique. Vocês também foram essenciais para essa conquista. Também vos desejo sucesso.

Aos amigos da biologia: Lucas, Fabricio, Giovanna e Larissa. Grandes parceiros que vão além da academia.

A Universidade Federal do Maranhão e o Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto pela oportunidade, pela estrutura e pelo título.

A Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão pelo financiamento do projeto.

Minha eterna gratidão a todos aqui citados e também àqueles não citados, porém lembrados em meus pensamentos.

Muito obrigado!

RESUMO

O câncer atualmente representa um dos principais problemas de saúde pública no mundo, tornando-se um fator limitante da expectativa de vida. Nesse contexto, a busca por novos fármacos com atividade antitumoral ganha importância. As hidrazonas e guanil-hidrazonas são compostos orgânicos com diversas atividades biológicas já observadas, entre as quais atividade antineoplásica. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antitumoral de duas guanil-hidrazonas, guanil-hidrazona de 5,7-dibromo-3,3-dimetil-3,4-idroacridin-1-(2H)-ona (D9) e guanil-hidrazona de fenantrenoquinona (D10), em linhagens de câncer de mama humana. Para tal, foram realizados os ensaios de viabilidade celular, clonogênico, migração por ranhura, ciclo celular e morte celular nas linhagens tumorais de mama humana, MCF-7 e MDA-MB-231. No ensaio de viabilidade celular, os compostos D9 e D10 mostraram uma redução da viabilidade concentração-dependente nas duas linhagens. No ensaio clonogênico, D9 e D10 demonstraram significativa perda na capacidade de formação de colônias, especialmente D9 em todas as concentrações, em ambas as linhagens. Na migração, ambas guanil-hidrazonas mostraram uma atividade anti-migratória nas duas linhagens, sobretudo nas maiores concentrações 50 e 100 μM , destacando o composto D9. Foi verificado na avaliação do ciclo celular que D9 e D10 não provocaram mudanças significativas nas fases do ciclo das células tumorais, exceto a linhagem MDA-MB-231 que apresentou maior frequência em células na fase G2. Por último, nos resultados do ensaio de morte celular, notou-se que D9 reduziu a viabilidade celular e aumentou a frequência de células apoptóticas em MCF-7 em todas as concentrações, enquanto que D10 produziu o mesmo somente na maior concentração. Em MDA-MB-231, ambos os compostos promoveram redução da viabilidade e aumento da frequência de células apoptóticas em todas as concentrações. A partir desses resultados podemos concluir que as duas guanil-hidrazonas D9 e D10 possuem atividade antitumoral, com ênfase na atividade citotóxica, antiproliferativa, anti-migratória e pró-apoptótica nas células de câncer de mama feminino.

Palavras-chave: Câncer de mama; Guanil-hidrazonas; Antitumoral; Cultura de células.

ABSTRACT

Cancer currently represents one of the main public health problems in the world, becoming a limiting factor in life expectancy. In this context, the search for new drugs with antitumor activity gains importance. Hydrazones and guanylhydrazones are organic compounds with several biological activities already observed, including antineoplastic activity. Thus, the objective of this study was to evaluate the antitumor activity of two guanylhydrazones, guanylhydrazone from 5,7-dibromo-3,3-dimethyl-3,4-dihydroacridin-1(2H)-one (D9) and guanylhydrazone from phenanthrenequinone (D10), in human breast cancer cell lines. For this purpose, cell viability, clonogenic, slit migration, cell cycle and cell death assays were performed in the human breast cancer cell lines, MCF-7 and MDA-MB-231. In the cell viability assay, compounds D9 and D10 showed a concentration-dependent reduction in viability in both cell lines. In the clonogenic assay, D9 and D10 demonstrated significant loss in colony formation capacity, especially D9 at all concentrations, in both cell lines. In migration, both guanylhydrazones showed anti-migratory activity in both cell lines, especially at the highest concentrations of 50 and 100 μ M, with compound D9 standing out. In the cell cycle evaluation, it was observed that D9 and D10 did not cause significant changes in the phases of the tumor cell cycle, except for the MDA-MB-231 cell line, which showed a higher frequency of cells in the G2 phase. Finally, in the results of the cell death assay, it was noted that D9 reduced cell viability and increased the frequency of apoptotic cells in MCF-7 at all concentrations, while D10 produced the same only at the highest concentration. In MDA-MB-231, both compounds promoted a reduction in viability and an increase in the frequency of apoptotic cells at all concentrations. From these results, we can conclude that both guanylhydrazones D9 and D10 have antitumor activity, with emphasis on cytotoxic, antiproliferative, anti-migratory and pro-apoptotic activity in female breast cancer cells.

Keywords: Breast cancer; Guanylhydrazones; Antitumor; Cell culture.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcCoA	Acetilcoenzima A
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
Akt	Proteína quinase alfa serina/treonina
ATCC	American Type Culture Collection
BuChE	Butirilcolinesterase
°C	Graus Celsius
ChAT	Colina acetiltransferase
CO ₂	Dióxido de carbono
D9	guanil-hidrazona de acridinona (5,7-dibromo-3,3-dimethyl-3,4-idroacridin-1-(2H)-one)
D10	guanil-hidrazona de fenantrenoquinona (10-(2-(diaminomethyl)hydrazineylidene) phenanthren-9 (10H)-one)
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EMT	Transição epitelial-mesenquimal
ER	Receptor de estrogênio
ERK	Quinase extracelular reguladora de sinais
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
G1	fase de crescimento 1
G2	fase de crescimento 2

HER2	Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2
IC ₅₀	Concentração inibitória média
IARC	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JNK	Quinase N-terminal c-Jun
Ki67	Antígeno Kiel 67
mAChR	Receptor muscarínico de acetilcolina
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
mg/mL	Miligramas por mililitros
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio brometo
nAChR	Receptor nicotínico de acetilcolina
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanômetros
p38	Proteína quinase ativada por mitógenos 38
p53	Proteína tumoral 53
PI3K	Fosfoinositídeo 3-quinase
PBS	Tampão Fosfato Salino
pH	Potencial hidrogeniônico
PR	Receptor de progesterona
RNase	Ribonuclease
S	Fase de síntese

SD	Desvio padrão
SFB	Soro Fetal Bovino
t(i)	Tempo inicial
t(f)	Tempo final
TLA	Tampão de ligação de Anexina
$\mu\text{g/mL}$	Microgramas por mililitro
μL	Microlitros
μM	Micromolar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características funcionais adquiridas pelas células tumorais durante o processo de tumorigênese (A) e características emergentes (B). Adaptado de Hanahan (2022).....	19
Figura 2. Escala de comparação entre o prognóstico dos subtipos de carcinoma mamário humano com as características moleculares das linhagens celulares. CMM: câncer de mama metaplásico; ER: Receptor de estrogênio; HER2: Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2. Adaptado de Dai e colaboradores (2017)	21
Figura 3. Sinapse do sistema colinérgico e seus principais componentes. AcCoA: Acetilcoenzima A; ChAT: Colina acetiltransferase; ACh: Acetilcolina; AChE: Acetilcolinesterase; M: receptor muscarínico; N: receptor nicotínico. Adaptado de Hampel e colaboradores (2018).....	23
Figura 4. Representação do mecanismo colinérgico na carcinogênese. A acetilcolina sintetizada no citoplasma da célula tumoral é liberada e liga-se aos receptores colinérgicos muscarínicos ou nicotínicos, desencadeando um efeito autócrino que leva a um aumento na proliferação e inibição da morte celular. ACh: Acetilcolina; AChE: Acetilcolinesterase; mAChR: receptor muscarínico; nAChE: receptor nicotínico; ERK1/2: Proteína extracelular regulada por quinases 1 e 2; EGFR: Receptor de Fator de Crescimento Epidermal; AMPK: Proteína quinase ativada por Adenosina monofosfato. Fonte: autor	24
Figura 5. Estrutura geral de uma guanil-hidrazona. BRUM., 2016	26
Figura 6. Estrutura química dos compostos: A) guanil-hidrazona de 5,7-dibromo-3,3-dimetil-3,4-idroacridin-1-(2H)-ona (D9) e B) guanil-hidrazona de fenantrenoquinona (D10). Extraída de FERREIRA NETO <i>et al.</i> , 2017	27
Figura 7. Efeito do D9 e D10 na viabilidade celular da linhagem MCF-7. As células tumorais da linhagem MCF-7 permaneceram sob estímulo de D9 (A) e D10 (B) por 24, 48 e 72 horas. A viabilidade foi determinada pelo cálculo da densidade óptica dividido pela média do controle multiplicado por 100. Os níveis de significância *P≤0,05, **P≤0,01, ***P≤0,001 e ****P≤0,0001 expressam as diferenças em relação ao controle negativo	30
Figura 8. Efeito do D9 e D10 na viabilidade celular da linhagem MDA-MB-231. As células tumorais da linhagem MDA-MB-231 permaneceram sob estímulo de D9 (A) e D10 (B) por 24, 48 e 72 horas. A viabilidade foi determinada pelo cálculo da densidade óptica dividido pela média do controle multiplicado por 100. Os níveis de significância *P≤0,05, **P≤0,01, ***P≤0,001 e ****P≤0,0001 expressam as diferenças em relação ao controle negativo.....	31

Figura 9. Quantificação do percentual de células sobreviventes na linhagem MCF-7 após o tratamento com D9 e D10 nas concentrações de 10, 20, 50 e 100 μM . * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ e **** $P \leq 0,0001$ em relação ao controle negativo	33
Figura 10. Quantificação do percentual de células sobreviventes na linhagem MDA-MB-231 após o tratamento com D9 e D10 nas concentrações de 10, 20, 50 e 100 μM . * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ e **** $P \leq 0,0001$ em relação ao controle negativo	34
Figura 11. Imagens fotográficas dos poços com a formação das colônias de MCF-7 após os tratamentos com D9 e D10 nas concentrações de 10, 20, 50 e 100 μM . Registros feitos com objetiva de 10x	34
Figura 12. Imagens fotográficas dos poços com a formação das colônias de MDA-MB-231 após os tratamentos com D9 e D10 nas concentrações de 10, 20, 50 e 100 μM . Registros feitos com objetiva de 10x	35
Figura 13. Imagens fotográficas das ranhuras na linhagem MCF-7 com os tempos de 0, 24 e 48 horas nos tratamentos de D9 nas concentrações de 10, 20, 50 e 100 μM . Registros feitos com a objetiva de 10x	38
Figura 14. Imagens fotográficas das ranhuras na linhagem MCF-7 com os tempos de 0, 24 e 48 horas nos tratamentos de D10 nas concentrações de 10, 20, 50 e 100 μM . Registros feitos com a objetiva de 10x.....	39
Figura 15. Imagens fotográficas das ranhuras na linhagem MDA-MB-231 com os tempos de 0, 24 e 48 horas nos tratamentos de D9 nas concentrações de 10, 20, 50 e 100 μM . Registros feitos com a objetiva de 10x.....	40
Figura 16. Imagens fotográficas das ranhuras na linhagem MDA-MB-231 com os tempos de 0, 24 e 48 horas nos tratamentos de D10 nas concentrações de 10, 20, 50 e 100 μM . Registros feitos com a objetiva de 10x.....	41
Figura 17. Percentual de células MCF-7 nas fases G1, S e G2 do ciclo celular após o tratamento com D9 nas concentrações de 16,70 e 33,40 μM . * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ e **** $P \leq 0,0001$ em relação ao controle negativo.....	42
Figura 18. Percentual de células MDA-MB-231 nas fases G1, S e G2 do ciclo celular após os tratamentos com D9 (A) nas concentrações de 10,12 e 20,25 μM e D10 (B) nas concentrações de 17,02 e 34,05 μM . * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ em relação ao controle negativo.....	42

Figura 19. Percentual de células viáveis, em apoptose inicial, apoptose tardia e necrose após os tratamentos com D9 (A) e D10 (B) nas concentrações de 10, 33,40 e 100 μ M na linhagem MCF-7. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ e **** $P \leq 0,0001$ em relação ao controle negativo.....	43
Figura 20. Percentual de células viáveis, em apoptose inicial, apoptose tardia e necrose após os tratamentos com D9 (A) e D10 (B) nas concentrações de 10, 20,25, 34,05 e 100 μ M na linhagem MDA-MB-231. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ e **** $P \leq 0,0001$ em relação ao controle negativo	45
Figura 21: Esquema das principais atividades biológicas estudadas nas linhagens de câncer de mama humano MCF-7 e MDA-MB-231 tratadas com as Guanil-Hidrazonas (D9 e D10). Fonte: próprio autor usando software BioRender.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de concentração inibitória média (IC_{50}) obtidos a partir dos ensaios de viabilidade celular de D9 e D10 nas linhagens tumorais de mama MCF-7 e MDA-MB-231 .	33
Tabela 2. Percentuais de fechamento de ranhuras para a linhagem MCF-7 após os tratamentos com D9 (A) e D10 (B) nas concentrações de 10, 20, 50 e 100 μ M nos tempos de 24 e 48 horas. T0 = Tempo zero; Tf = Tempo final. Dados expressos em Média \pm Desvio Padrão (SD)	36
Tabela 3. Percentuais de fechamento de ranhuras para a linhagem MDA-MB-231 após os tratamentos com D9 (A) e D10 (B) nas concentrações de 10, 20, 50 e 100 μ M nos tempos de 24, 48 e 72 horas. T0 = Tempo zero; Tf = Tempo final; Dados expressos em Média \pm Desvio Padrão (SD)	37

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1. Epidemiologia do câncer	18
2.2. Câncer	18
2.3. Câncer de mama	20
2.4. Sistema colinérgico e câncer de mama	22
2.5. Hidrazonas no tratamento do câncer	24
3. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivo geral	26
3.2. Objetivos específicos	27
4. METODOLOGIA	27
4.1. Guanil-hidrazonas	27
4.2. Linhagens e culturas celulares	28
4.3. Ensaio de viabilidade celular	28
4.4. Ensaio de formação de colônias	28
4.5. Ensaio de migração celular por ranhura	29
4.6. Ensaio de morte celular por apoptose	29
4.7. Ensaio de ciclo celular	30
4.8. Análise estatística	30
5. RESULTADOS	30
5.1. Viabilidade celular das células tumorais tratadas com as guanil-hidrazonas	30
5.2. Clonogenicidade das células tumorais tratadas com as guanil-hidrazonas	33
5.3. Avaliação da migração celular após tratamento com as guanil-hidrazonas	35
5.4. Avaliação do ciclo celular das células tratadas com as guanil-hidrazonas	41
5.5. Avaliação da morte celular após tratamento com as guanil-hidrazonas	43

6. DISCUSSÃO	46
7. CONCLUSÃO	50
8. REFERÊNCIAS	50

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença que representa um problema de saúde mundial, com crescimento na incidência, alta morbimortalidade, custo elevado e baixa taxa de cura (BRAY *et al.*, 2018). O Brasil acompanha a tendência de crescimento mundial, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima 704 mil casos novos de câncer no Brasil para cada ano do triênio 2023-2025, destacando o câncer de mama na população feminina e de próstata na população masculina (INCA, 2023).

O câncer de mama apresenta classificações em aspectos histopatológicos e expressão de marcadores moleculares que auxiliam no diagnóstico, definição do tratamento e prognóstico das pacientes (PRAT *et al.*, 2015; WEIGELT; GEYER; REIS-FILHO, 2010; YIN *et al.*, 2020). Dentre eles, os subtipos considerados triplo negativos representam os de pior evolução, com baixa capacidade de resposta às classes de fármacos hormonais e imunoterapia (FOULKES; SMITH; REIS-FILHO, 2010). Neste contexto, a busca de novas classes de fármacos antineoplásicos com atividade em tumores mais agressivos ganha importância na ampliação do arsenal terapêutico.

As hidrazonas são compostos orgânicos caracterizados pela condensação de hidrazinas com cetonas ou aldeídos, consideradas substâncias de derivatização clássica de compostos carbonilados (GUIMARÃES; ROLIM; GONSALVES; ARAÚJO, 2017). Devido a sua flexibilidade estrutural e estabilidade, as hidrazonas apresentam capacidade de se associar a outros compostos formando sistema de *delivery* de fármacos (CHENG *et al.*, 2014; SONAWANE; KALHAPURE; GOVENDER, 2017), bem como uma ampla capacidade de interação com alvos moleculares conferindo propriedades analgésicas e anti inflamatórias (KAJAL *et al.*, 2014; MIRANDA *et al.*, 2012), anti Alzheimer (BAIER *et al.*, 2021; HAGHIGHIJOO *et al.*, 2017), antineoplásica (LI *et al.*, 2018), antiagregante plaquetária (BRITO *et al.*, 2010), entre outros (ALAM *et al.*, 2014; HUSSAIN; ALI, 2017).

As guanil-hidrazonas apresentadas no presente trabalho foram previamente estudadas como inibidores da enzima Acetilcolinesterase (AChE) e Butirilcolinesterase (BuChE), com o objetivo de aumentar os níveis de acetilcolina, através da inibição das colinesterases, para estudo terapêutico na doença de Alzheimer, se mostrando promissoras no ensaio de Ellman (FERREIRA NETO *et al.*, 2017). Por outro lado, não se exclui a participação do sistema colinérgico no processo de promoção na carcinogênese de mama. A acetilcolina (ACh) tem

efeitos funcionais em linhagens de câncer de mama, ativando vias como das quinases ativadoras de mitose (MAPK/ERK e PI3K/Akt), modulando a sinalização de receptores de estrógeno (ER α) e induzindo a ativação de fatores nucleares associados à maior proliferação e resistência à morte celular (ESPAÑOL *et al.*, 2007). Assim, neste trabalho hipotetiza-se que as guanil-hidrazonas apresentam atividade antitumoral em linhagem de câncer de mama.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Epidemiologia do câncer

O câncer atualmente representa o principal problema de saúde pública no mundo. A crescente incidência e a mortalidade dessa doença globalmente possuem relação com diversos fatores (BRAY *et al.*, 2018). Os dados mais recentes indicam que em todo o mundo a incidência de câncer na população será de aproximadamente 20 milhões de novos casos, com cerca de 9,7 milhões de mortes (BRAY *et al.*, 2024; GLOBOCAN, 2024). Dentre os tipos de cânceres, o câncer de mama feminino é o de maior incidência (11,7% do total de casos) e elevada taxa de mortalidade (6,9%) (BRAY *et al.*, 2024; SUNG *et al.*, 2021).

No Brasil foram estimados cerca de 704 mil novos casos de câncer somente no ano de 2023, na qual os cânceres de mama feminino e de próstata representam aproximadamente 15% da incidência cada e estando também no topo da frequência dos seus respectivos gêneros (SANTOS *et al.*, 2023). De acordo com o INCA (2023), o câncer de mama feminino é o mais incidente do país, na qual entre as 5 regiões brasileiras, o Nordeste ocupa a quarta colocação no número de incidência da doença. No estado do Maranhão, por sua vez, os dados apontam o câncer de mama como uma das principais neoplasias que acometem a população, atrás apenas do câncer de próstata, com a capital São Luís sendo responsável por cerca de 1/3 dos casos (INCA, 2023).

2.2. Câncer

O câncer corresponde a um conjunto de doenças heterogêneas compostas de uma variedade de células, entre as quais temos como exemplo as próprias células neoplásicas, fibroblastos, células endoteliais e células do sistema imunológico, além de uma grande quantidade de moléculas que compõem a sua matriz extracelular (DZOBO *et al.*, 2023; LEIBOVICI *et al.*, 2011). Além disso, hoje compreendemos que os tumores também são constituídos por células diferenciadas, incapazes de sustentar o crescimento tumoral, assim como uma subpopulação específica chamadas células-tronco tumorais, com potencial de

sustentação do crescimento do tumor e sua iniciação (TOSKO, 2021; WALCHER *et al.*, 2020).

Essa complexa estrutura possui uma base genética em sua origem. Essencialmente, desregulações genômicas levam a uma série de alterações estruturais, funcionais e na expressão de componentes que regulam processos fundamentais da célula tais como crescimento, proliferação, diferenciação e morte celular. Juntos, estes processos promovem a transformação de uma célula saudável em uma célula potencialmente maligna (WONG; HUDSON; MCPHERSON, 2011). A este processo de desenvolvimento damos o nome de carcinogênese, composto por três etapas características: iniciação, promoção e progressão (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

De acordo com Hanahan & Weinberg (2000), existem uma série de propriedades comuns a quase todos os tipos de cânceres e estas representam o sucesso das células tumorais em violar os mecanismos de defesa do organismo (HANAHAN; WEINBERG, 2000). A autossuficiência em fatores de crescimento, insensibilidade à fatores anti crescimento, potencial de replicação ilimitado, angiogênese sustentada, evasão dos mecanismos de morte celular programada e invasão de tecidos são algumas dessas características adquiridas durante a tumorigênese (Figura 1) (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Mesmo após a sua transição para o estado de malignidade, o tumor continua a evoluir, de modo que essa constante mudança leva a uma heterogeneidade molecular que resulta em uma sensibilidade terapêutica diferencial, dificultando assim sua eliminação (JACK; SHAW, 2018).

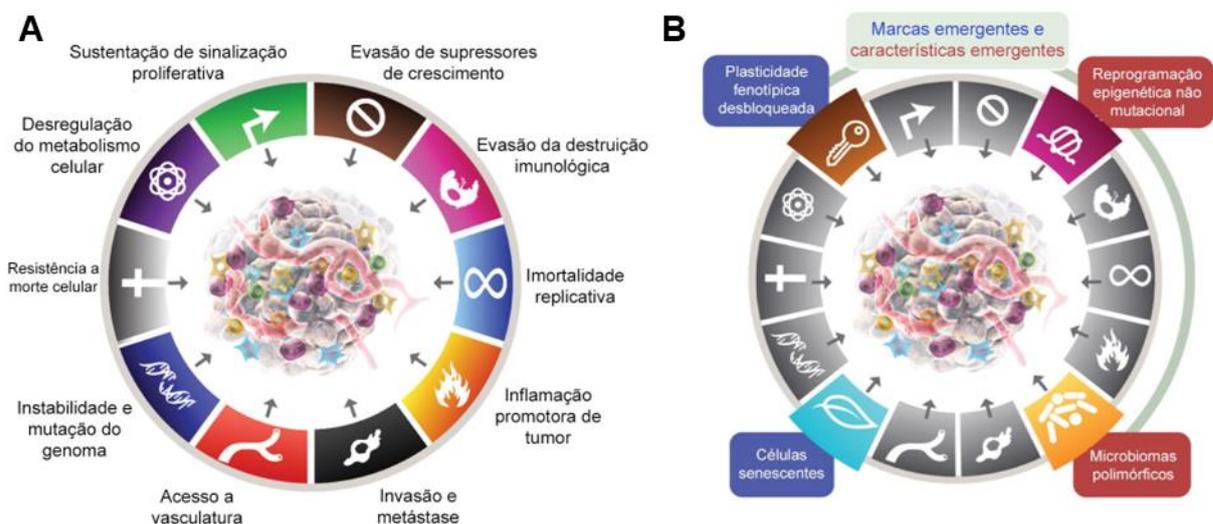


Figura 1. Características funcionais adquiridas pelas células tumorais durante o processo de tumorigênese (A) e características emergentes (B). Adaptado de Hanahan (2022).

2.3. Câncer de mama

O câncer de mama é um dos tipos de cânceres com maior incidência globalmente na população feminina, além de apresentar também uma alta taxa de mortalidade. Podemos atribuir este fato a heterogeneidade dessa doença (GUO *et al.*, 2023), uma vez que características genéticas (LARSEN *et al.*, 2014), epigenéticas (GARCIA-MARTINEZ *et al.*, 2021) e proteômicas (NEAGU *et al.*, 2021) afetam tanto propriedades comuns de tumores durante sua tumorigênese como também a sua resposta a terapia. Alguns dos aspectos mais afetados por essas diferenças são os biomarcadores tumorais do câncer de mama, assim como sua classificação histopatológica.

O sistema de classificação histopatológica do câncer de mama é uma importante ferramenta clínica e de grande relevância prognóstica. A divisão dos carcinomas de mama ocorre através da análise morfológica, avaliando-se os padrões de crescimento e grau de diferenciação (RAKHA *et al.*, 2010). Os carcinomas invasivos, tumores que penetraram o estroma através dos ductos, e os carcinomas *in situ*, tumores confinados aos ductos e lóbulos, são classificados de acordo com os sítios de origem: cânceres oriundos dos ductos são os carcinomas ductais, enquanto os cânceres originados nos lóbulos são denominados carcinomas lobulares (MAKKI, 2015; NASCIMENTO; OTONI, 2020).

É importante ressaltar que a maioria dos cânceres de mama diagnosticados são carcinomas invasivos, podendo estes receber classificações com base na presença ou não de características especiais (NASCIMENTO; OTONI, 2020). Algumas dessas classificações incluem os carcinomas medular, carcinoma apócrino, carcinoma mucinoso, carcinoma metaplásico, carcinoma cribriforme, carcinoma tubular e carcinoma neuroendócrino (MAKKI, 2015; SURABHI *et al.*, 2023; WEIGELT; GEYER; REIS-FILHO, 2010).

Por sua vez, os biomarcadores do câncer de mama dividem-se em 4 subtipos moleculares distintos, sendo estes também os de maior prevalência: luminal A (ER+|PR+|HER2-|Ki67-), luminal B (ER+|PR+|HER2+/-|Ki67+), HER2 positivo (ER-|PR-|HER2+) e triplo negativo (ER-|PR-|HER2-), na qual a sigla ER corresponde ao receptor de estrogênio, PR receptor de progesterona, HER2 o receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 e Ki-67 ao marcador de proliferação celular, podendo todos estes terem marcação positiva ou negativa a depender do subtipo (DAI *et al.*, 2016).

Cada um desses biomarcadores indica para além do subtipo tumoral o estadiamento clínico do paciente, auxilia no monitoramento da eficácia terapêutica, detecção de recidivas e

também ditam o prognóstico (PRAT *et al.*, 2015; YIN *et al.*, 2020). Ademais, muitas pesquisas *in vitro* atuais que provém boa parte do conhecimento acerca do câncer de mama são performadas utilizando linhagens celulares que refletem subtipos tumorais de interesse clínico e certas características do câncer, como a agressividade (Figura 2) (LACROIX; LECLERCQ, 2004; VARGO-GOGOLA; ROSEN, 2007).

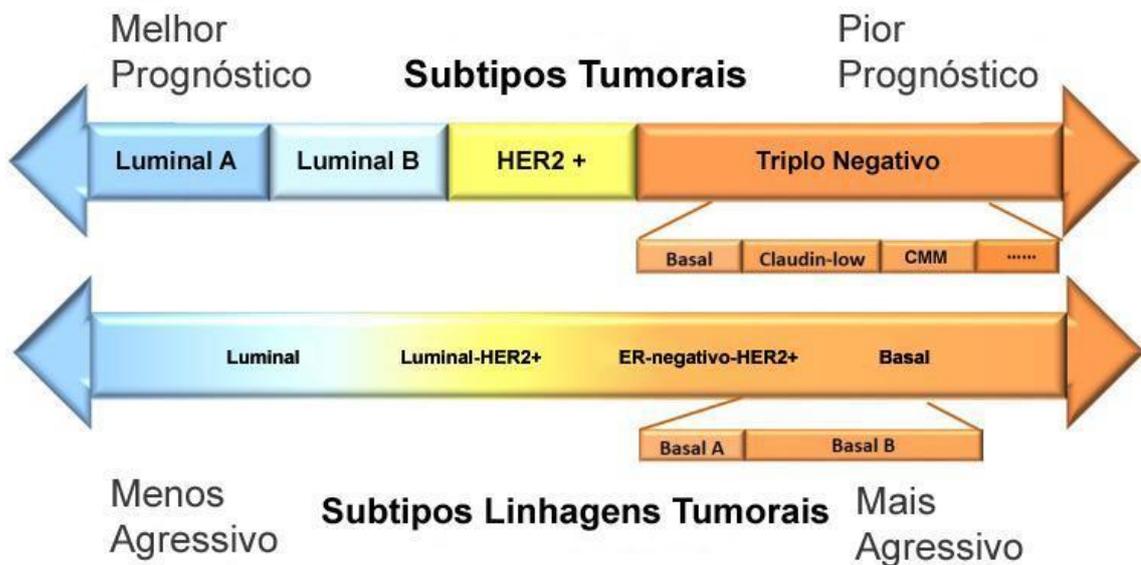


Figura 2. Escala de comparação entre o prognóstico dos subtipos de carcinoma mamário humano com as características moleculares das linhagens celulares. CMM: câncer de mama metaplásico; ER: Receptor de estrogênio; HER2: Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2. Adaptado de Dai e colaboradores (2017).

As linhagens celulares como modelo de pesquisa *in vitro* proporcionam uma série de vantagens para o estudo do câncer, buscando sobretudo um melhor entendimento de processos fundamentais da tumorigênese. A fácil acessibilidade, baixo custo, manuseio, tempo de resposta, reprodutibilidade e consistência dos dados figuram como algumas das principais vantagens da cultura de células tumorais. Não obstante, a inabilidade de representatividade do microambiente tumoral e sua heterogeneidade é um dos maiores pontos negativos da técnica (ZHAO, 2023).

No que tange o câncer de mama, duas linhagens celulares em particular MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation-7*) e MDA-MB-231 (células isoladas de um derrame pleural de um carcinoma ductal invasivo obtido da paciente MD Anderson), atualmente são algumas das mais utilizadas em pesquisas no mundo. A MCF-7 é uma linhagem celular de câncer de mama com marcação positiva para os receptores de hormônio estrogênio e progesterona,

representando o subtipo molecular luminal A. Por outro lado, a MDA-MB-231 é uma linhagem com marcação negativa para os dois receptores hormonais e também para o HER2, sendo, portanto, representativa do subtipo triplo negativo (DAI *et al.*, 2017).

2.4. Sistema colinérgico e câncer de mama

Hoje em dia, a coparticipação no estabelecimento do microambiente tumoral de alguns mecanismos fisiopatológicos é um ponto de constante debate. Recentemente, a neurobiologia tumoral vem ganhando destaque através de estudos apontando a participação de componentes do sistema nervoso no mecanismo de progressão tumoral de diversos cânceres (FAULKNER *et al.*, 2019). Algo bem destacado dentro desse conceito é a participação de fatores liberados principalmente de fibras nervosas próximas do tumor e que interagem com as células tumorais através de receptores também expressos por elas (KUOL *et al.*, 2018).

Entre os principais fatores expressos temos a acetilcolina e os receptores colinérgicos. Estudos demonstram que o sistema colinérgico possui um importante papel na tumorigênese, como por exemplo no câncer de pulmão de pequenas células (SONG *et al.*, 2003), câncer de cólon (CHENG *et al.*, 2008), câncer de estômago (YU *et al.*, 2017), câncer de mama (JIMÉNEZ; MONTIEL, 2005), entre outros (CHEN *et al.*, 2019; RUSSO *et al.*, 2014). Em complemento a isso, há evidências da expressão de componentes do sistema colinérgico por outros sistemas celulares, estendendo para além do sistema nervoso sua função biológica (PALEARI *et al.*, 2008).

Podemos descrever o sistema colinérgico como um sistema composto pela molécula acetilcolina (ACh) e suas enzimas de síntese, hidrólise e receptores, encontrados nos sistemas nervosos central e periférico, atuando na transdução de potenciais de ação (BECKMANN; LIPS, 2013). A ACh possui diversas funções biológicas em humanos, dentre as quais destacam-se: participação no sistema motor, sensorial, cognitivo (memória, raciocínio e linguagem); sistemas respiratório, gastrointestinal, cardiovascular e urogenital (WESSLER *et al.*, 1998).

A síntese da ACh (Figura 3) tem sua gênese a partir da reação entre a acetilcoenzima A (AcCoA) e a colina, mediada pela enzima colina acetiltransferase (ChAT). A ACh produzida é então armazenada em vesículas com a ajuda do transportador vesicular de acetilcolina, sendo posteriormente liberada no meio extracelular. Uma vez no meio extracelular, a ACh pode se ligar nos receptores colinérgicos muscarínicos e nicotínicos ou, quando necessário, ela é hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE) (WESSLER *et al.*, 1998; 1999).

A AChE é o principal alvo das drogas anticolinesterásicas, fármacos muito utilizados no tratamento de doenças, que inibem a hidrólise da ACh (THAPA *et al.*, 2017). Como consequência, ocorre um aumento na concentração de ACh, levando ao contínuo estímulo dos receptores colinérgicos. É importante salientar que a AChE não é a única enzima de hidrólise da ACh existente, contudo muitos anticolinesterásicos são não seletivos, atuando tanto no bloqueio da AChE, quanto da butirilcolinesterase (BuChE) (VECCHIO *et al.*, 2021).

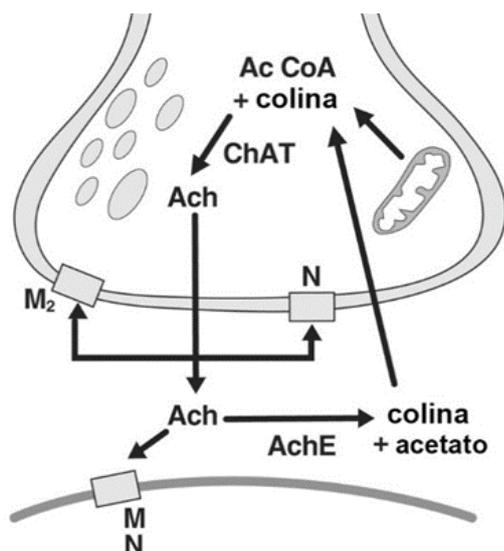


Figura 3. Sinapse do sistema colinérgico e seus principais componentes. AcCoA: Acetilcoenzima A; ChAT: Colina acetiltransferase; ACh: Acetilcolina; AChE: Acetilcolinesterase; M: receptor muscarínico; N: receptor nicotínico. Adaptado de Hampel e colaboradores (2018).

Os receptores muscarínicos e nicotínicos apresentam-se entre os mais difundidos participantes do sistema colinérgico. Os receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) pertencem a classe dos receptores ionotrópicos, regulando principalmente o fluxo de íons de sódio, potássio e cálcio, tanto em células neuronais quanto não neuronais, e promovendo uma série de processos fisiopatológicos (HO *et al.*, 2020; ZOLI *et al.*, 2018). Já os receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChR) fazem parte da família de receptores metabotrópicos, atuando em parceria com a proteína G para ativação de mensageiros secundários e canais de íons (EGLÉN, 2006). Assim como os nAChRs, os receptores muscarínicos também participam de diversos processos fisiopatológicos, sendo expressos em inúmeras células (ISHII; KURACHI, 2006; KRUSE *et al.*, 2013).

Além do bem estabelecido papel nos sistemas nervoso central e periférico, ambos os receptores também desempenham um importante papel na carcinogênese, em especial do câncer de mama (CHEN *et al.*, 2019). Estudos já demonstraram a participação dos receptores nicotínicos e muscarínicos na angiogênese (LOMBARDI *et al.*, 2013; NATORI *et al.*, 2003), proliferação (JIMÉNEZ; MONTIEL, 2005; WONG *et al.*, 2007) e inibição da apoptose (DASGUPTA *et al.*, 2006), algumas das principais capacidades fisiológicas dos tumores (Figura 4).

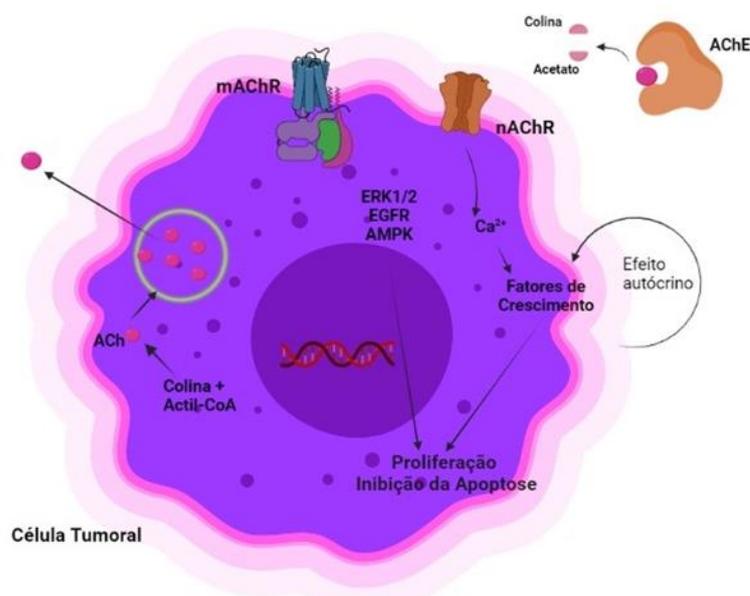


Figura 4. Representação do mecanismo colinérgico na carcinogênese. A acetilcolina sintetizada no citoplasma da célula tumoral é liberada e liga-se aos receptores colinérgicos muscarínicos ou nicotínicos, desencadeando um efeito autócrino que leva a um aumento na proliferação e inibição da morte celular. ACh: Acetilcolina; AChE: Acetilcolinesterase; mAChR: receptor muscarínico; nAChE: receptor nicotínico; ERK1/2: Proteína extracelular regulada por quinases 1 e 2; EGFR: Receptor de Fator de Crescimento Epidermal; AMPK: Proteína quinase ativada por Adenosina monofosfato. Fonte: autor.

2.5. Hidrazonas no tratamento do câncer

As hidrazonas são uma classe de compostos orgânicos com a estrutura triatômica $R_1R_2C=N-NH_2$. Além de sua modularidade, síntese e estabilidade, sua estrutura química o torna um grupo popular pois possibilita sua aplicação para diversos fins (SU; APRAHAMIAN, 2014). Uma série de atividades biológicas já foram atribuídas às hidrazonas (ALAM *et al.*, 2014), dentre as quais podemos citar atividade analgésica e anti-inflamatória (KAJAL *et al.*,

2014; MIRANDA *et al.*, 2012; TODESCHINI *et al.*, 1998), anticonvulsivante (DIMMOCK; VASHISHTHA; STABLES, 2000), antifúngica (CORDEIRO *et al.*, 2016), antibacteriana (SHAH *et al.*, 2022), anti Alzheimer e anticolinesterásico (BAIER *et al.*, 2021; HAGHIGHIJOO *et al.*, 2017; KRÁTKÝ *et al.*, 2021; UTKU *et al.*, 2011), antineoplásica (LI *et al.*, 2018), antiagregante plaquetária (BRITO *et al.*, 2010), antimalárica e antiviral (ROLLAS; KÜÇÜKGÜZEL, 2007) e anti-hipertensiva (HUSSAIN; ALI, 2017).

A constante procura por fármacos antitumorais levou à descoberta que diversos derivados de hidrazona também possuem atividade contra alguns tipos de câncer, como demonstrado nos cânceres de próstata (GÜRSOY; GÜZELDEMIRCI, 2007; VICINI *et al.*, 2006), câncer de colo retal (KUMAR *et al.*, 2013), câncer renal (GÜRSOY, 2003), câncer de ovário (TERZIOGLU; GÜRSOY, 2003), câncer de pulmão de células não pequenas (COCCO *et al.*, 2006; WARDAKHAN *et al.*, 2013) e câncer gástrico (JIN *et al.*, 2006).

O câncer de mama figura como um dos cânceres mais investigados acerca das atividades dos derivados de hidrazona. Os trabalhos de Pandey e colaboradores (2011) e Demirbas e colaboradores (2004) mostram como os respectivos derivados sintetizados pelos grupos demonstraram uma boa citotoxicidade contra a linhagem de câncer de mama MCF-7. Similarmente, Abadi e colaboradores (2003) observaram como alguns derivados de hidrazona foram eficientes em reduzir o crescimento de células tumorais de mama e também apresentaram atividade antiangiogênica. Desse modo, fica evidente a importância dos derivados de hidrazona como potenciais fármacos.

As guanil-hidrazonas (Figura 5), um grupo de derivados de hidrazonas caracterizados pela presença de um grupo amidina (guanil), são moléculas amplamente estudadas na química medicinal. O potencial biológico desses derivados já demonstrou diversas ações, tais como antimalárico (AMARAL *et al.*, 1969), citotóxica (PINHATTI *et al.*, 2016), antibacteriana (CUNHA *et al.*, 2009), anti-inflamatória (NOÉ *et al.*, 2023), antifúngica (LAZÍĆ *et al.*, 2018) e tripanocida (PAPANASTASIOU *et al.*, 2009).

Além das ações citadas, as guanil-hidrazonas também já apresentaram ação antitumoral. Os trabalhos de Andreani e colaboradores (2005, 2008) e Silva e colaboradores (2016) demonstraram que as guanil-hidrazonas sintetizadas pelos grupos foram eficazes em promover citotoxicidade para células leucêmicas. Além disso, outros trabalhos já reportaram ação antitumoral de outras guanil-hidrazonas nos cânceres de cólon, melanoma e glioblastoma (FRANÇA *et al.*, 2016).

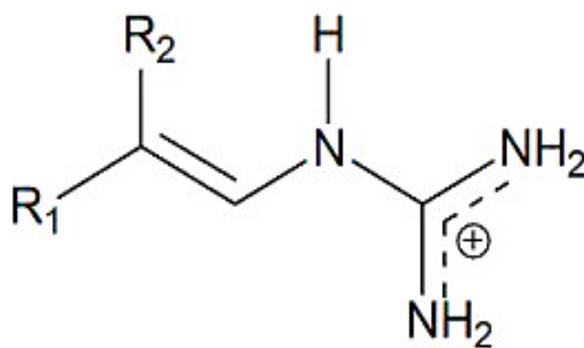


Figura 5. Estrutura geral de uma guanil-hidrazona. BRUM., 2016.

No tocante ao câncer de mama, as guanil-hidrazonas já apresentaram ação de inibição dos receptores de estrógeno (LAFRATE *et al.*, 2008), importantes mediadores de proliferação das células tumorais de mama, assim como inibição de receptores da via das proteínas quinases (ANDREANI *et al.*, 2011), via essa altamente ativada no subtipo molecular triplo negativo (HUYNH *et al.*, 2019). Embora a atividade antitumoral das hidrazonas seja amplamente demonstrada em diversos cânceres, ainda são limitados os estudos envolvendo as guanil-hidrazonas e o câncer de mama.

Ademais, destaca-se aqui também que alguns estudos já demonstraram um papel anticolinesterásico das guanil-hidrazonas (PETRONILHO *et al.*, 2015; ŠEKUTOR *et al.*, 2012). Em especial, o trabalho de Ferreira Neto e colaboradores (2017), apresenta uma nova molécula a guanil-hidrazona de fenantrenoquinona (10-(2-(diaminomethyl)hydrazineylidene)phenanthren-9(10H)-one) como forte candidata a novo fármaco para o tratamento do Alzheimer (FERREIRA NETO *et al.*, 2017).

Como já previamente colocado, estudos já apontam o sistema colinérgico possuindo uma estreita participação no processo de carcinogênese, sobretudo do câncer de mama feminino. Portanto, essas guanil-hidrazonas representam um potencial composto com propriedades antitumorais com ação através do sistema colinérgico.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade antitumoral das guanil-hidrazonas (guanil-hidrazona de fenantrenoquinona (10-(2-(diaminomethyl)hydrazineylidene)phenanthren-9(10H)-one) e acridinona (5,7-dibromo-3,3-dimethyl-3,4-idroacridin-1-(2H)-one)) em linhagens de câncer de mama humano.

3.2. Objetivos Específicos

Determinar a viabilidade celular das células de câncer de mama após o tratamento com as guanil-hidrazonas;

Avaliar o efeito das guanil-hidrazonas na capacidade de migração das células de câncer de mama;

Avaliar o potencial de formação de colônias das células de câncer de mama após o tratamento com as guanil-hidrazonas;

Avaliar a ação das guanil-hidrazonas no ciclo celular das células de câncer de mama;

Avaliar o mecanismo de morte celular por apoptose das células tumorais quando tratadas com as guanil-hidrazonas.

4. METODOLOGIA

4.1. Guanil-hidrazonas

As guanil-hidrazonas utilizadas neste trabalho (Figura 6) foram gentilmente cedidas pela Dra. Denise Cristian Ferreira Neto, Instituto Militar de Engenharia (IME, Rio de Janeiro). A caracterização química desses compostos foi publicada em periódico internacional indexado (FERREIRA NETO *et al.*, 2017). Convencionou-se aqui a utilização da nomenclatura D9 e D10 para as referidas guanil-hidrazonas.

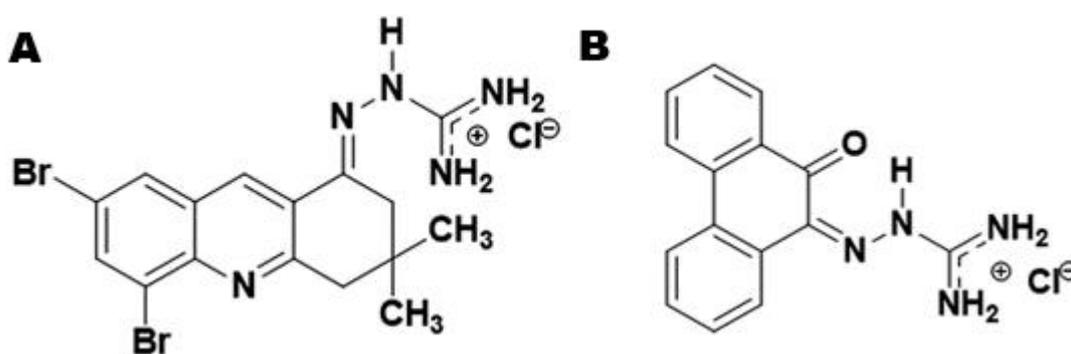


Figura 6. Estrutura química dos compostos: A) guanil-hidrazona de 5,7-dibromo-3,3-dimetil-3,4-idroacridin-1-(2H)-ona (D9) e B) guanil-hidrazona de fenantrenoquinona (D10). Extraída de FERREIRA NETO *et al.*, 2017.

4.2. Linhagens e cultura celulares

Para a execução desse estudo foram utilizadas as seguintes linhagens celulares: MCF-7 (Adenocarcinoma mamário humano receptor de estrogênio positivo) e MDA-MB-231 (Adenocarcinoma mamário humano triplo negativo). A manutenção das linhagens celulares seguiu todas as orientações da *American Type Culture Collection* (ATCC). As células foram cultivadas e mantidas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado a 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de antibiótico, em atmosfera de 5% de CO₂, à 37°C.

4.3. Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada por meio do ensaio de redução do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), segundo Supino (1995) com modificações. No ensaio foram plaqueadas 1×10^4 células em placas de 96 poços com posterior incubação por 24h em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ à 37°C. As células foram tratadas nas concentrações de 100, 50, 20, 10, 5 e 1 μM para ambos os compostos (D9 e D10) durante os intervalos de 24, 48 e 72h. Ao final de cada tempo de tratamento adicionou-se 10 μL de MTT (5 mg/mL) diluído em tampão fosfato salino (PBS) por poço, e foi feita incubação por 3h na estufa à 37°C. O sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan foram diluídos com 100 μL de álcool etílico 99%. A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 570 nm. Foram realizados 3 experimentos independentes em triplicatas. Os dados obtidos foram convertidos para porcentagem através do cálculo da densidade óptica dividido pela média do controle multiplicado por 100, analisados através do Excel e também do software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Prism Software Inc., San Diego, California).

4.4. Ensaio de formação de colônias

Para o ensaio de formação de colônias, segundo Franken (2006) e Rafehi (2011) com modificações, foram plaqueadas 60 células por poço em placas de 96 poços posteriormente incubadas por 24h em estufa com 5% de CO₂ à 37°C. Após o período de incubação as células foram tratadas com ambos os compostos (D9 e D10) nas concentrações de 5, 10, 20, 50 e 100 μM . As células permaneceram sob estímulo por 48 horas, na qual ao final do tempo de estímulo o meio de cultura foi trocado, adicionando meio suplementado sem estímulo, a substituição do meio foi realizada a cada 2 dias até que as colônias dos poços de controle chegassem a confluência. Depois disso, as células foram fixadas com álcool etílico 99% por 10 minutos, lavadas com água destilada e coradas com cristal violeta 0,5% por 10 minutos. Após a coloração, os poços foram fotografados em microscópio invertido com objetiva 10x e

solubilizado o corante adicionando 100 µL de metanol. A absorbância foi mensurada utilizando um espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm, utilizando o branco para zerar a leitura e os dados analisados através do Excel e do software GraphPad Prism 8.0.

4.5. Ensaio de migração celular por ranhura

Para o ensaio de migração celular, segundo Almeida (2019) com modificações, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços (1×10^5 células/poço) durante 24 horas. Após esse período, com a formação da monocamada de células, foi feita uma ranhura diametral com uma ponteira de 10 µL traçando uma linha no diâmetro do poço, criando um espaço sem células. Então, foi feito o registro fotográfico de cada poço (tempo 0 horas) com microscópio invertido equipado com câmera na objetiva de 10x. Em seguida foram adicionados os tratamentos com os compostos (D9 e D10) nas concentrações de 10, 20, 50 e 100 µM. Passado o período de 24 horas foi feito novamente o registro fotográfico, procedimento foi repetido a cada 24h de experimento, totalizando 72 h, ou até o fechamento da ranhura no grupo controle. As imagens foram analisadas utilizando o software ImageJ 1.54i (Wayne Rasband National Institute of Health, MA), determinando a porcentagem de fechamento das ranhuras através da variação entre a área do tempo inicial e a área do tempo final conforme a fórmula: $[t(i) - t(f)/t(i)] \times 100\%$. Os resultados foram tabulados e analisados no software Excel.

4.6. Ensaio de morte celular por apoptose

Para a avaliação da morte celular por apoptose, segundo Rieger (2011) com modificações, foram plaqueadas 1×10^5 de células das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 em placas de 24 poços durante 24 horas, até a adesão das mesmas e formação da monocamada. Em seguida, as células foram tratadas a partir da IC_{50} e permaneceram sob estímulo por 48 horas. Atingido o tempo de tratamento com os compostos, as células foram coletadas junto com os sobrenadantes para que as células mortas presentes no sobrenadante não fossem descartadas. Após lavagem com PBS, as células foram ressuspensas em 100 µL de tampão de ligação de Anexina 1x (TLA) (HEPES 10 mM; NaCl 140 mM; $CaCl_2$ 2,5 mM – pH 7.4), 5 µL de Anexina V - FITC e 5 µL de iodeto de propídio, sendo então incubadas por 15 minutos em abrigo de luz. Depois disso, as células foram ressuspensas com TLA 1x, transportadas em recipiente com gelo e lidas em citômetro de fluxo. Como controle experimental foi induzida apoptose através do tratamento das células com metanol. Foram adquiridos 10.000 eventos analisados pelas fluorescências no canal FL1-H em escala logarítmica com o uso do software FlowJo V10 (FlowJo™ Software, Ashland, Oregon).

4.7. Ensaio de ciclo celular

Para o ensaio de ciclo celular foram plaqueadas 5×10^4 de células das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 em placas de 24 poços. Após 24h as células foram tratadas com os compostos a partir de sua IC_{50} , permanecendo com o estímulo por 48h. Terminado o tempo de tratamento, as células foram coletadas utilizando tripsina, lavadas com PBS e centrifugadas. Finalizada a centrifugação, realizou-se a fixação das células utilizando 200 μ L de etanol 70% gelado, com posterior armazenamento em freezer a -20°C overnight. Novamente foi realizada a lavagem das células com PBS seguida de centrifugação. Descartado o sobrenadante, adicionou-se 300 μ L de solução contendo Triton 0,1%, Ribonuclease (RNase) 20 mg/mL e Iodeto de Propídio a 50 μ g/mL. Em seguida, as células foram armazenadas em estufa a 37°C , protegidas da luz por aproximadamente 30 minutos e levadas para leitura em um citômetro de fluxo. Foram adquiridos 10.000 eventos analisados com o auxílio do software FlowJo V10 (FlowJo™ Software, Ashland, Oregon).

4.8. Análise estatística

Os dados foram expressos como média ou média \pm desvio padrão. A análise dos dados foi realizada empregando os testes one-way ANOVA para dados com distribuição normal, com pós-teste de Dunnett para comparações múltiplas, ou Kruskal Wallis para dados com distribuição não normal. As análises estatísticas foram realizadas a partir do software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Prism Software Inc., San Diego, California). O valor de P foi considerado significativo quando menor que 0.05.

5. RESULTADOS

5.1. Viabilidade celular das células tumorais tratadas com as guanil-hidrazonas

Os resultados do ensaio de viabilidade mostram que os compostos D9 e D10 apresentaram uma significativa redução da viabilidade celular em ambas as linhagens tumorais MCF-7 e MDA-MB-231. Além disso, o efeito de redução da viabilidade celular demonstrado pelos compostos apresenta-se de modo concentração-dependente e tempo-dependente.

A linhagem celular MCF-7 apresentou perda da viabilidade com D9 a partir da concentração de 20 μ M, enquanto que o tratamento com D10 mostrou a redução a partir da concentração de 50 μ M (Figura 7). Por outro lado, na linhagem MDA-MB-231, o tratamento com D9 e D10 mostrou efeito citotóxico entre as concentrações de 20-50 μ M e 50-100 μ M, respectivamente (Figura 8).

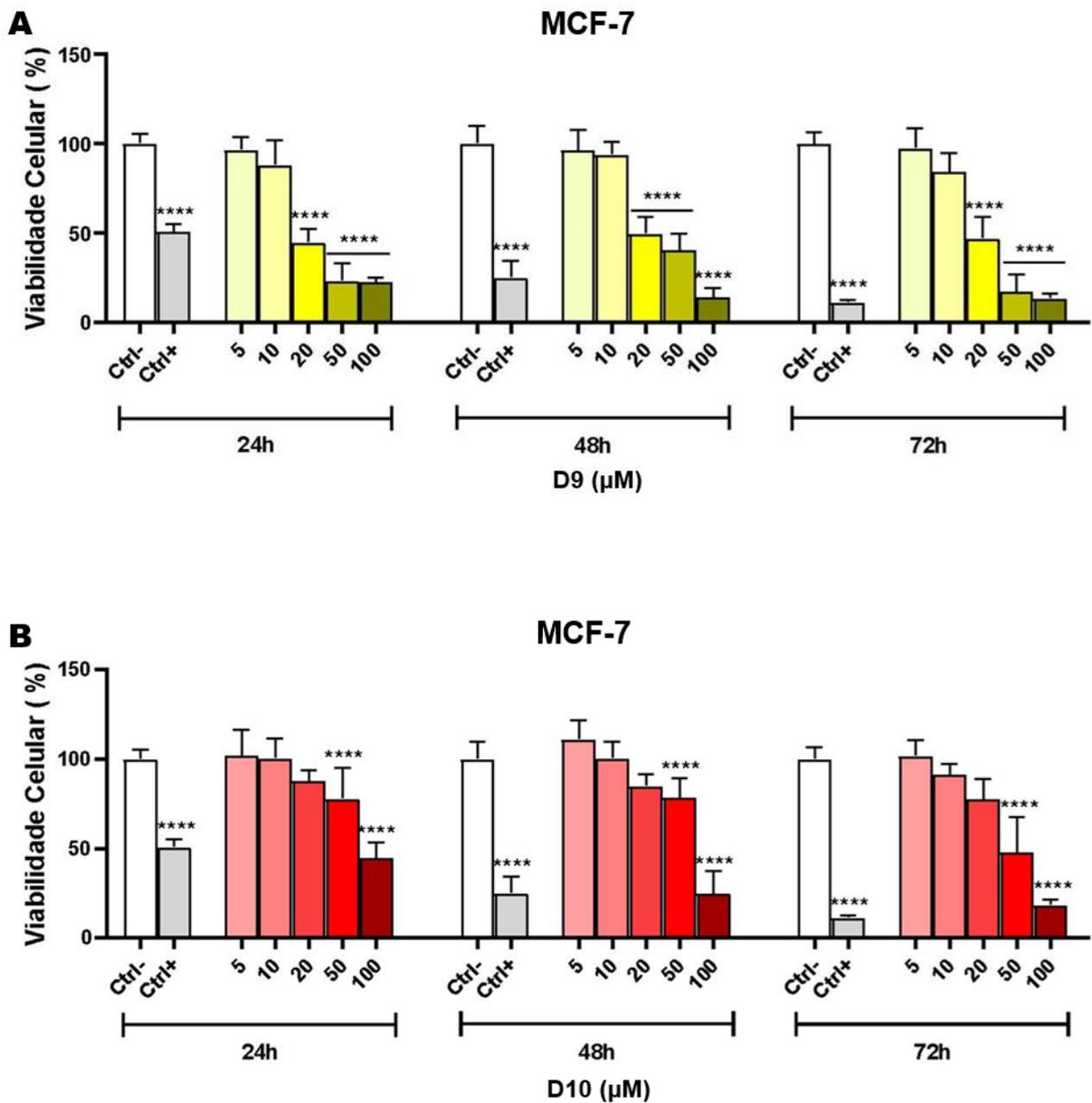


Figura 7. Efeito do D9 e D10 na viabilidade celular da linhagem MCF-7. As células tumorais da linhagem MCF-7 permaneceram sob estímulo de D9 (A) e D10 (B) por 24, 48 e 72 horas. A viabilidade foi determinada pelo cálculo da densidade óptica dividido pela média do controle multiplicado por 100. Os níveis de significância $*P \leq 0,05$, $**P \leq 0,01$, $***P \leq 0,001$ e $****P \leq 0,0001$ expressam as diferenças em relação ao controle negativo.

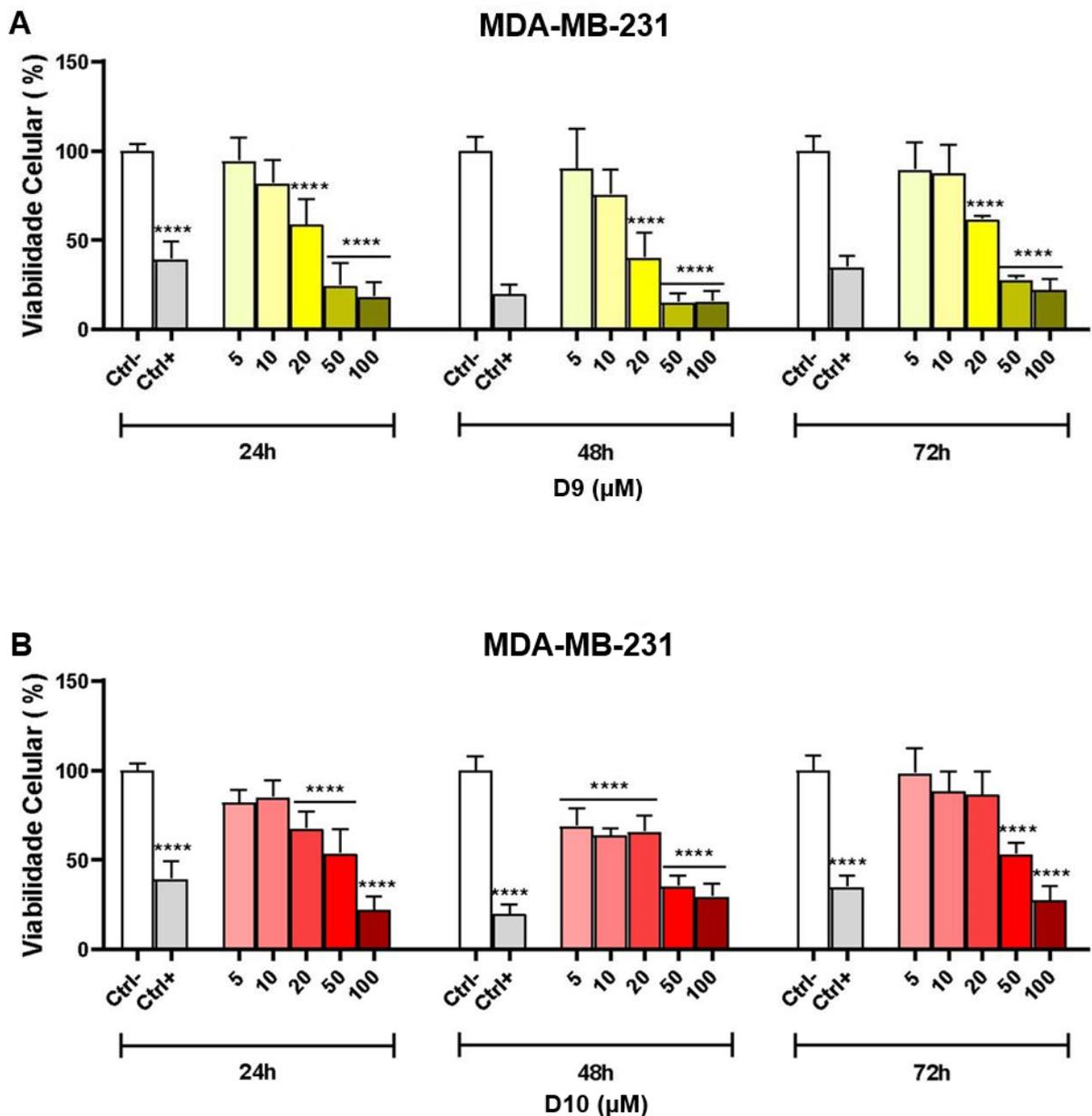


Figura 8. Efeito do D9 e D10 na viabilidade celular da linhagem MDA-MB-231. As células tumorais da linhagem MDA-MB-231 permaneceram sob estímulo de D9 (A) e D10 (B) por 24, 48 e 72 horas. A viabilidade foi determinada pelo cálculo da densidade óptica dividido pela média do controle multiplicado por 100. Os níveis de significância $*P \leq 0,05$, $**P \leq 0,01$, $***P \leq 0,001$ e $****P \leq 0,0001$ expressam as diferenças em relação ao controle negativo.

A partir da viabilidade celular foi determinada a concentração inibitória (IC_{50}) com os valores descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Valores de concentração inibitória média (IC_{50}) obtidos a partir dos ensaios de viabilidade celular de D9 e D10 nas linhagens tumorais de mama MCF-7 e MDA-MB-231.

IC50		
D9	MCF-7	MDA-MB-231
24h	46.67	20.84
48h	33.40	20.25
72h	36.14	25.88
D10	MCF-7	MDA-MB-231
24h	-	33.51
48h	-	34.05
72h	-	30.36

5.2. Clonogenicidade das células tumorais tratadas com as guanil-hidrazonas

Uma vez verificada a viabilidade celular, foi realizado o ensaio de clonogenicidade para estudo da proliferação celular. Os resultados mostram que ocorreu uma significativa perda na capacidade de formação de colônias em ambas as linhagens e com ambos os compostos (Figuras 9 e 10). Contudo, é necessário destacar que o composto D9 apresentou uma significativa redução na formação de colônias em ambas as linhagens tumorais, desde a concentração menor de 10 μM , se mantendo nas demais concentrações. O composto D10 demonstrou um comportamento de aumento no potencial de formação de colônias, especialmente na linhagem MCF-7, em suas menores concentrações e redução nas duas maiores concentrações (50 e 100 μM), sendo estes resultados também observados nos registros fotográficos das colônias nas placas (Figuras 11 e 12).

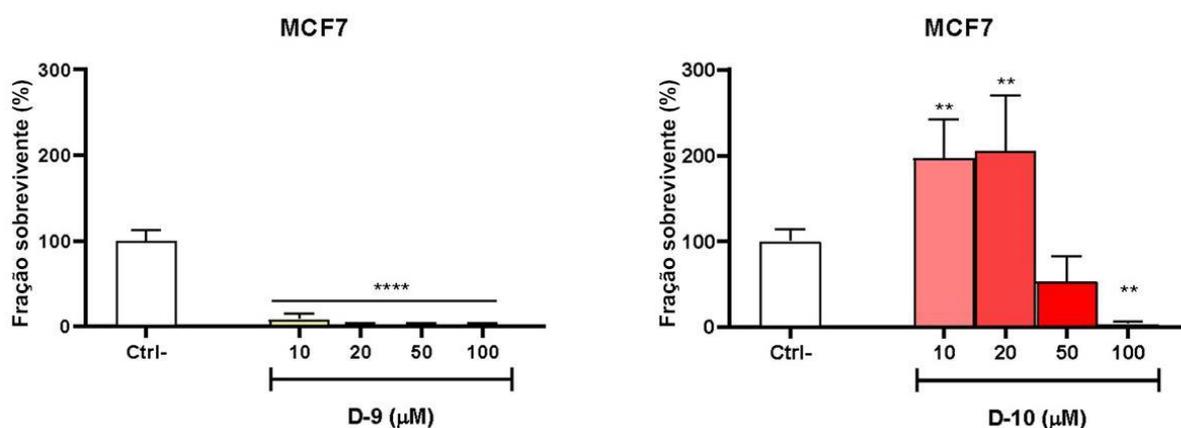


Figura 9. Quantificação do percentual de células sobreviventes na linhagem MCF-7 após o tratamento com D9 e D10 nas concentrações de 10, 20, 50 e 100 μM . * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ e **** $P \leq 0,0001$ em relação ao controle negativo.

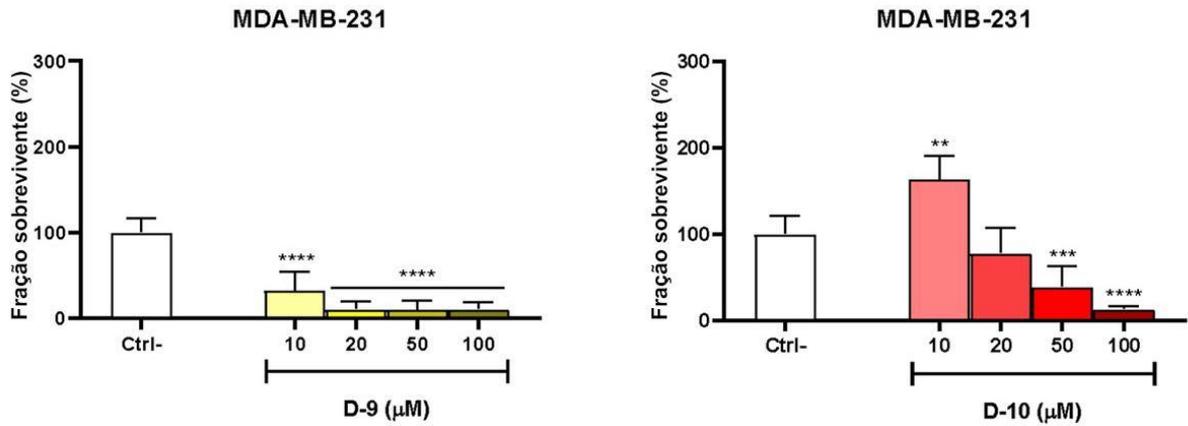


Figura 10. Quantificação do percentual de células sobreviventes na linhagem MDA-MB-231 após o tratamento com D9 e D10 nas concentrações de 10, 20, 50 e 100 μM . * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ e **** $P \leq 0,0001$ em relação ao controle negativo.

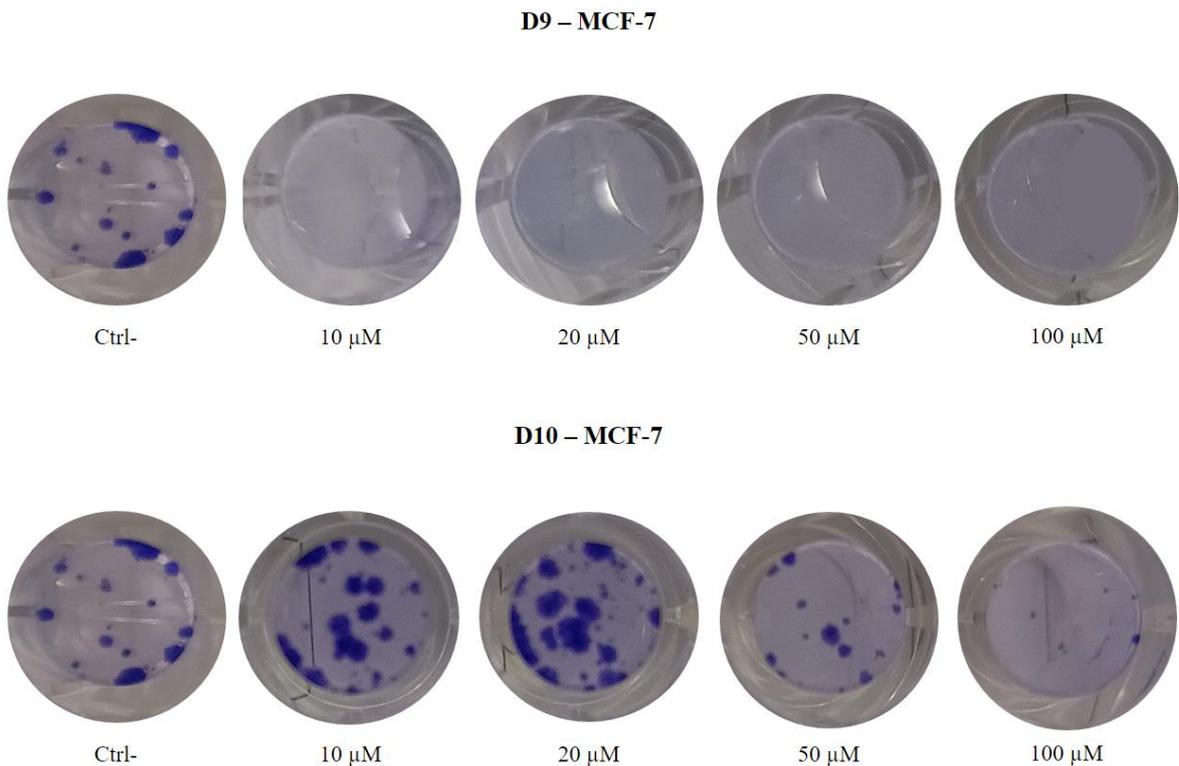


Figura 11. Imagens fotográficas dos poços com a formação das colônias de MCF-7 após os tratamentos com D9 e D10 nas concentrações de 10, 20, 50 e 100 μM . Registros feitos com objetiva de 10x.

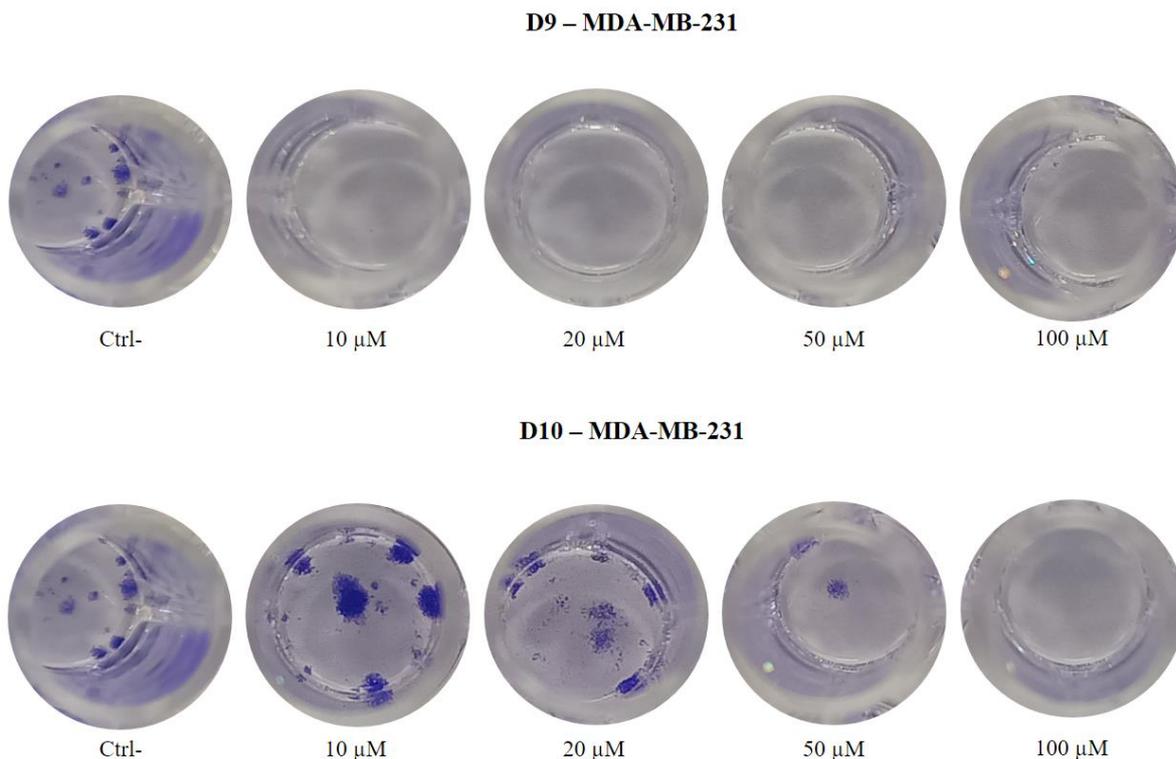


Figura 12. Imagens fotográficas dos poços com a formação das colônias de MDA-MB-231 após os tratamentos com D9 e D10 nas concentrações de 10, 20, 50 e 100 μM . Registros feitos com objetiva de 10x.

5.3. Avaliação da migração celular após o tratamento com as guanil-hidrazonas

Após a realização dos ensaios de viabilidade celular e formação de colônias, foi performedo o ensaio de migração celular por ranhura. Os resultados mostraram que o percentual de fechamento das ranhuras foi distinto entre as linhagens celulares e entre as guanil-hidrazonas. O tempo de execução do ensaio na linhagem MCF-7 diferiu do tempo na linhagem MDA-MB-231, em 48 horas e 72 horas, respectivamente, devido ao tempo de confluência do controle. As tabelas 2 e 3 representam o percentual de migração das células mostrando que ambos os compostos reduzem a capacidade de migração de um modo concentração-dependente.

Em relação ao comportamento das guanil-hidrazonas, o composto D9 apresentou um melhor desempenho na atividade anti-migratória das células. O percentual de fechamento da ranhura da linhagem MCF-7 tratadas com o composto D9 ocorreu nas concentrações de 20-50 μM . Na concentração maior (100 μM), o tratamento com D9 ampliou a ranhura, gerando valores percentuais negativos. Por outro lado, o tratamento com D10, o efeito inibidor da migração celular foi observado nas concentrações que variaram entre 50-100 μM (Tabela 2).

Tabela 2. Percentuais de fechamento de ranhuras para a linhagem MCF-7 após os tratamentos com D9 (A) e D10 (B) nas concentrações de 10, 20, 50 e 100 μM nos tempos de 24 e 48 horas. T0 = Tempo zero; Tf = Tempo final. Dados expressos em Média \pm Desvio Padrão (SD).

A	MCF7	% Fechamento $[(T_0 - T_F / T_0) * 100]$	
		Média \pm SD	
	Tratamento (μM)	24h	48h
	CTRL-	61,39 \pm 12,11	100 \pm 00
	D9 10	64 \pm 8,52	100 \pm 00
	D9 20	38,69 \pm 10,52	89,61 \pm 9,31
	D9 50	26,68 \pm 14,06	32,60 \pm 15,90
	D9 100	-4,44 \pm 1	-31,32 \pm 20,90

B	MCF7	% Fechamento $[(T_0 - T_F / T_0) * 100]$	
		Média \pm SD	
	Tratamento (μM)	24h	48h
	CTRL-	61,39 \pm 12,11	100 \pm 00
	D10 10	53,74 \pm 7,48	100 \pm 00
	D10 20	55 \pm 12,95	100 \pm 00
	D10 50	34,67 \pm 2,72	92,09 \pm 6,92
	D10 100	3,65 \pm 3,88	5,27 \pm 2,67

De forma semelhante, o tratamento da MDA-MB-231 com o composto D9 apresentou redução na migração quando comparado ao controle nas concentrações de 20-50 μM , e a concentração 100 μM ampliou a ranhura com percentuais negativos. O tratamento com D10 tendeu a aumentar a migração celular, com percentual médio de fechamento maior que o controle nas menores concentrações, mas com efeito inibidor nas maiores concentrações (50-100 μM), conforme a tabela 3.

Tabela 3. Percentuais de fechamento de ranhuras para a linhagem MDA-MB-231 após os tratamentos com D9 (A) e D10 (B) nas concentrações de 10, 20, 50 e 100 μM nos tempos de

24, 48 e 72 horas. T₀ = Tempo zero; T_f = Tempo final; Dados expressos em Média ± Desvio Padrão (SD).

A

MDA-MB-231	% Fechamento $[(T_0 - T_f / T_0) * 100]$		
	Média ± SD		
	Tratamento (µM)	24h	48h
CTRL-	35,97 ± 3,24	56,88 ± 1,56	62,74 ± 2,03
D9 10	33,07 ± 2,22	49,97 ± 15,00	55,46 ± 14,26
D9 20	32,35 ± 2,05	41,14 ± 8,80	44,69 ± 9,46
D9 50	-4,99 ± 3,81	-5,89 ± 4,10	-7,87 ± 3,98
D9 100	-3,34 ± 2,40	-4,78 ± 2,63	-5,22 ± 2,02

B

MDA-MB-231	% Fechamento $[(T_0 - T_f / T_0) * 100]$		
	Média ± SD		
	Tratamento (µM)	24h	48h
CTRL-	35,97 ± 3,24	56,88 ± 1,56	62,74 ± 2,03
D10 10	48,37 ± 3,56	71,55 ± 7,03	72,44 ± 15,27
D10 20	46,72 ± 5,93	75,84 ± 5,02	86,08 ± 6,24
D10 50	42,36 ± 5,29	56,12 ± 9,38	51,47 ± 8,73
D10 100	14,85 ± 7,04	14,99 ± 7,97	11,66 ± 7,49

Observando dos registros fotográficos dos poços de tratamento com D9 em MCF-7 e MDA-MB-231 (Figuras 13 e 15), nota-se o efeito anti-migratório, com diferença morfológica das células tumorais em relação ao tratamento comparado com os controles negativos. Os efeitos anti-migratórios de D10 nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 também podem ser observados nas Figuras 12 e 14.

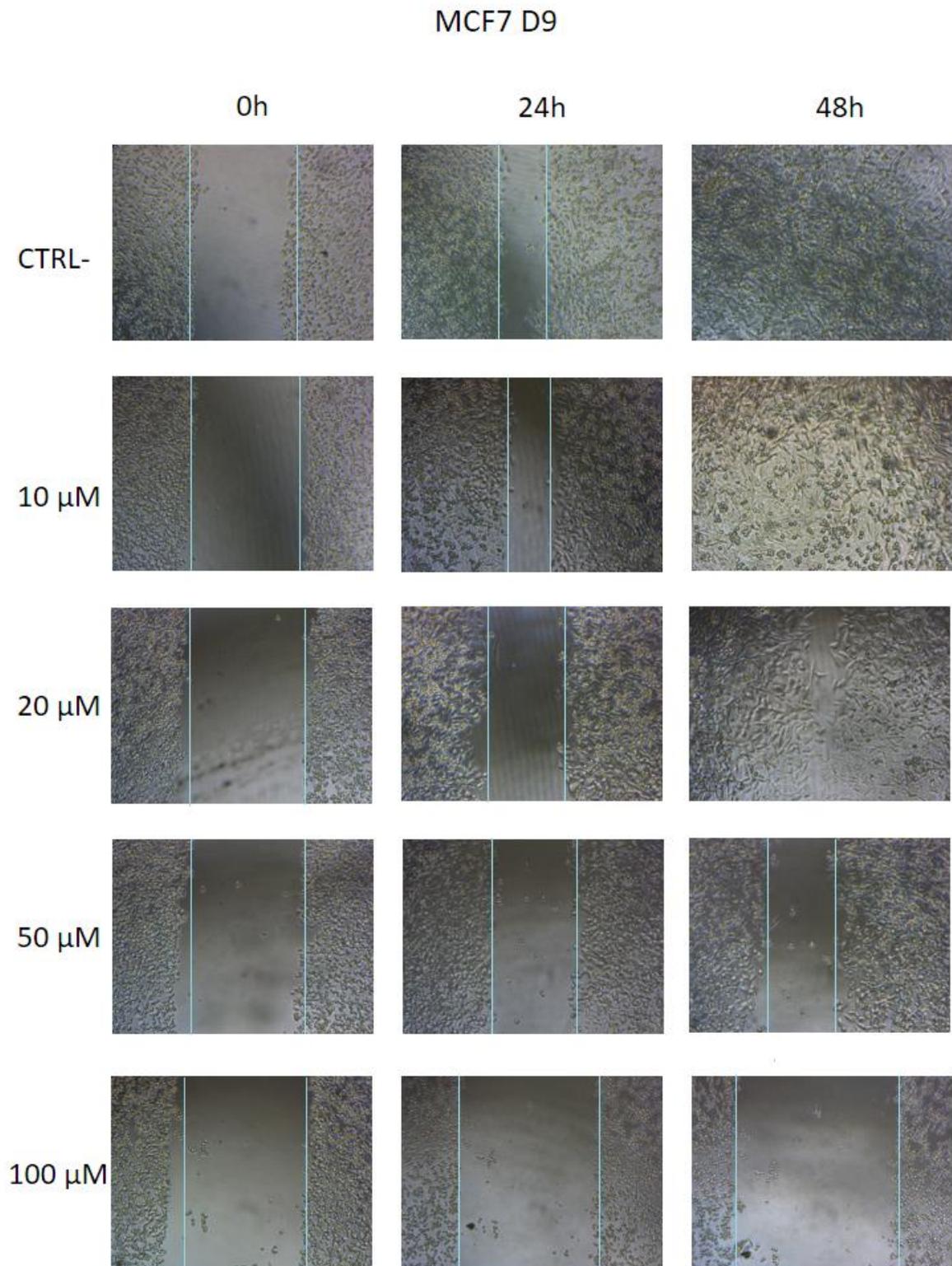


Figura 13. Imagens fotográficas das ranhuras na linhagem MCF-7 com os tempos de 0, 24 e 48 horas nos tratamentos de D9 nas concentrações de 10, 20, 50 e 100 μM . Registros feitos com a objetiva de 10x.

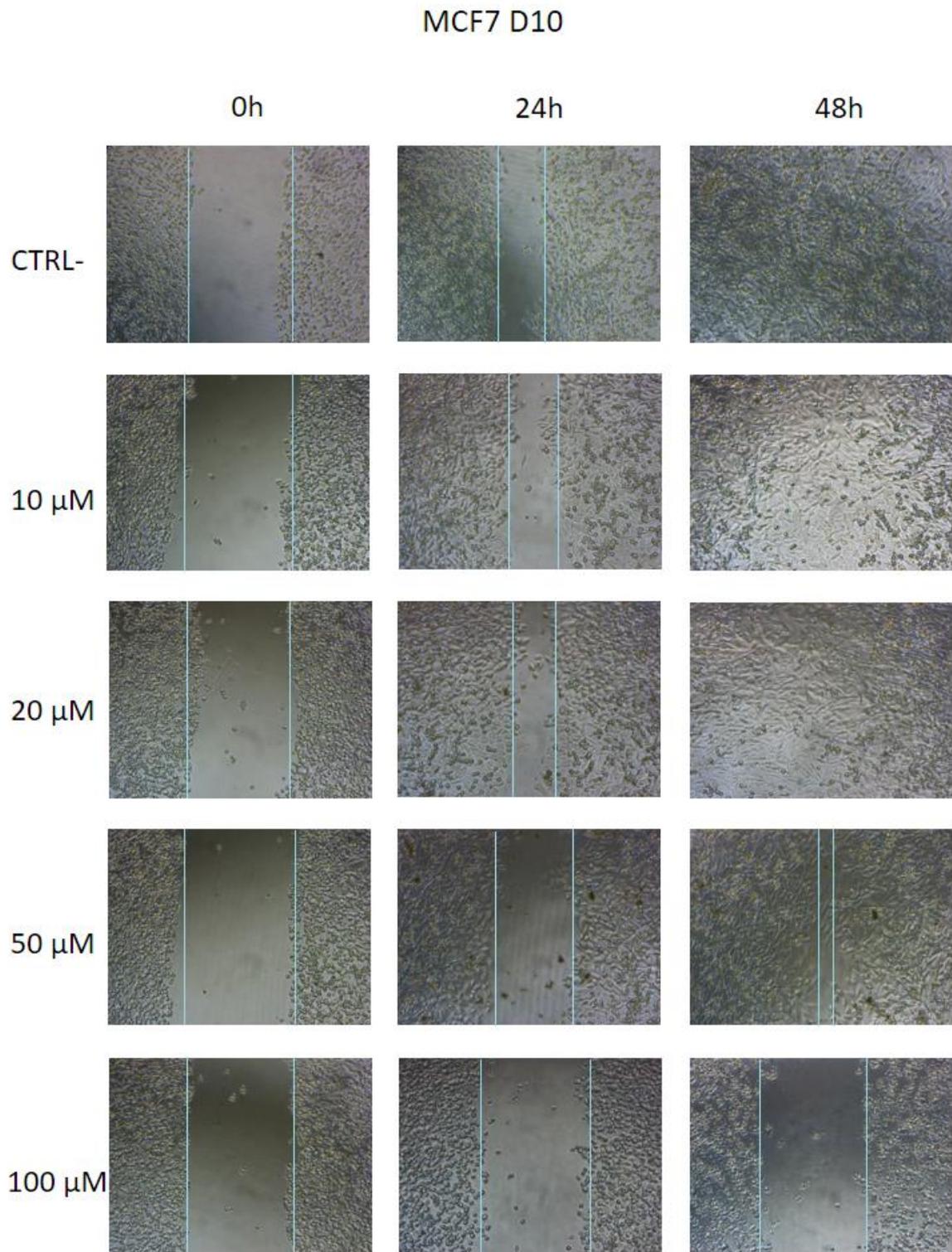


Figura 14. Imagens fotográficas das ranhuras na linhagem MCF-7 com os tempos de 0, 24 e 48 horas nos tratamentos de D10 nas concentrações de 10, 20, 50 e 100 μM . Registros feitos com a objetiva de 10x.

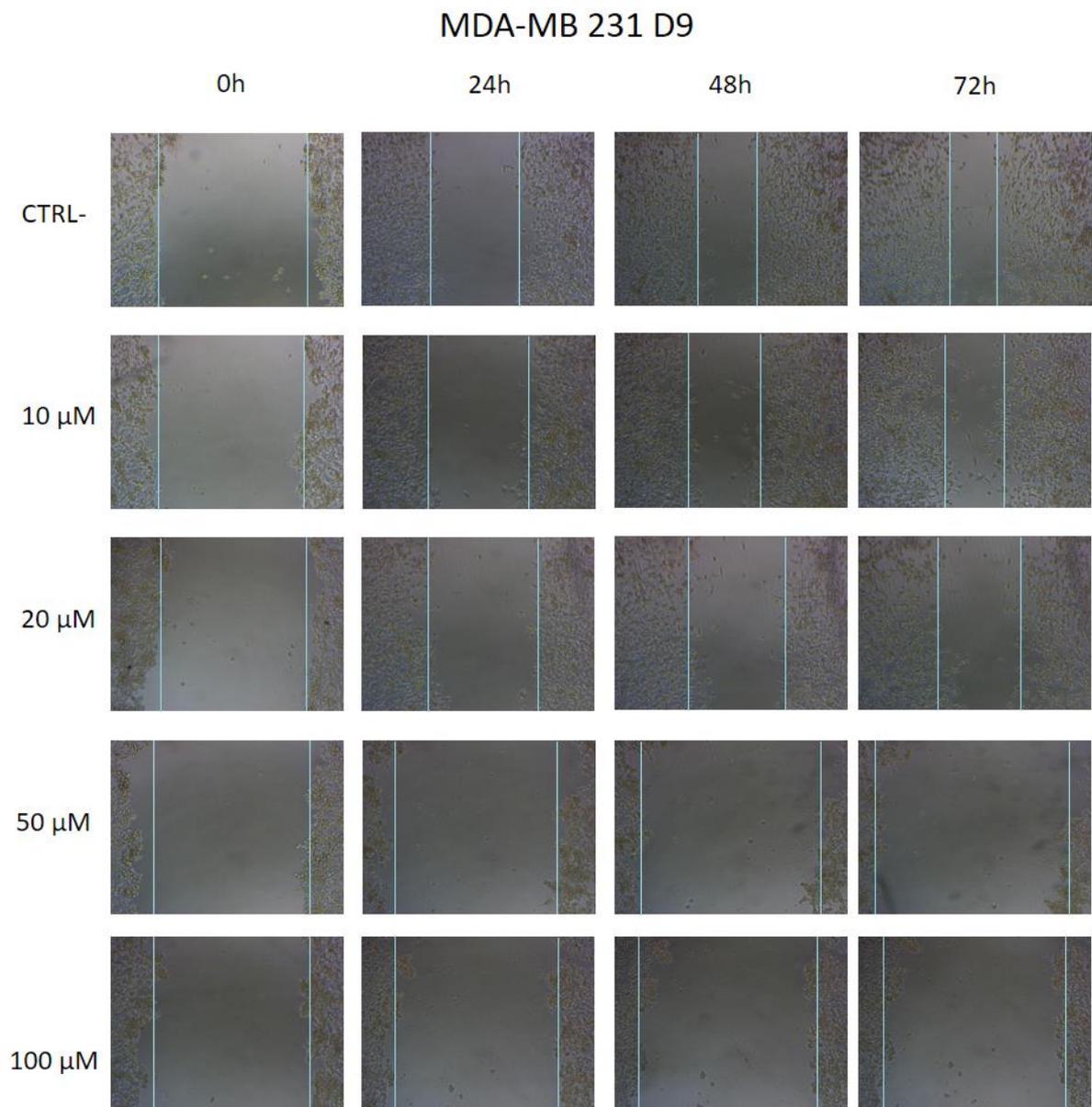


Figura 15. Imagens fotográficas das ranhuras na linhagem MDA-MB-231 com os tempos de 0, 24 e 48 horas nos tratamentos de D9 nas concentrações de 10, 20, 50 e 100 μM . Registros feitos com a objetiva de 10x.

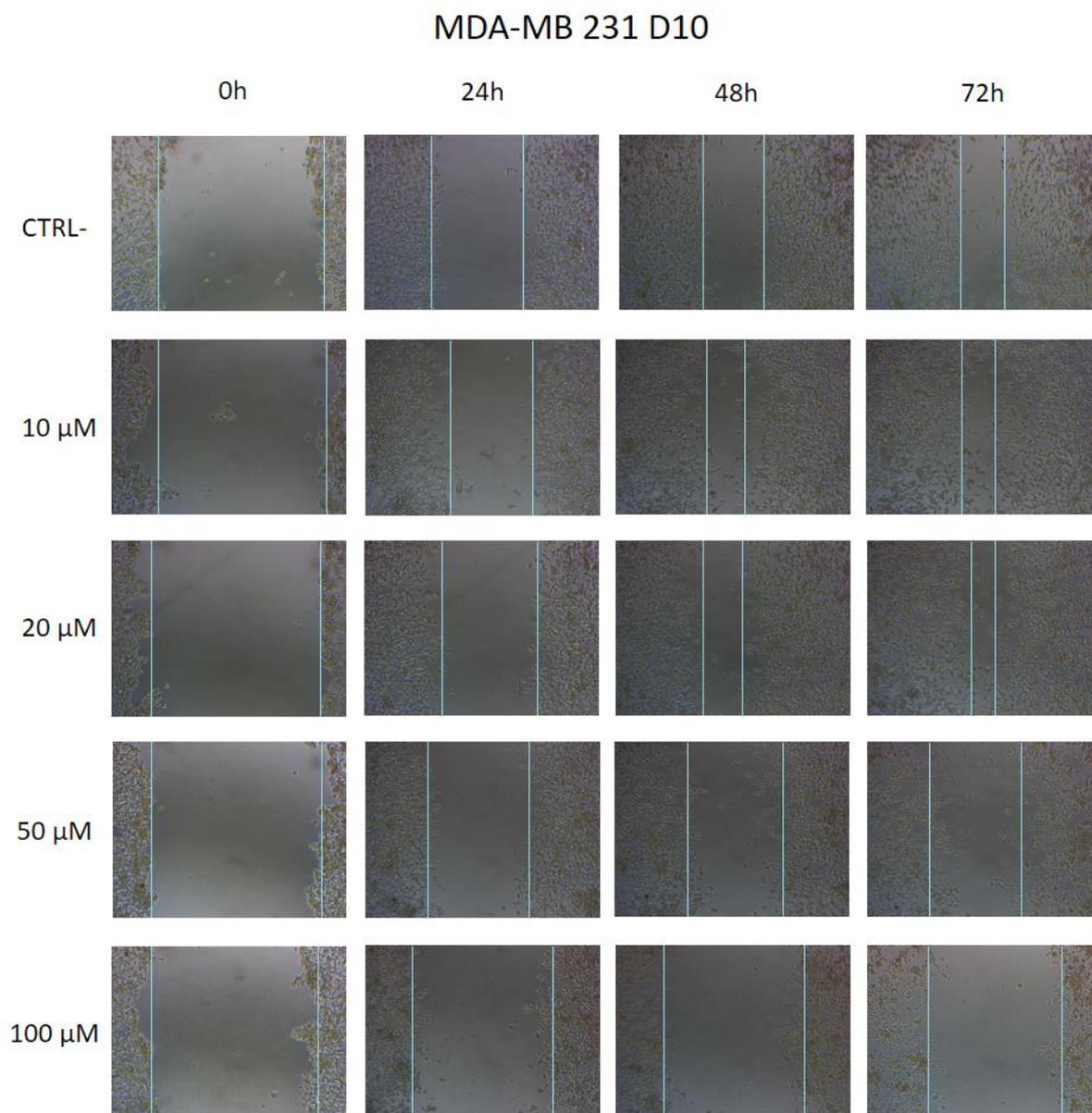


Figura 16. Imagens fotográficas das ranhuras na linhagem MDA-MB-231 com os tempos de 0, 24 e 48 horas nos tratamentos de D10 nas concentrações de 10, 20, 50 e 100 μM . Registros feitos com a objetiva de 10x.

5.4. Avaliação do ciclo celular das células tumorais tratadas com as guanil-hidrazonas

Após determinar o efeito citotóxico e anti-migratório dos compostos D9 e D10, foi avaliado o efeito antiproliferativo através da determinação das fases do ciclo celular. Para este ensaio, as linhagens tumorais foram tratadas com as respectivas concentrações que representaram a metade da IC_{50} e a IC_{50} obtida no ensaio de viabilidade em 48h.

Os resultados indicaram que o comportamento das guanil-hidrazonas D9 e D10 se diferiu muito quanto às fases do ciclo. Na MCF-7, o composto D9 apresentou valores percentuais das fases do ciclo celular semelhantes ao controle negativo, em ambas as concentrações testadas (Figura 17). Enquanto que na MDA-MB-231 foi possível observar uma tendência de redução do percentual na fase G1 e aumento na fase G2, contudo sem diferença estatística para o controle (Figura 18A). O D10 por sua vez não foi diferente, demonstrando também semelhança entre o tratamento e o controle negativo (Figura 18B).

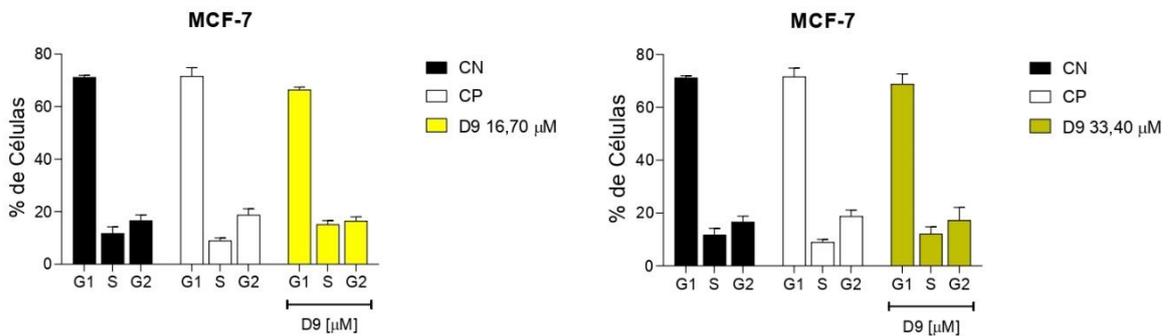


Figura 17. Percentual de células MCF-7 nas fases G1, S e G2 do ciclo celular após o tratamento com D9 nas concentrações de 16,70 e 33,40 μM . * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ e **** $P \leq 0,0001$ em relação ao controle negativo.

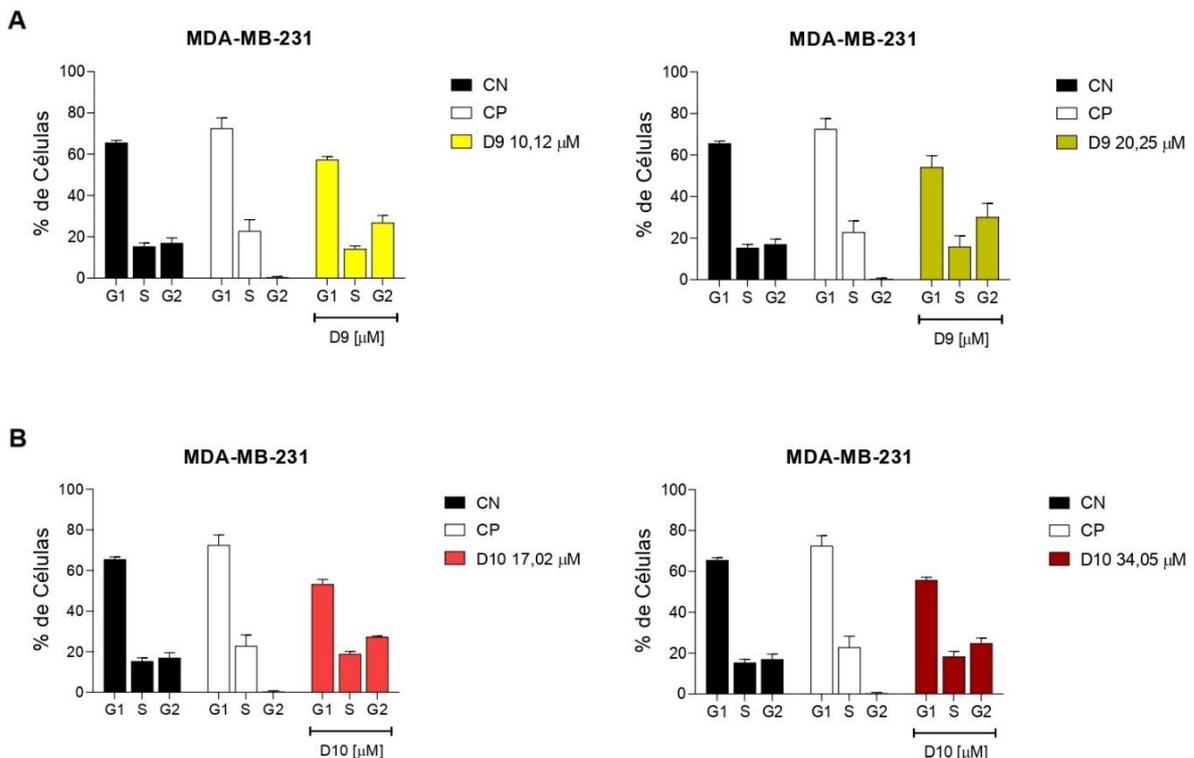
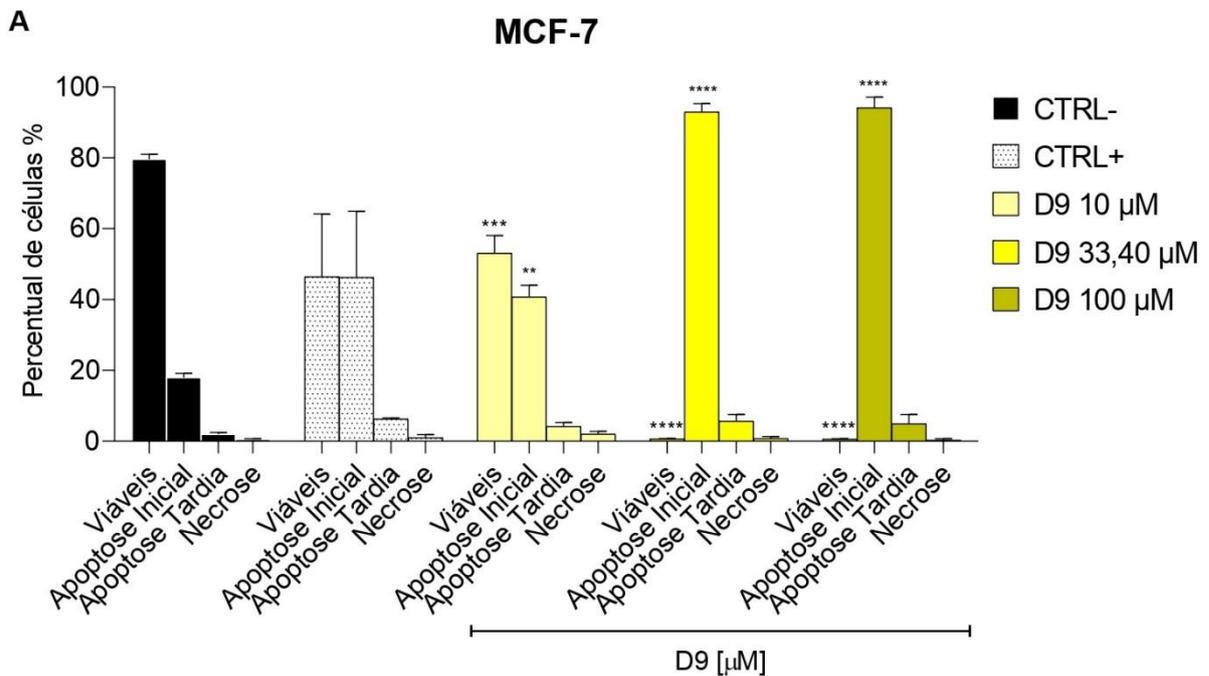


Figura 18. Percentual de células MDA-MB-231 nas fases G1, S e G2 do ciclo celular após os tratamentos com D9 (A) nas concentrações de 10,12 e 20,25 μM e D10 (B) nas concentrações de 17,02 e 34,05 μM . * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ em relação ao controle negativo.

5.5. Avaliação da morte celular após tratamento com as guanil-hidrazonas

Para melhor elucidar o mecanismo antitumoral das guanil-hidrazonas foi realizado o ensaio para avaliação de morte celular por apoptose. O composto D9 reduziu a viabilidade celular e aumentou a frequência de células apoptóticas, com valores acima de 80%, quando tratado a linhagem MCF-7 na concentração inibitória (IC_{50}), e se mantendo na maior concentração (100 μM). A frequência de células necróticas foi próxima de zero (Figura 19A). O composto D10 apresentou menor percentual de células apoptóticas na concentração inibitória média na linhagem MCF-7, quando comparado ao D9. A redução da viabilidade celular, com a elevação do percentual em células apoptóticas foi observado na maior concentração do tratamento com D10 (Figura 19B).



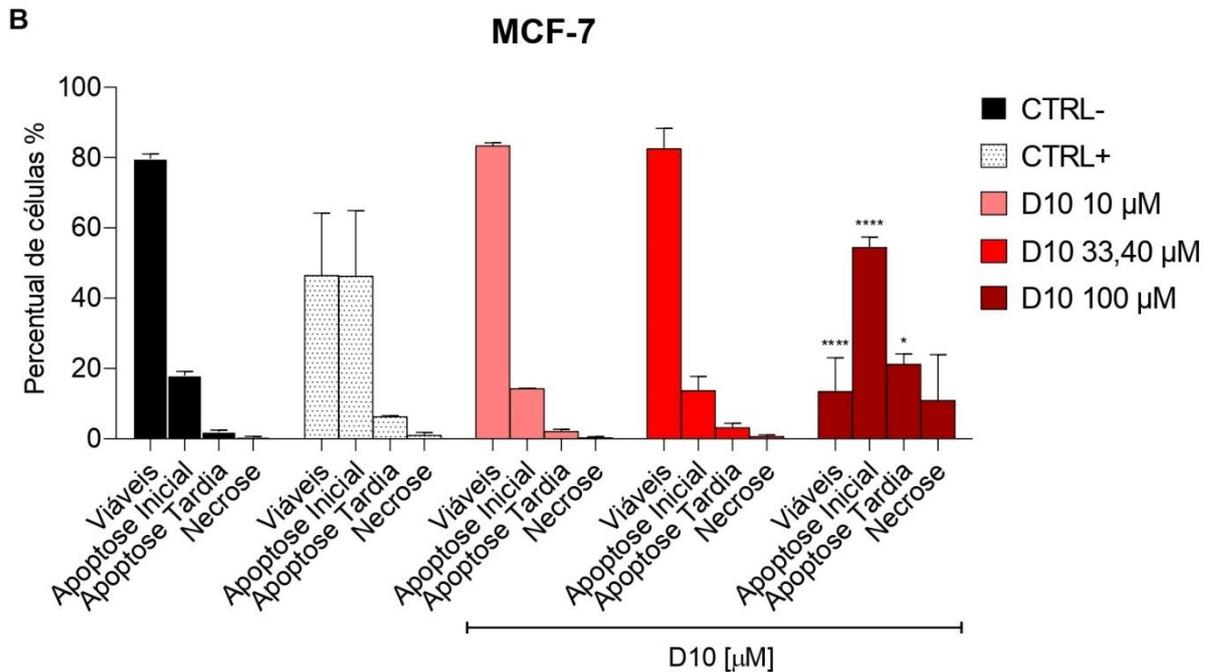


Figura 19. Percentual de células viáveis, em apoptose inicial, apoptose tardia e necrose após os tratamentos com D9 (A) e D10 (B) nas concentrações de 10, 33,40 e 100 μM na linhagem MCF-7. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ e **** $P \leq 0,0001$ em relação ao controle negativo.

Os resultados mostraram que o tratamento com D9 na linhagem MDA-MB-231 apresentaram um aumento da frequência de células em apoptose desde a concentração mais baixa (10 μM), passado pela IC_{50} até a maior concentração testada (100 μM) (Figura 20A). O tratamento com D10 apresentou redução da viabilidade e aumento de células apoptóticas com mais de 60% quando tratado com a IC_{50} e na concentração de 100 μM (Figura 20B).

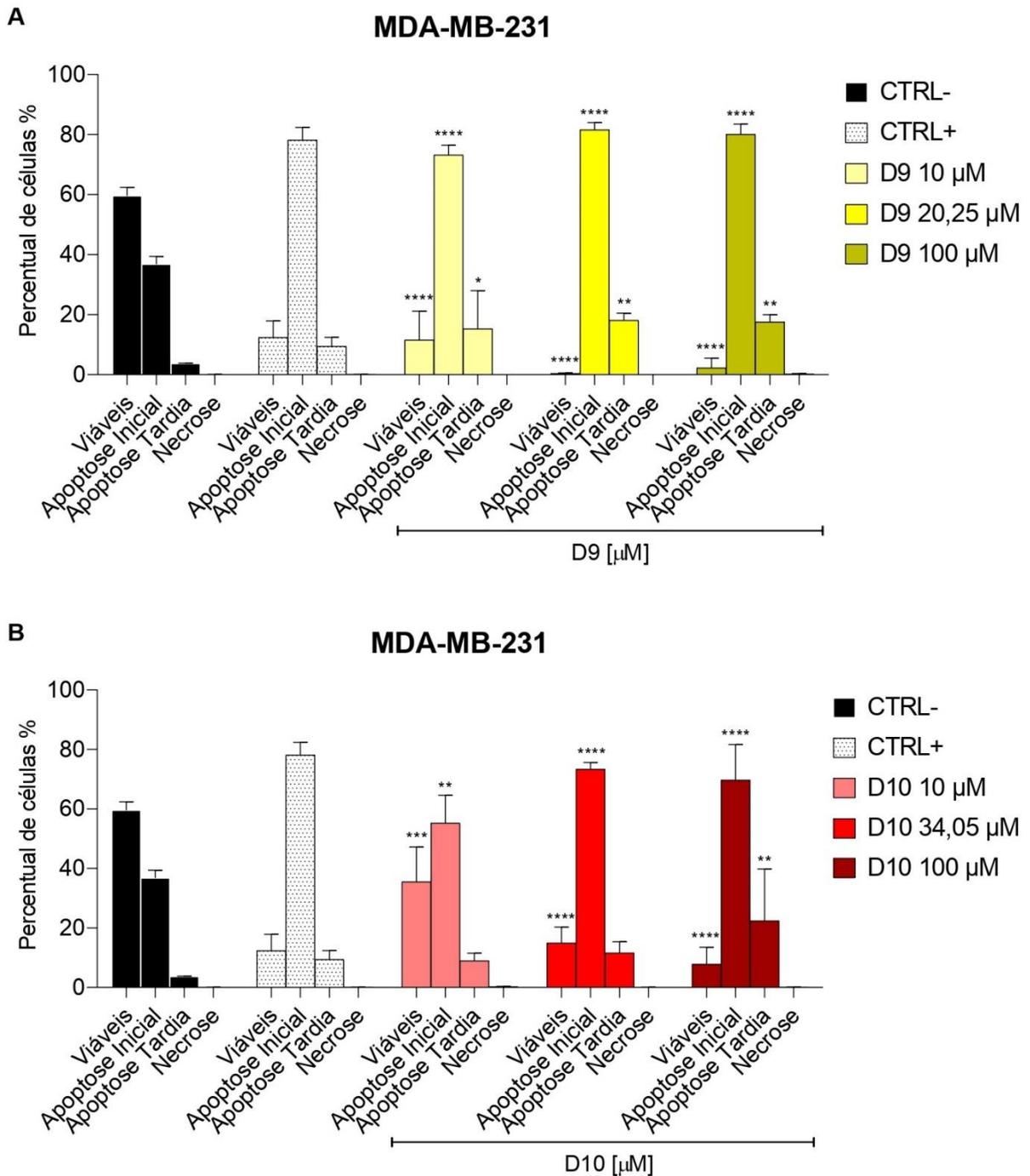


Figura 20. Percentual de células viáveis, em apoptose inicial, apoptose tardia e necrose após os tratamentos com D9 (A) e D10 (B) nas concentrações de 10, 20,25, 34,05 e 100 μM na linhagem MDA-MB-231. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ e **** $P \leq 0,0001$ em relação ao controle negativo.

Assim, as guanil-hidrazonas apresentaram efeitos antitumorais nas duas linhagens de câncer de mama, nos diferentes mecanismos biológicos associados à carcinogênese apresentando potencial terapêutico. A figura abaixo resume os dados encontrados (Figura 21).

		Citotoxicidade	Colônias	Migração	Ciclo celular	Apoptose
MCF-7	D9 	20µM (24-72h)	↓ 10µM	↓ 20µM	= Controle	100% (IC ₅₀)
	D10 	50µM (24-72h)	↓ 100µM	↓ 50µM	Indeterminado	~80% (IC ₅₀)
MDA-MB-231	D9 	20µM (24-72h)	↓ 10µM	↓ 50µM	↑ Fase G2	~80% (IC ₅₀)
	D10 	20µM (24h) 5µM (48hh) 50µM (72h)	↑ 10µM ↓ 100µM	↑ 10µM ↓ 100µM	↑ Fase G2	~70% (IC ₅₀)

Figura 21: Esquema das principais atividades biológicas estudadas nas linhagens de câncer de mama humano MCF-7 e MDA-MB-231 tratadas com as Guanil-Hidrazonas (D9 e D10). Fonte: próprio autor usando software BioRender.

6. DISCUSSÃO

O câncer de mama é uma doença com elevada morbimortalidade na população feminina, apresenta características multifatoriais que culminam em acúmulos de mutações em proto-oncogenes e genes supressores de tumor, que modulam vias celulares indutoras da proliferação e/ou bloqueio dos mecanismos de morte celular (OSBORNE; WILSON; TRIPATHY, 2004). Dentre as vias moleculares envolvidas na carcinogênese mamária, a sinalização colinérgica não nervosa tem sido estudada como um possível alvo molecular (CHENG *et al.*, 2008; JIMÉNEZ; MONTIEL, 2005; RUSSO *et al.*, 2014; SONG *et al.*, 2003). Neste contexto, as guanil-hidrazonas identificadas como guanil-hidrazona de fenantrenoquinona (10-(2-(diaminomethyl)hydrazineylidene)phenanthren-9(10H)-one) (D10) e acridinona (5,7-dibromo-3,3-dimethyl-3,4-idroacridin-1-(2H)-one) (D9) apresentaram atividade anticolinesterásica, sendo estudadas como potenciais drogas antitumorais.

Inicialmente as guanil-hidrazonas foram avaliadas quanto sua citotoxicidade. O composto D9 mostrou maior capacidade citotóxica que D10 nas duas linhagens testadas. A concentração inibitória do composto D9 foi menor em todos os tempos testados e nas duas linhagens, quando comparado ao D10. As guanil-hidrazonas foram descritas como

anticolinesterásicas (FERREIRA NETO *et al.*, 2017), sendo que, moléculas anticolinesterásicas também apresentam capacidade de modular os receptores colinérgicos (GERRETSEN; POLLOCK, 2011). Considerando que os dois compostos estudados apresentaram, através de estudos de modelagem molecular, a capacidade de interação com a enzima (FERREIRA NETO *et al.*, 2017), ambos foram testados nas linhagens de câncer de mama humano para determinação da citotoxicidade. Conforme o estudo prévio de modelagem molecular, o composto D9 apresenta maior interação, ligando com resíduos de aminoácidos do sítio catalítico da colinesterase, apresentando maior afinidade quando comparado ao D10 (FERREIRA NETO *et al.*, 2017). Assim, mesmo sendo os dois compostos potencialmente antitumorais, possíveis particularidades nas moléculas podem favorecer uma interação maior pelo composto D9 em receptores colinérgicos, conferindo maior citotoxicidade.

Quando analisado o efeito entre as linhagens, a MCF-7 apresentou maior resistência quando tratada com D9, com concentrações inibitórias médias maiores em todos os tempos, se comparada com a MDA-MB-231. Por outro lado, na linhagem MDA-MB-231, o composto D10 foi mais eficiente em reduzir a viabilidade celular após 72h de tratamento. A linhagem MCF-7 expressa receptor de estrógeno, diferente da linhagem MDA-MB-231 considerada triplo negativa (DAI *et al.*, 2017), sendo estudada a relação sinérgica da sinalização estrogênica e nicotínica, na qual a expressão do receptor nicotínico $\alpha 9$ ($\alpha 9nAChR$) é regulada por ERs e a ativação $\alpha 9nAChRs$ induz as vias de sinalização PI3K, Akt e MAPK estimulando ERs (LEE *et al.*, 2010).

A presença $\alpha 9$ -nAChR é apontado como um importante mediador na carcinogênese induzida pela nicotina nas células epiteliais normais da mama humana (HO; LEE; WU, 2011; HUANG *et al.*, 2017) ativando as vias das MAPK (JNK, P38 e ERK1/2) induzindo os mecanismos proliferativos e bloqueando as vias pró-apoptóticas (ESPAÑOL *et al.*, 2022). Lee *et al.* (2010) mostraram que a expressão do $\alpha 9$ -nAChR foi maior em quase todos os tecidos tumorais de pacientes com câncer de mama, em comparação com os tecidos normais, e em linhagens tumorais de mama, incluindo MDA-MB-231 e MCF-7 (LEE *et al.*, 2010). A presença deste receptor nas duas linhagens sugere que as guanil-hidrazonas atuam na inibição da sinalização mediado por receptores nicotínicos, resultando nos efeitos citotóxicos.

Aprofundando o comportamento citotóxico das guanil-hidrazonas na viabilidade celular foi realizado o ensaio de colônia, que demonstra a capacidade de sobrevivência e proliferação de células *in vitro* (BRIX *et al.*, 2021), analisando sob outra perspectiva o potencial citotóxico dos compostos, já que no ensaio de MTT a viabilidade é inferida através da fosforilação

oxidativa (SUPINO, 1995). Os resultados mostraram que o composto D9 reduziu a capacidade proliferativa de células viáveis quando comparado com controle negativo. Tanto na linhagem MCF-7 como na linhagem MDA-MB-231, o composto D9 reduziu a formação de colônias desde a menor concentração testada de 10 μ M. Os resultados obtidos pelos ensaios de citotoxicidade corroboram entre si, sugerindo que o composto D9 induz maior morte celular resultando em um número menor de células viáveis capazes de reduzir o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (ensaio do MTT) ou formar colônias (ensaio clonogênico).

Por outro lado, o composto D10 apresentou um comportamento gaussiano no qual as concentrações menores parecem induzir a formação de colônias e, com o aumento da concentração, o efeito passa a ser inibitório, nas duas linhagens. A presença de mais de um subtipo de receptor ao qual o ligante apresenta afinidade diferente ocasionando mudança no efeito em diferentes concentrações (CONSOLINI, 2017). A presença de diferentes receptores nicotínicos nas células tumorais de mama (DAI *et al.*, 2017) pode explicar o efeito do D10 tanto na MCF-7, como na MDA-MB-231.

Seguindo os estudos associados à biologia celular, o ensaio de migração determina o potencial do tratamento em modular a capacidade de movimentação da célula individual ou coletivo que, no caso de linhagens tumorais, é associada ao mecanismo de metástase (BOUCHALOVA; BOUCHAL, 2022). Os resultados mostraram que, após o tratamento, o composto D9 reduziu a migração em concentrações menores que o D10. O tratamento com o D9, principalmente nas maiores concentrações, aumentou o tamanho da ranhura sugerindo uma toxicidade com perda da viabilidade celular, não apenas redução da migração.

O mecanismo de migração é definido pelo movimento de deslizamento determinado pelo dinamismo dos elementos do citoesqueleto mediados por sinais extracelulares quimiotáticos (KRAKHMAL *et al.*, 2015). Quando se compara as linhagens, o composto D9 reduziu a migração em concentrações menores na linhagem MCF-7, quando comparado com a MDA-MB-231. Enquanto que o composto D10 apresentou um efeito antimigratório em concentrações semelhantes nas duas linhagens. No câncer foi descrito que a ativação dos receptores colinérgicos nicotínicos afeta a proliferação celular, a apoptose, a angiogênese e proteínas de transição epitélio-mesenquimal (EMT), suportando um fenótipo pró-invasivo (ADAMS *et al.*, 2002; NOUR *et al.*, 2021). No mecanismo de movimentação coletiva, comum no mecanismo de metástase, a EMT é um mecanismo conservado que determina alterações morfológicas para a migração. O aumento da expressão de EMT em linhagem MCF-7 (MCF-

7-EMT) apresentou uma invasão significativamente maior em contraste com as células MCF-7 com aumento de proteínas (ZIEGLER *et al.*, 2014). Os resultados na viabilidade, proliferação e migração sugerem que as guanil-hidrazonas modulam receptores comuns nas linhagens, mas que não expressos da mesma forma e na mesma afinidade.

Um dos mecanismos que induzem a morte celular por apoptose é desencadeado pela parada do ciclo celular (VERMEULEN; BERNEMAN; VAN BOCKSTAELE, 2003). Para verificar a capacidade das guanil-hidrazonas em causar efeito na redução da capacidade proliferativa, foi avaliado o ciclo celular. O tratamento com os compostos D9 e D10 apresentaram redução do número total de células. Entretanto, a frequência das fases do ciclo celular mostrou um aumento da frequência de G2 nas duas linhagens quando tratadas com D10. A fase G2, corresponde ao intervalo entre a síntese de DNA e a divisão celular, e a parada nesta fase é induzida por danos no DNA que convergem na ativação do p53 que induz a célula à apoptose (JHOU *et al.*, 2021; PIETENPOL; STEWART, 2002; SHENDGE *et al.*, 2020).

Investigando o mecanismo de morte observado nos ensaios anteriores, foi realizada a avaliação dos mecanismos de apoptose nas linhagens tumorais tratadas com as guanil-hidrazonas. O tratamento com D9 induziu apoptose nas duas linhagens, enquanto que o composto D10 apresentou efeitos apoptóticos inferiores quanto a frequência de células apoptóticas tratadas na concentração inibitória média.

Quando comparadas às linhagens, a linhagem MCF-7 apresentou maior sensibilidade ao D9, se aproximando a 100% de células apoptóticas, diferentemente ao D10, que se mostrou resistente com menos de 20% de células apoptóticas. Por outro lado, a linhagem MDA-MB-231 se mostrou sensível ao tratamento com os dois compostos, de forma semelhante.

A especificidade deste mecanismo pode ser associada à afinidade da estrutura de D9, que sugere atuar em vários alvos moleculares, comuns nas duas linhagens tumorais. A linhagem MCF-7 mostra uma resistência ao tratamento com D10, que não foi observada com a linhagem MDA-MB-231, sugerindo que os ERs podem ser antagonizados pelo D9, inibindo os efeitos proliferativos na MCF-7, que o D10 não foi capaz de modular. Além disso, a exposição prolongada ao estrogênio aumenta significativamente a expressão do $\alpha 9$ -nAChR, induzindo um ciclo a favor da proliferação e da redução da apoptose (HO; LEE; WU, 2011). Assim, a associação positiva entre essas vias de sinalização pode sugerir um mecanismo um mecanismo sinérgico, explicando a maior citotoxicidade do D9 quando comparado ao D10.

Na linhagem MDA-MB-231, ambos os compostos apresentaram mecanismos pró-apoptóticos semelhantes, parecendo ter uma ação mais precoce por apresentar maior percentual de apoptose tardia. Em um estudo de expressão diferencial de receptores nicotínicos entre as linhagens MCF- e MDA-MB-231 mostrou que a expressão de $\alpha 3$ -nAChR (7x), $\alpha 4$ -nAChR (2x), $\alpha 9$ -nAChR (30x), $\alpha 10$ -nAChR (2x) e $\beta 3$ -nAChR (9x) foram maiores na linhagem triplo negativa (SUN *et al.*, 2020). Assim, mesmo que as duas linhagens expressem receptores nicotínicos, a sua maior presença na MDA-MB-231 pode explicar sua maior sensibilidade para as duas guanil-hidrazonas, quando comparado com a MCF-7. Na perspectiva da atividade dos compostos, o D9 parece ter um efeito inespecífico para uma via de sinalização, considerando a intensidade do efeito citotóxico em concentrações menores, enquanto que o D10 parece atuar em alvos mais seletivos, a depender da concentração e das linhagens testadas.

7. CONCLUSÃO

No presente estudo foi possível observar o efeito de duas guanil-hidrazonas (D9 e D10) na viabilidade celular, proliferação, migração e indução de morte celular por apoptose nas linhagens tumorais de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231. A julgar pelos resultados apresentados podemos concluir que esses dois compostos possuem uma significativa atividade antitumoral, demonstrando um potencial citotóxico, antiproliferativo, anti-migratório e pró-apoptótico em células tumorais de mama. No entanto, é necessário reiterar que mais ensaios são necessários a fim de explorar a completa capacidade desses dois novos compostos.

8. REFERÊNCIAS

ABADI, A. H.; EISSA, A. A. H.; HASSAN, G. S. Synthesis of Novel 1,3,4-Trisubstituted Pyrazole Derivatives and Their Evaluation as Antitumor and Antiangiogenic Agents.

Chemical And Pharmaceutical Bulletin, v. 51, n. 7, p. 838-844, 2003.

ADAMS, C. E.; BROIDE, R. S.; CHEN, Y.; WINZER-SERHAN, U. H.; A HENDERSON, T.; LESLIE, F. M.; FREEDMAN, R. Development of the $\alpha 7$ nicotinic cholinergic receptor in rat hippocampal formation. **Developmental Brain Research**, v. 139, n. 2, p. 175-187, 2002.

ALAM, M. *et al.* A review exploring biological activities of hydrazones. **Journal Of Pharmacy And Bioallied Sciences**, v. 6, n. 2, p. 69, 2014.

ALMEIDA, V. M.; BEZERRA JUNIOR, M. A.; NASCIMENTO, J. C.; AMORIM, L. M. F. Anticancer drug screening: standardization of in vitro wound healing assay. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 55, n. 6, p. 606-619, 2019.

AMARAL, J. R.; BLANZ, E. J.; FRENCH, F. A. Antimalarial activity of guanylhyazone salts of aromatic ketones. I. Active substituent patterns. **Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 21-25, 1969.

ANDREANI, A. *et al.* Imidazo[2,1-b]thiazole guanylhyazones as RSK2 inhibitors. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 4311-4323, 2011.

ANDREANI, A. *et al.* New Antitumor Imidazo[2,1-b]thiazole Guanylhyazones and Analogues1. **Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 4, p. 809-816, 2008.

ANDREANI, A. *et al.* Potential Antitumor Agents. 37. Synthesis and Antitumor Activity of Guanylhyazones from Imidazo[2,1-b]thiazoles and from the New Heterocyclic System Thiazolo[2',3': 2,3]imidazo[4,5-c]quinoline. **Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3085-3089, 2005.

BECKMANN, J.; LIPS, K. S. The Non-Neuronal Cholinergic System in Health and Disease. **Pharmacology**, v. 92, n. 5-6, p. 286-302, 2013.

BOUCHALOVA, P.; BOUCHAL, P. Current methods for studying metastatic potential of tumor cells. **Cancer Cell International**, v. 22, n. 1, p. 1-22, 2022.

BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

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**, p. 1-35, 2024.

BRITO, F. C. F. *et al.* Novel thienylacylhyazone derivatives inhibit platelet aggregation through cyclic nucleotides modulation and thromboxane A2 synthesis inhibition. **European Journal Of Pharmacology**, v. 638, n. 1-3, p. 5-12, 2010.

BRIX, N.; SAMAGA, D.; BELKA, C.; ZITZELSBERGER, H.; LAUBER, K. Analysis of clonogenic growth in vitro. **Nature Protocols**, v. 16, n. 11, p. 4963-4991, 2021.

BRUM, J. O. C. **SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS FÁRMACOS PARA A DOENÇA DE ALZHEIMER**. 2016. 186 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Departamento de Ciência e Tecnologia, Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2016.

CHEN, J. *et al.* Acetylcholine receptors: Key players in cancer development. **Surgical Oncology**, v. 31, p. 46-53, 2019.

CHENG, K. *et al.* Acetylcholine release by human colon cancer cells mediates autocrine stimulation of cell proliferation. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 295, n. 3, p. 591–597, 2008.

CHENG, Y. *et al.* Blood-Brain Barrier Permeable Gold Nanoparticles: an efficient delivery platform for enhanced malignant glioma therapy and imaging. **Small**, v. 10, n. 24, p. 5137-5150, 2014.

COCCO, M. T.; CONGIU, C.; LILLIU, V.; ONNIS, V. Synthesis and in vitro antitumoral activity of new hydrazinopyrimidine-5-carbonitrile derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 2, p. 366-372, 2006.

CONSOLINI, A. E. Interacción fármaco-receptor y farmacodinamia cuantitativa. In: CONSOLINI, Alicia E.; RAGONE, María Inés. **Farmacodinamia general e interacciones medicamentosas: mecanismos de acción de fármacos y metodologías de estudio experimental**. Buenos Aires: Editorial de La Universidad de La Plata, 2017. Cap. 6. p. 113-141.

CORDEIRO, R. *et al.* Synthesis and in vitro antifungal activity of isoniazid-derived hydrazones against *Coccidioides posadasii*. **Microbial Pathogenesis**, v. 98, p. 1-5, 2016.

CUNHA, S. *et al.* Guanylation of thiosemicarbazones: a new synthetic route to polysubstituted guanylhydrazones with antimicrobial activity. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 4, p. 627-634, 2009.

DAI, X.; CHENG, H.; BAI, Z.; LI, J. Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. **Journal Of Cancer**, v. 8, n. 16, p. 3131-3141, 2017.

DAI, X.; XIANG, L.; LI, T.; BAI, Z. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. **Journal Of Cancer**, v. 7, n. 10, p. 1281-1294, 2016.

DASGUPTA, P. *et al.* Nicotine inhibits apoptosis induced by chemotherapeutic drugs by up-regulating XIAP and survivin. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 103, n. 16, p. 6332-6337, 2006.

DEMIRBAS, N.; KARAOGLU, S. A.; DEMIRBAS, A.; SANCAK, K. Synthesis and antimicrobial activities of some new 1-(5-phenylamino-[1,3,4]thiadiazol-2-yl)methyl-5-oxo-[1,2,4]triazole and 1-(4-phenyl-5-thioxo-[1,2,4]triazol-3-yl)methyl-5-oxo-[1,2,4]triazole derivatives. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 9, p. 793-804, 2004.

DIMMOCK, J. R.; VASHISHTHA, S. C.; STABLES, J. P. Anticonvulsant properties of various acetylhydrazones, oxamoylhydrazones and semicarbazones derived from aromatic and unsaturated carbonyl compounds. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 2, p. 241-248, 2000.

DZOBO, K.; SENTHEBANE, D. A.; DANDARA, C. The Tumor Microenvironment in Tumorigenesis and Therapy Resistance Revisited. **Cancers**, v. 15, n. 2, p. 376, 2023.

EGLLEN, R. M. Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. **Autonomic & Autacoid Pharmacology**, v. 26, n. 3, p. 219-233, 2006.

ESPAÑOL, A.; SANCHEZ, Y.; SALEM, A.; OBREGON, J.; SALES, M. E. Nicotinic receptors modulate antitumor therapy response in triple negative breast cancer cells. **World Journal Of Clinical Oncology**, v. 13, n. 6, p. 505-519, 2022.

ESPAÑOL, A. J.; LATORRE, E.; FISZMAN, G. L.; SALES, M. E. Role of non-neuronal cholinergic system in breast cancer progression. **Life Sciences**, v. 80, n. 24-25, p. 2281-2285, 2007.

FAULKNER, S.; JOBLING, P.; MARCH, B.; JIANG, C. C.; HONDERMARCK, H. Tumor Neurobiology and the War of Nerves in Cancer. **Cancer Discovery**, v. 9, n. 6, p. 702-710, 2019.

FERREIRA NETO, D. C. *et al.* A new guanylylhydrazone derivative as a potential acetylcholinesterase inhibitor for Alzheimer's disease: synthesis, molecular docking, biological evaluation and kinetic studies by nuclear magnetic resonance. **Rsc Advances**, v. 7, n. 54, p. 33944-33952, 2017.

FOULKES, W. D.; SMITH, I. E.; REIS-FILHO, J. S. Triple-Negative Breast Cancer. **New England Journal Of Medicine**, v. 363, n. 20, p. 1938-1948, 2010.

FRANÇA, P. H. B. *et al.* Preliminary in vitro evaluation of the anti-proliferative activity of guanylhydrazone derivatives. **Acta Pharmaceutica**, v. 66, n. 1, p. 129-137, 2016.

FRANKEN, N. A. P.; RODERMOND, H. M.; STAP, J.; HAVEMAN, J.; VAN BREE, C. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315-2319, 2006.

GARCIA-MARTINEZ, L. *et al.* Epigenetic mechanisms in breast cancer therapy and resistance. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1-14, 2021.

GERRETSEN, P.; POLLOCK, B. G. Drugs with anticholinergic properties: a current perspective on use and safety. **Expert Opinion On Drug Safety**, v. 10, n. 5, p. 751-765, 2011.

GLOBAL CANCER OBSERVATORY. **Cancer TODAY**: Incidence/Mortality, Both sexes, in 2022. Disponível em:
https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/tables?mode=population&group_populations=0&multiple_populations=1&types=0. Acesso em: 19 fev. 2024.

GUIMARÃES, D. G.; ROLIM, L.; GONSALVES, A.; ARAÚJO, C. R. M. Biological Potential of Synthetic Hydrazones in the Last Decade: A Systematic Review. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 9, p. 2551-2592, 2017.

GUO, L. *et al.* Breast cancer heterogeneity and its implication in personalized precision therapy. **Experimental Hematology & Oncology**, v. 12, n. 1, p. 1-27, 2023.

GÜRSOY, A. Synthesis and primary cytotoxicity evaluation of 3-[[[(3-phenyl-4(3H)-quinazolinone-2-yl)mercaptoacetyl]hydrazono]-1H-2-indolinones. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 38, n. 6, p. 633-643, 2003.

GÜRSOY, A.; GÜZELDEMIRCI, N. U. Synthesis and primary cytotoxicity evaluation of new imidazo[2,1-b]thiazole derivatives. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 3, p. 320-326, 2007.

HAMPEL, H. *et al.* The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. **Brain**, v. 141, n. 7, p. 1917-1933, 2018.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: new dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HO, T. N. T. *et al.* Structure-Function of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Inhibitors Derived From Natural Toxins. **Frontiers in Neuroscience**, v. 14, n. 609005, p. 1-23, 2020.

HO, Y.; LEE, C.; WU, C. The Alpha 9-Nicotinic Acetylcholine Receptor Serves as a Molecular Target for Breast Cancer Therapy. **Journal Of Experimental & Clinical Medicine**, v. 3, n. 6, p. 246-251, 2011.

HUANG, L. *et al.* Nicotinic Acetylcholine Receptor Subtype Alpha-9 Mediates Triple-Negative Breast Cancers Based on a Spontaneous Pulmonary Metastasis Mouse Model. **Frontiers In Cellular Neuroscience**, v. 11, p. 1-14, 2017.

HUSSAIN, I.; ALI, A. Exploring the Pharmacological Activities of Hydrazone Derivatives: A Review. **J Phytochemistry Biochem**, v. 1, n. 1, p. 1-5, 2017.

HUYNH, M. *et al.* RSK2: a promising therapeutic target for the treatment of triple-negative breast cancer. **Expert Opinion On Therapeutic Targets**, v. 24, n. 1, p. 1-5, 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.
Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Coordenação de Ensino, 2023. 160 p.

ISHII, M.; KURACHI, Y. Muscarinic Acetylcholine Receptors. **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, n. 28, p. 3573-3581, 2006.

JACK, I. D.; SHAW, A. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 15, p. 81-94, 2018.

JHOU, A. *et al.* Chlorpromazine, an antipsychotic agent, induces G2/M phase arrest and apoptosis via regulation of the PI3K/AKT/mTOR-mediated autophagy pathways in human oral cancer. **Biochemical Pharmacology**, v. 184, p. 114403, 2021.

JIMÉNEZ, E.; MONTIEL, M. Activation of MAP kinase by muscarinic cholinergic receptors induces cell proliferation and protein synthesis in human breast cancer cells. **Journal Of Cellular Physiology**, v. 204, n. 2, p. 678-686, 2005.

JIN, L. *et al.* Synthesis, structure, and bioactivity of N'-substituted benzylidene-3,4,5-trimethoxybenzohydrazide and 3-acetyl-2-substituted phenyl-5-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-2,3-dihydro-1,3,4-oxadiazole derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 19, p. 5036-5040, 2006.

KAJAL, A. *et al.* Therapeutic Potential of Hydrazones as Anti-Inflammatory Agents. **International Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 2014, p. 1-11, 2014.

KRAKHMAL, N. V. *et al.* Cancer Invasion: Patterns and Mechanisms. **Acta Naturae**, v. 2, n. 7, p. 17-28, 2015.

KRÁTKÝ, M. *et al.* Novel Aminoguanidine Hydrazone Analogues: from potential antimicrobial agents to potent cholinesterase inhibitors. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 12, p. 1229, 2021.

KRUSE, A. C. *et al.* Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor. **Nature**, v. 504, n. 7478, p. 1-5, 2013.

KUMAR, H. S. *et al.* Synthesis and evaluation of isonicotinoyl hydrazone derivatives as antimycobacterial and anticancer agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 23, n. 1, p. 269-279, 2013.

KUOL, N.; STOJANOVSKA, L.; APOSTOLOPOULOS, V.; NURGALI, K. Role of the nervous system in cancer metastasis. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 37, n. 1, p. 1-12, 2018.

LACROIX, M.; LECLERCQ, G. Relevance of Breast Cancer Cell Lines as Models for Breast Tumours: an update. **Breast Cancer Research And Treatment**, v. 83, n. 3, p. 249-289, 2004.

LAFRATE, A. L.; GUNTHER, J. R.; CARLSON, K. E.; KATZENELLENBOGEN, J. A. Synthesis and biological evaluation of guanylhydrazone coactivator binding inhibitors for the estrogen receptor. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 23, p. 10075-10084, 2008.

LARSEN, M. J. *et al.* Hereditary Breast Cancer: clinical, pathological and molecular characteristics. **Breast Cancer: Basic and Clinical Research**, v. 8, p. 145-155, 2014.

LAZIĆ, J. *et al.* Bis-guanylhydrazones as efficient anti-Candida compounds through DNA interaction. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 102, n. 4, p. 1889-1901, 2018.

LEE, C. *et al.* Overexpression and Activation of the α 9-Nicotinic Receptor During Tumorigenesis in Human Breast Epithelial Cells. **Jnci: Journal of the National Cancer Institute**, v. 102, n. 17, p. 1322-1335, 2010.

LEIBOVICI, J.; ITZHAKI, O.; HUSZAR, M.; SINAI, J. The tumor microenvironment: part 1. **Immunotherapy**, v. 3, n. 11, p. 1367-1384, 2011.

LI, L. *et al.* Potent hydrazone derivatives targeting esophageal cancer cells. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 148, p. 359-371, 2018.

LOMBARDI, M. G. *et al.* Autoantibodies against Muscarinic Receptors in Breast Cancer: Their Role in Tumor Angiogenesis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. 1-9, 2013.

MAKKI, J. Diversity of Breast Carcinoma: histological subtypes and clinical relevance. *Clinical Medicine Insights: Pathology*, v. 8, p. 23-31, 2015.

MIRANDA, A. *et al.* Design, Synthesis, Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Novel Piroxicam Analogues. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 14126-14145, 2012.

NASCIMENTO, R. G.; OTONI, K. M. Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know?. **Mastology**, v. 30, p. 1-8, 2020.

NATORI, T. *et al.* Nicotine Enhances Neovascularization and Promotes Tumor Growth. **Molecules and Cells**, v. 16, n. 2, p. 143-146, 2003.

NEAGU, A. N. *et al.* Proteomics and its applications in breast cancer. **Am J Cancer Res**, v. 11, n. 9, p. 4006-4049, 2021.

NOÉ, J. P. *et al.* LQM10, a guanyldrazone derivative, reduces nociceptive and inflammatory responses in mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 37, n. 3, p. 619-628, 2023.

NOUR, M. A. *et al.* Nicotinic acetylcholine receptors in chemotherapeutic drugs resistance: an emerging targeting candidate. **Life Sciences**, v. 278, p. 119557, 2021.

OLIVEIRA, P. A. *et al.* Chemical carcinogenesis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 4, p. 593-616, 2007.

OSBORNE, C.; WILSON, P.; TRIPATHY, D. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. **The Oncologist**, v. 9, n. 4, p. 361-377, 2004.

PALEARI, L. *et al.* The cholinergic system and cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 18, p. 211–217, 2008.

PAPANASTASIOU, I. *et al.* Design and Synthesis of Trypanosoma brucei Active 1-Alkyloxy and 1-Benzyloxyadamantano 2-Guanyldrazones. **Chemmedchem**, v. 4, n. 7, p. 1059-1062, 2009.

PANDEY, J.; PAL, R.; DWIVEDI, A.; HAJELA, K. Synthesis of Some New Diaryl and Triaryl Hydrazone Derivatives as Possible Estrogen Receptor Modulators. **Arzneimittelforschung**, v. 52, n. 01, p. 39-44, 2011.

PETRONILHO, E. C. *et al.* Design, synthesis, and evaluation of guanyldrazones as potential inhibitors or reactivators of acetylcholinesterase. **Journal Of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 6, p. 1069-1078, 2015.

PIETENPOL, J.A.; STEWART, Z.A. Cell cycle checkpoint signaling. **Toxicology**, v. 181-182, p. 475-481, 2002.

PINHATTI, V. R. *et al.* Cytotoxic, mutagenicity, and genotoxicity effects of guanyldrazone derivatives. **Mutation Research/Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis**, v. 806, p. 1-10, 2016.

PRAT, A. *et al.* Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. **The Breast**, v. 24, p. 26-35, 2015.

RAKHA, E. A. *et al.* Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. **Breast Cancer Research**, v. 12, n. 4, p. 1-12, 2010.

RAFEHI, H. *et al.* Clonogenic Assay: Adherent Cells. **Journal Of Visualized Experiments**, v. 49, n. 2573, p. 1-3, 2011.

RIEGER, A. M. *et al.* Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. **Journal Of Visualized Experiments**, v. 50, n. 2597, p. 1-4, 2011.

ROLLAS, S.; KÜÇÜKGÜZEL, S. Biological Activities of Hydrazone Derivatives. **Molecules**, v. 12, n. 8, p. 1910-1939, 2007.

RUSSO, P. *et al.* Cholinergic receptors as target for cancer therapy in a systems medicine perspective. **Current Molecular Medicine**, v. 14, n. 9, p. 1126-1138, 2014.

SANTOS, M. O. *et al.* Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, n. 1, p. 1-12, 2023.

ŠEKUTOR, M. *et al.* Adamantane-substituted guanylhyazones: novel inhibitors of butyrylcholinesterase. **Bioorganic Chemistry**, v. 41-42, p. 28-34, 2012.

SHAH, M. A. *et al.* Synthesis and Characterization of Novel Hydrazone Derivatives of Isonicotinic Hydrazide and Their Evaluation for Antibacterial and Cytotoxic Potential. **Molecules**, v. 27, n. 19, p. 6770, 2022.

SHENDGE, A. K.; CHAUDHURI, D.; BASU, T.; MANDAL, N. A natural flavonoid, apigenin isolated from *Clerodendrum viscosum* leaves, induces G2/M phase cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 cells through the regulation of p53 and caspase-cascade pathway. **Clinical And Translational Oncology**, v. 23, n. 4, p. 718-730, 2020.

SILVA, F. *et al.* Synthesis and Anticancer Activities of Novel Guanylhyazone and Aminoguanidine Tetrahydropyran Derivatives. **Molecules**, v. 21, n. 6, p. 671, 2016.

SONAWANE, S. J.; KALHAPURE, R. S.; GOVENDER, T. Hydrazone linkages in pH responsive drug delivery systems. **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, p. 45-65, 2017.

SONG, P. *et al.* Acetylcholine is synthesized by and acts as an autocrine growth factor for small cell lung carcinoma. **Cancer Research**, v. 63, n. 1, p. 214-221, 2003.

SU, X.; APRAHAMIAN, I. Hydrazone-based switches, metallo-assemblies and sensors. **Chemical Society Reviews**, v. 43, n. 6, p. 1963, 2014.

SUN, Z. *et al.* Differential Expression of Nicotine Acetylcholine Receptors Associates with Human Breast Cancer and Mediates Antitumor Activity of α O-Conotoxin GeXIVA. **Marine Drugs**, v. 18, n. 1, p. 61, 2020.

SUNG, H. *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 0, p. 1-41, 2021.

SUPINO, R. MTT Assays. **In Vitro Toxicity Testing Protocols**, p. 137-149, 1995.

SURABHI, D. M. *et al.* Recognizing invasive breast carcinoma of no special type with medullary pattern. **Radiology Case Reports**, v. 18, n. 5, p. 1788-1792, 2023.

THAPA, S. *et al.* Acetylcholinesterase: A Primary Target for Drugs and Insecticides. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 17, p. 1665-1676, 2017.

TERZIOGLU, N.; GÜRSOY, A. Synthesis and anticancer evaluation of some new hydrazone derivatives of 2,6-dimethylimidazo[2,1-b][1,3,4]thiadiazole-5-carbohydrazide. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 38, n. 7-8, p. 781-786, 2003.

TODESCHINI, A. R. *et al.* Synthesis and evaluation of analgesic, antiinflammatory and antiplatelet properties of new 2-pyridylarylhydrazone derivatives. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 33, n. 3, p. 189-199, 1998.

TROSKO, J. On the potential origin and characteristics of cancer stem cells. **Carcinogenesis**, v. 42, n. 7, p. 905-912, 2021.

UTKU, S. *et al.* Synthesis of novel 6-substituted-3(2H)-pyridazinone-2-acetyl-2-(substituted/nonsubstituted benzal) hydrazone derivatives and acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activities in vitro. **Arzneimittelforschung**, v. 61, n. 01, p. 1-7, 2011.

VARGO-GOGOLA, T.; ROSEN, J. M. Modelling breast cancer: one size does not fit all. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 9, p. 659-672, 2007.

VECCHIO, I. *et al.* The State of The Art on Acetylcholinesterase Inhibitors in the Treatment of Alzheimer's Disease. **Journal of Central Nervous System Disease**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2021.

VERMEULEN, K.; BERNEMAN, Z. N.; VAN BOCKSTAELE, D. R. Cell cycle and apoptosis. **Cell Proliferation**, v. 36, n. 3, p. 165-175, 2003.

VICINI, P. *et al.* Synthesis and antiproliferative activity of benzo[d]isothiazole hydrazones. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 5, p. 624-632, 2006.

WALCHER, L. *et al.* Cancer Stem Cells-Origins and Biomarkers: perspectives for targeted personalized therapies. **Frontiers In Immunology**, v. 11, p. 1-33, 2020.

WARDAKHAN, W. W.; EID, E. N. N.; MOHAREB, R. M. Synthesis and anti-tumor evaluation of novel hydrazide and hydrazide-hydrazone derivatives. **Acta Pharmaceutica**, v. 63, n. 1, p. 45-57, 2013.

WEIGELT, B.; GEYER, F. C.; REIS-FILHO, J. S. Histological types of breast cancer: how special are they?. **Molecular Oncology**, v. 4, n. 3, p. 192-208, 2010.

WESSLER, I.; KIRKPATRICK, C. J.; RACKÉ, K. Non-Neuronal Acetylcholine, a Locally Acting Molecule, Widely Distributed in Biological Systems: Expression and Function in Humans. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 77, n. 1, p. 59-79, 1998.

WESSLER, I.; KIRKPATRICK, C. J.; RACKÉ, K. The cholinergic 'pitfall': acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. **Clinical and Experimental Pharmacology Physiology**, v. 26, n. 3, p. 198-205, 1999.

WONG, H. P. S. *et al.* Nicotine promotes cell proliferation via alpha7-nicotinic acetylcholine receptor and catecholamine-synthesizing enzymes-mediated pathway in human colon adenocarcinoma HT-29 cells. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 221, n. 3, p. 261-267, 2007.

WONG, K. M.; HUDSON, T. J.; MCPHERSON, J. D. Unraveling the Genetics of Cancer: genome sequencing and beyond. **Annual Review Of Genomics And Human Genetics**, v. 12, n. 1, p. 407-430, 2011.

YIN, L.; DUAN, J.; BIAN, X.; YU, S. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. **Breast Cancer Research**, v. 22, n. 1, p. 1-13, 2020.

YU, H. *et al.* Acetylcholine acts through M3 muscarinic receptor to activate the EGFR signaling and promotes gastric cancer cell proliferation. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-12, 2017.

ZHAO, C. Cell culture: *in vitro* model system and a promising path to *in vivo* applications. **Journal Of Histotechnology**, v. 46, n. 1, p. 1-4, 2023.

ZIEGLER, E.; HANSEN, M.; HAASE, M.; EMONS, G.; GRÜNDKER, C. Generation of MCF-7 cells with aggressive metastatic potential *in vitro* and *in vivo*. **Breast Cancer Research And Treatment**, v. 148, n. 2, p. 269-277, 2014.

ZOLI, M. *et al.* Neuronal and Extraneuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. **Current Neuropharmacology**, v. 16, n. 4, p. 338-349, 2018.