

**UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO - UNAERP**  
**PÓS - GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA APLICADA A SAÚDE**

Flávia Alves Verza

Avaliação da resposta do análogo de curcumina 2615 em linhagens celulares de  
osteossarcoma U2OS (p53+/+) e Saos-2 (p53-/-)

Ribeirão Preto – SP

2023

Flávia Alves Verza

Avaliação da resposta do análogo de curcumina 2615 em linhagens celulares de osteossarcoma U2OS (p53+/+) e Saos-2 (p53-/-)

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia aplicada à saúde.

Orientador: Prof. Dr. Mozart de Azevedo Marins

Ribeirão Preto - SP

2023

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento  
Técnico da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

VERZA, Flávia Alves, 1992-  
V574a      Avaliação da resposta do análogo de curcumina 2615 em linhagens  
celulares de osteossarcoma U2OS (p53+/+) e Saos (p53-/-) / Flávia  
Alves Verza. – Ribeirão Preto, 2023.  
97 f. il. color.

Orientador: Prof. Dr. Mozart de Azevedo Martins.

Tese (Doutorado) - Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP,  
Biotecnologia, 2023.

1. HDAC1. 2. Osteossarcoma. 3. Curcumina. 4. Sp1. 5. p53. II. Título.

CDD 660

**FLÁVIA ALVES VERZA**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DO ANÁLOGO DE CURCUMINA 2615 EM  
LINHAGENS CELULARES DE OSTEOSSARCOMA U2OS (P53+/+) E SAOS-2 (P53-/-)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde

Data da defesa: 22 de setembro de 2023

Resultado: Aprovada

**BANCA EXAMINADORA**



Prof. Dr. Mozart de Azevedo Marins  
Presidente  
Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP



Profa. Dra. Ana Lucia Fachin Saltoratto  
Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP



Profa. Dra. Adriana Aparecida Lopes  
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP



Profa. Dra. Larissa Moreira Spinola de Castro Raucci  
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP



Prof. Dr. Gabriel Silva  
Universidade de São Paulo - USP

**RIBEIRÃO PRETO  
2023**

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho a todos aqueles que me acompanharam ao longo desta jornada de aprendizado e descoberta.

A cada pessoa que acreditou em mim, que me inspirou e que fez parte dessa conquista. Que este seja um testemunho do meu esforço e gratidão.

## **Agradecimentos**

Este trabalho é resultado não apenas de esforço e dedicação, mas também do apoio generoso que recebi durante o percurso.

Aos meus familiares, cujo amor e apoio incondicional foram a base que me sustentou em momentos de desafio. Que esta dedicatória reflita apenas uma parcela do carinho e respeito que sinto por vocês. Sempre serei grata por serem as melhores pessoas que eu poderia ter como família. Este trabalho é um reflexo do amor e apoio de vocês ao longo desse caminho.

Em especial, ao meu querido orientador, por seu direcionamento perspicaz e comprometimento incansável, os faróis que me guiaram através das complexidades desta viagem. Sua paciência, sabedoria e dedicação não apenas moldaram este trabalho, mas também me enriqueceram como pessoa.

Aos meus amigos, pelas risadas e lágrimas compartilhadas, que aliviaram a tensão e tornaram essa trajetória memorável.

Aos meus professores, que me guiaram com paciência e sabedoria, incentivando meu crescimento acadêmico e pessoal.

Ao apoio da instituição que proporcionou os recursos e ambiente propício para a realização desta pesquisa.

A CAPES pelo suporte financeiro.

A todos aqueles que participaram de ou de alguma forma colaboraram para a pesquisa. Seu tempo e contribuições foram fundamentais para a profundidade deste estudo. Cada passo dado nesse percurso foi moldado pela presença e influência de todos vocês.

***Muito, muito obrigada.***

## **Epígrafe**

“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido.”

Marie Curie

## RESUMO

O osteossarcoma (OS) é um tumor ósseo maligno que acomete principalmente adolescentes e adultos jovens, tem comportamento agressivo e alto índice de disseminação sistêmica. Apesar de uma gestão terapêutica agressiva, com uma taxa de 75% sobrevivência, 40% dos pacientes desenvolvem metástase em até 5 anos após o diagnóstico e a taxa de sobrevivência é reduzida para 19% a 30%. Nesses casos, o OS torna-se uma das principais causas de morte entre as patologias ósseas devido à ausência de um alvo farmacológico eficaz. O objetivo de novas estratégias terapêuticas tem sido reduzir a agressividade da doença e combater a progressão metastática. Essas abordagens são cruciais para melhorar os resultados terapêuticos. Atualmente, numerosos estudos estão investigando os efeitos de compostos fenólicos com potenciais propriedades anticancerígenas e atividade multialvo. No presente estudo, investigamos a atividade antitumoral de análogos fenólicos derivados da curcumina em linhagens celulares de OS e carcinoma de cólon, e se esses achados poderiam estar relacionados a alterações epigenéticas e regulação da proteína supressora de tumor p53, um potencial alvo para novas terapias anticancerígenas. Para obter mais informações sobre a citotoxicidade de análogos da curcumina, realizamos uma triagem preliminar em células de osteossarcoma U2OS (p53+/+) pelo ensaio de luciferase, que levou a seleção do composto 2615. Este composto em particular, apresentou atividade citotóxica em células de carcinoma de cólon HCT116 e de osteossarcoma, U2OS (p53+/+) e Saos-2 (p53-/-), reduzindo a viabilidade destas células em baixas concentrações. Pelo ensaio de luminescência, o análogo de curcumina 2615 levou à indução de caspases 3 e 7 em células de OS, assim como à apoptose, em que foi mais eficaz em células U2OS (p53+/+). Estes efeitos, pelo menos em parte, estão relacionados com o status do supressor de tumor p53. Também identificamos que o 2615 inibiu a migração das células U2OS (p53+/+) pelo ensaio de *Wound Healing*. Nosso trabalho mostra que o análogo 2615 em baixas concentrações inibe o crescimento celular e pode afetar outras vias moleculares desreguladas no câncer como a via das caspases 3/7 e apoptose, potencialmente através da via de sinalização da p53. Estes resultados indicam que o composto 2615 pode ser um candidato no desenvolvimento de drogas antitumorais baseadas no mecanismos de modulação de p53.

Palavras – chave: HDAC1; análogos de curcumina; Sp1; alterações epigenéticas; p53.

## ABSTRACT

Osteosarcoma (OS) is a malignant bone tumor that mainly affects adolescents and young adults, displaying aggressive behavior and a high rate of systemic spread. Despite aggressive therapeutic management, with a 75% survival rate, 40% of patients develop metastasis within 5 years of diagnosis, reducing the survival rate to 19% to 30%. In these cases, OS becomes one of the leading causes of death among bone pathologies due to the absence of an effective pharmacological target. The goal of new therapeutic strategies has been to reduce the disease's aggressiveness and combat metastatic progression. These approaches are crucial for improving therapeutic outcomes. Currently, numerous studies are investigating the effects of phenolic compounds with potential anticancer properties and multitarget activity. In this study, we investigated the antitumor activity of phenolic analogs derived from curcumin in OS and colon carcinoma cell lines and whether these findings could be related to epigenetic changes and the regulation of the tumor suppressor protein p53, a potential target for new anticancer therapies. To gather more information on the cytotoxicity of curcumin analogs, we conducted a preliminary screening in U2OS osteosarcoma cells (p53<sup>+/+</sup>) using the luciferase assay, which led to the selection of compound 2615. This compound exhibited cytotoxic activity in HCT116 colon carcinoma cells and osteosarcoma cells, U2OS (p53<sup>+/+</sup>) and Saos-2 (p53<sup>-/-</sup>), reducing the viability of these cells at low concentrations. Through the luminescence assay, curcumin analog 2615 induced caspases 3 and 7 in OS cells, as well as apoptosis, which was more effective in U2OS cells (p53<sup>+/+</sup>). These effects are at least partially related to the tumor suppressor p53 status. We also identified that 2615 inhibited the migration of U2OS cells (p53<sup>+/+</sup>) through the Wound Healing assay. Our work demonstrates that analog 2615 at low concentrations inhibits cell growth and may affect other molecular pathways dysregulated in cancer, such as the caspases 3/7 pathway and apoptosis, potentially through the p53 signaling pathway. These results suggest that compound 2615 may be a candidate in the development of antitumor drugs based on p53 modulation mechanisms.

Keywords - HDAC1; curcumin analogues; Sp1; epigenetic changes; p53.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Marcadores de Câncer. São reconhecidas atualmente oito capacidades funcionais, duas características habilitantes e quatro características emergentes comuns aos tumores. Adaptado de (HANAHAHAN, 2022).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 21 |
| Figura 2. Representação esquemática do possível desenvolvimento do OS. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 23 |
| Figura 3. Modificações na estrutura das histonas mediadas por HAT e HDAC. A figura mostra o resíduo de lisina sofrendo acetilação (ação HAT) e deacetilação (ação HDAC). Adaptado de (Verza et al., 2020). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 28 |
| Figura 4. Organização esquemática das HDACs classe I, II e IV mostrando os domínios catalíticos dependentes de $Zn^{2+}$ em azul, domínios catalíticos dependentes de $NAD^+$ em rosa, localização nuclear em amarelo, e o domínio de ligação a ubiquitina da HDAC6 em marrom. Adaptado de (VERZA et al., 2020).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 29 |
| Figura 5. Algumas vias que sofrem alteração induzida pela atividade das HDACs. A acetilação e deacetilação de histonas altera a atividade da cromatina causando importantes alterações epigenéticas. Além de alterar também a atividade de proteínas não-histonas, como fatores de transcrição, chaperonas e proteínas estruturais, influenciando a atividade de diversas vias e do controle do ciclo celular, da apoptose, da diferenciação, da angiogênese e da invasão celular. Adaptado de (Verza et al., 2020). ....                                                                                                       | 31 |
| Figura 6. Estruturas de alguns iHDACs conhecidos. Adaptado de (VERZA et al., 2020).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 33 |
| Figura 7.. Estrutura molecular da curcumina indicando alguns locais de possíveis alterações químicas a fim de obter ação terapêutica melhorada e atividade anticâncer mais específica (em verde ou laranja). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 37 |
| Figura 8. Algumas proteínas não histonas alteradas pelas HDACs e as modificações causadas por este evento. Adaptado de (VERZA et al., 2020).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 38 |
| Figura 9. Domínios estruturais da proteína Sp1.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 40 |
| Figura 10. Modificações pós-traducionais das histonas H2A, H2B, H3 e H4. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 41 |
| Figura 11. A resposta ao dano do DNA é uma cascata de eventos celulares que podem ser resumidos em três estágios: detecção e identificação, sinalização e reparo. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 42 |
| Figura 12. Representação esquemática do sistema duplo híbrido de mamíferos. Esquema ilustrando as construções usadas no ensaio. O GAL4 no vetor pBIND e o domínio de ativação VP16 do vetor pACT são mostrados em azul e laranja, respectivamente. O vetor pGL4luc contém sítios de ligação GAL4 (verde) a montante de uma caixa TATA mínima (vermelho), que por sua vez está a montante do gene da luciferase. O vetor pBIND contém GAL4 e o pACT, o domínio de ativação VP16. A interação entre as proteínas de interesse (HDAC1 e Sp1), a partir de construtos de fusão GAL4 e VP16, resulta na expressão de luciferase..... | 50 |
| Figura 13. (A) Células não transfectadas foram utilizadas como Controle, os vetores Sp1, HDAC1 e pGL4luc foram transfectados em células U2OS (p53+/+) e a atividade da luciferase foi detectada                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |    |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| (pGL4luc-/+). O repórter pGL4luc foi transfectado de forma isolada nas células U2OS (p53+/+) e após 15 dias, transfectamos os repórteres Sp1 e HDAC1 (pGL4luc+/+). (B) Controles negativo (pBIND+pACT) e positivo (pBINDid+pACTMyoD) da transfecção. Após 24 horas, os dados foram registrados como unidades relativas de luz (RLU) através de um luminômetro. As barras de erro indicam média ± DP. *** p<0.0001.....                                                                                                          | 51 |
| Figura 14. As células U2OS (p53+/+) foram tratadas com 10 µM de diferentes compostos, e após 48 h sua viabilidade foi mensurada por fluorescência. Cada experimento foi realizado em triplicata. (CN: controle negativo DMSO 0,5%). Em todos os experimentos, os dados representam a média ± DP de três experimentos. ** p ≤ 0,007 em comparação com o CN. ....                                                                                                                                                                 | 56 |
| Figura 15. Estrutura química do análogo de curcumina 2615 (A) e da Tricostana A (B). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 57 |
| Figura 16. A toxicidade do análogo 2615 foi testada em ensaio multiplex. (A) U2OS (p53+/+), (B) Saos-2 (p53-/-), (C) HCT-116 (p53+/+), (D) HCT-116 (p53-/-) e (E) HaCat foram tratadas com várias concentrações do análogo 2615 e por 48 h. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de três experimentos individuais. ....                                                                                                                                                                                       | 58 |
| Figura 17. Os efeitos do 2615 na concentração de 6µM foram avaliados sobre a capacidade migratória das células U2OS (p53+/+). (A) Uma monocamada confluenta foi ferida com uma ponta de pipeta estéril e as células foram deixadas migrar por 24h na presença de doxorrubicina ou 2615. (B) Gráfico de barras resumido ilustrando a porcentagem de fechamento. As barras de erro indicam média ± EP. Cada experimento foi realizado em triplicata. (CN: controle negativo DMSO 0,5%). Não houve significância estatística. .... | 62 |
| Figura 18. As células U2OS (p53+/+) e Saos-2 (p53-/-) foram tratadas com 0 e 5µM do composto 2615 48 horas e a atividade das caspases3/7 foi mensurada através da detecção de fluorescência. As barras de erro indicam média ± EP. *p ≤ 0,004; **p ≤ 0,009 em comparação com o CN. ....                                                                                                                                                                                                                                         | 64 |
| Figura 19. Mecanismo de via apoptótica intrínseca através da ativação das caspases 3/7. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 65 |
| Figura 20. (A) Análise da indução de apoptose em células U2OS (p53+/+) e Saos-2 (p53-/-) tratadas com Doxorrubicina e 2615 à 5µM por 48 h. (B) A perda da integridade da membrana foi avaliada na mesma amostra por fluorescência após o tratamento. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de três experimentos individuais. ****p< 0,0001 em comparação com NC. ....                                                                                                                                          | 66 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Atividade inibitória de HDACs (%) dos compostos presentes no Grupo I à 50nM. Foram utilizados os controles negativo (extrato de HeLa) e positivo, TSA à 50nM. Os experimentos foram realizados em 15, 30 e 45 minutos. ....                                           | 53 |
| Tabela 2. Atividade inibitória de HDACs (%) dos compostos presentes no Grupo II à 500nM. Foram utilizados os controles negativo (extrato de HeLa) e positivo, TSA à 500nM. Os experimentos foram realizados em 15, 30 e 45 minutos. ....                                        | 54 |
| Tabela 3. Valores de IC <sub>50</sub> do composto 2615 para as linhagens de osteossarcoma U2OS (p53+/+) e Saos-2 (p53-/-), para as linhagens de carcinoma de cólon HCT-116 (p53+/+) e HCT-116 (p53-/-), assim como para a linhagem normal de queratinócitos de pele HaCat. .... | 59 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                       |                                                          |
|-----------------------|----------------------------------------------------------|
| <b>2-D</b>            | Superfícies bidimensionais                               |
| <b>Apaf-1</b>         | proteína adaptadora Fas-associada com domínio de morte 1 |
| <b>ATP</b>            | Trifosfato de adenosina                                  |
| <b>ATM</b>            | Ataxia-telangiectasia mutada                             |
| <b>CDH1</b>           | E-caderinas                                              |
| <b>CIS</b>            | Cisplatina                                               |
| <b>CN</b>             | Controle Negativo                                        |
| <b>CO<sub>2</sub></b> | Dióxido de carbono                                       |
| <b>CTM</b>            | Células tronco-mesenquimais                              |
| <b>CXCR-4</b>         | Quimiocina receptor tipo 4                               |
| <b>DMSO</b>           | <i>Dimethyl sulfoxide</i>                                |
| <b>DNA</b>            | Ácido desoxirribonucleico                                |
| <b>DNMTs</b>          | DNA metiltransferases                                    |
| <b>DOX</b>            | Doxorrubicina                                            |
| <b>EAAT2</b>          | Transportador de glutamato do tipo 2                     |
| <b>EGCG</b>           | Epigallocatequina-3-galato                               |
| <b>eNOS</b>           | Sintase do óxido nítrico endotelial                      |
| <b>FDA</b>            | <i>Food and Drug Administration</i>                      |
| <b>HAT</b>            | Histona acetyltransferase                                |
| <b>HDAC</b>           | Histona deacetilase                                      |
| <b>HER2</b>           | Fator de crescimento epidérmico humano tipo 2            |
| <b>iHDAC</b>          | Inibidor de HDAC                                         |

|                        |                                                         |
|------------------------|---------------------------------------------------------|
| <b>IL</b>              | Interleucina                                            |
| <b>JENH</b>            | Junção de extremidades não homóloga                     |
| <b>lncRNAs</b>         | RNA longo não-codificante                               |
| <b>MDR</b>             | <i>Multidrug Resistance</i>                             |
| <b>miRNA</b>           | microRNAs                                               |
| <b>ml</b>              | Mililitro                                               |
| <b>mRNA</b>            | RNA mensageiro                                          |
| <b>MMP-9</b>           | Metaloproteinase 9                                      |
| <b>MMPs</b>            | Metaloproteinases                                       |
| <b>NAD<sup>+</sup></b> | Dinucleótido de nicotinamida e adenina                  |
| <b>nm</b>              | Nanômetro                                               |
| <b>nM</b>              | Nanomolar                                               |
| <b>OCT1</b>            | Fator de transcrição transportador de cátions orgânicos |
| <b>ORF</b>             | <i>open reading frame</i>                               |
| <b>OS</b>              | Osteossarcoma                                           |
| <b>PsA</b>             | psammaplina A                                           |
| <b>Rb</b>              | Retinoblastoma                                          |
| <b>RDD</b>             | Resposta ao dano no DNA                                 |
| <b>REB</b>             | Reparo por excisão de bases                             |
| <b>RNA</b>             | Ácido ribonucleico                                      |
| <b>ROS</b>             | Espécies reativas de oxigênio                           |
| <b>RPE</b>             | Reparo por pareamento errôneo                           |
| <b>REN</b>             | Reparo por excisão de nucleotídeos                      |

|                        |                                            |
|------------------------|--------------------------------------------|
| <b>RH</b>              | Recombinação homóloga                      |
| <b>SFB</b>             | Soro fetal bovino                          |
| <b>Sp1</b>             | Fator de especificidade 1                  |
| <b>Sp/KLF</b>          | Família dos fatores de transcrição Krüppel |
| <b>μM</b>              | Micromolar                                 |
| <b>μg</b>              | Micrograma                                 |
| <b>TP53</b>            | <i>Tumor protein 53</i>                    |
| <b>THC</b>             | Tetrahidrocurcumina                        |
| <b>TNF</b>             | Fator de necrose tumoral                   |
| <b>TSA</b>             | Tricostatina A                             |
| <b>UV</b>              | Raios ultravioleta                         |
| <b>VEGF</b>            | Fator de crescimento endotelial vascular   |
| <b>VPA</b>             | Ácido valpróico                            |
| <b>Zn<sup>2+</sup></b> | Íon zinco                                  |
| <b>YY1</b>             | Yin Yang 1                                 |

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu$  Micro (do grego μικρός)

$\beta$  Beta (do grego)

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                       |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                                            | <b>19</b> |
| 1.1. Câncer .....                                                                                                                                     | 20        |
| 1.2. Osteossarcoma.....                                                                                                                               | 22        |
| 1.3. Alvos moleculares da terapia anticâncer.....                                                                                                     | 25        |
| 1.4. Inibidores de HDAC (iHDAC).....                                                                                                                  | 31        |
| 1.5. Inibidores alternativos .....                                                                                                                    | 34        |
| 1.6. Análogos de curcumina .....                                                                                                                      | 36        |
| 1.7. Participação dos fatores de transcrição no mecanismo de regulação por HDACs .....                                                                | 38        |
| <b>2. HIPÓTESE .....</b>                                                                                                                              | <b>44</b> |
| <b>3. OBJETIVOS.....</b>                                                                                                                              | <b>45</b> |
| 3.1. Objetivo Geral.....                                                                                                                              | 45        |
| 3.2. Objetivos Específicos .....                                                                                                                      | 45        |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                                                                                                    | <b>46</b> |
| 4.1. Compostos.....                                                                                                                                   | 46        |
| 4.2. Linhagens celulares .....                                                                                                                        | 46        |
| 4.3. Transfecção das células de osteossarcoma U2OS p53(+/-).....                                                                                      | 46        |
| 4.4. Avaliação da atividade dos inibidores de HDAC .....                                                                                              | 47        |
| 4.5. Ensaio de citotoxicidade celular .....                                                                                                           | 47        |
| 4.6. Ensaio de viabilidade celular .....                                                                                                              | 47        |
| 4.7. Ensaio da atividade das caspases 3/7 .....                                                                                                       | 48        |
| 4.8. Análise da apoptose e necrose celular .....                                                                                                      | 48        |
| 4.9. Ensaio de migração celular.....                                                                                                                  | 48        |
| 4.10. Análise Estatística .....                                                                                                                       | 49        |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                                                                                                 | <b>50</b> |
| 5.1. Análise da interação entre HDAC1 /Sp1 .....                                                                                                      | 50        |
| 5.2. Análise da atividade inibitória dos compostos iHDAC.....                                                                                         | 53        |
| 5.3. Análise da atividade citotóxica dos análogos de curcumina .....                                                                                  | 56        |
| 5.4. Análise da inibição do crescimento das células de osteossarcoma U2OS (p53+/+) pelo ensaio de cicatrização celular ( <i>Wound-Healing</i> ) ..... | 61        |
| 5.5. Análise da atividade indutora de caspases 3/7 do análogo 2615.....                                                                               | 63        |
| 5.6. Avaliação da atividade indutora de apoptose e necrose celular do análogo 2615 .....                                                              | 66        |
| <b>6. CONCLUSÃO .....</b>                                                                                                                             | <b>68</b> |

|                          |           |
|--------------------------|-----------|
| <b>REFERÊNCIAS .....</b> | <b>69</b> |
| <b>ANEXO 1 .....</b>     | <b>87</b> |
| <b>ANEXO 2 .....</b>     | <b>94</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

O osteossarcoma (OS) é um tipo de tumor ósseo maligno caracterizado pela presença de células alteradas de origem mesenquimal-osteogênica. Em adolescentes, é o tumor ósseo mais comum, com alta incidência principalmente entre 15 e 25 anos. O diagnóstico é feito com base nos aspectos histopatológicos correlacionados com estudos radiológicos. Nas últimas décadas, o tratamento com OS atingiu um platô e a resistência aos medicamentos ainda é um grande desafio. Ao diagnóstico, a presença de metástase é um fator decisivo, com forte impacto na sobrevida desses pacientes, que ao apresentarem doença recorrente, continuam tendo um pior prognóstico mesmo com o uso combinado de quimioterapia e cirurgia. Os estudos clínicos mais recentes, que estão centrados na melhora dos resultados através da intensificação da terapia ou incorporação de novos agentes terapêuticos, não têm sido bem-sucedidos. Resistência a drogas e evolução clínica desfavorável continuam sendo problemas que atingem aproximadamente 50% dos pacientes. Dessa forma, o foco das pesquisas tem se voltado para um maior entendimento a respeito da biologia básica do OS. A etiologia do OS é desconhecida e a natureza específica das alterações genéticas que levam a sua tumorigênese e progressão também. A regulação epigenética associada ao silenciamento gênico pode auxiliar no entendimento da biologia envolvida com a transformação celular, além de indicar possíveis candidatos a biomarcadores. Alguns destes alvos são os fatores de transcrição Sp1 e p53, capazes de regular a transcrição de genes relacionados à progressão do ciclo celular, reparo do DNA, angiogênese, invasão tecidual e apoptose. A compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos com o surgimento e progressão desta neoplasia é essencial para auxiliar no diagnóstico, estimar o prognóstico desses pacientes e abrir possibilidades terapêuticas. A curcumina, um polifenol encontrado no açafrão-da-Índia (*Curcuma longa*), possui capacidade de aumentar a expressão e a atividade da p53, auxiliando na eliminação de células com potencial maligno. Além disso, ela pode modular outras vias e moléculas associadas à p53, contribuindo para suas propriedades anticancerígenas. No entanto, é importante destacar que a curcumina possui baixa biodisponibilidade sendo rapidamente metabolizada no organismo, o que pode impactar sua eficácia terapêutica. Sendo assim, o desenvolvimento de análogos de curcumina, criados por meio de modificações estruturais da molécula original (a fim de melhorar sua eficácia e seletividade para alvos específicos), tem se mostrado promissor especialmente na área de tratamento do câncer.

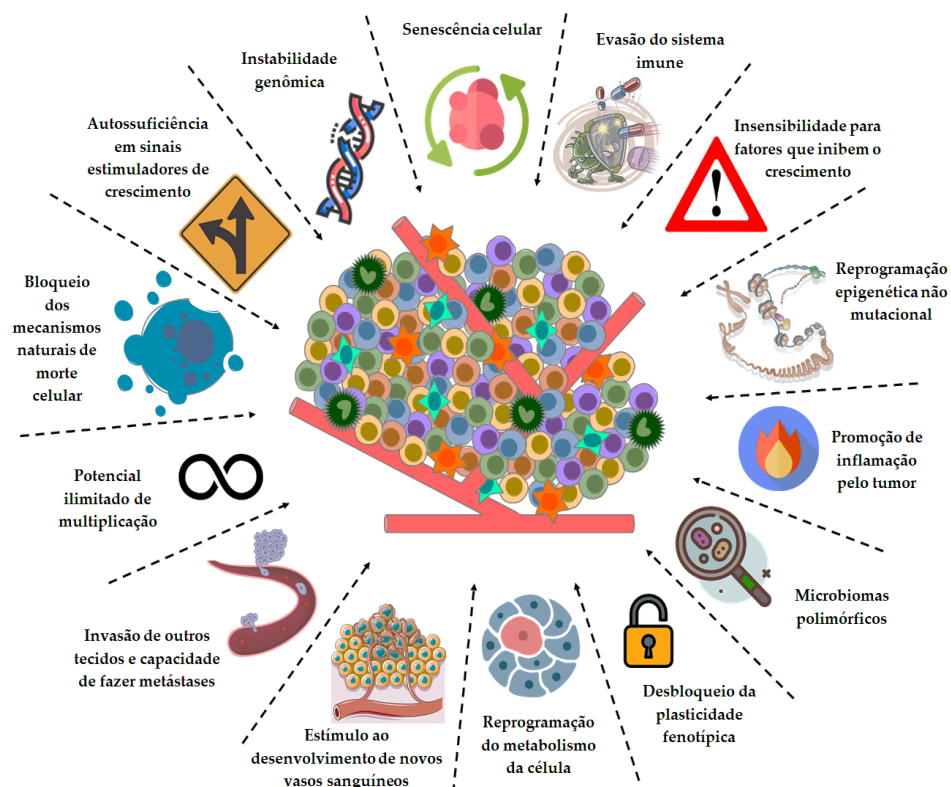
## 1.1. Câncer

O câncer é uma doença que se manifesta quando as células em uma parte específica do corpo começam a se multiplicar de maneira descontrolada e formam um aglomerado de células chamado tumor. Estes tumores podem ser benignos (não cancerígenos) ou malignos (câncer). A história do câncer é longa e complexa, remontando a milhares de anos (Ackerknecht, 1958; Cairns, 1975; Haddow, 1936). Os registros mais antigos que sugerem o conhecimento do câncer datam do Egito Antigo. Textos egípcios descrevem a remoção de tumores por cirurgia. Já na Grécia Antiga, Hipócrates, o pai da medicina ocidental, cunhou o termo "carcinos" (a palavra grega para caranguejo) para descrever tumores ulcerados, sugerindo uma semelhança com a forma de um caranguejo. Durante a Idade Média, muitos avanços na medicina foram perdidos, e a compreensão do câncer estagnou, assim como, durante o Renascimento, em que houve um retorno do interesse pela medicina e ciência, mas ainda não havia uma compreensão clara do câncer (David & Zimmerman, 2010). Já no século 18, começaram a surgir observações mais sistemáticas sobre diferentes tipos de câncer e seus sintomas. Porém, somente no século 19 a partir da invenção do microscópio, aos médicos observaram as células cancerígenas pela primeira vez e a teoria celular, que estabelece que todos os organismos são compostos de células, foi fundamental para a compreensão do câncer (Hajdu, 2012). Avanços significativos foram feitos na compreensão dos processos biológicos do câncer a partir do século 20. A radioterapia e a quimioterapia foram introduzidas como métodos de tratamento (Sudhakar, 2009). Atualmente, a pesquisa molecular levou a uma compreensão mais profunda das mutações genéticas que podem levar ao câncer. A terapia direcionada e a imunoterapia, tratamentos mais precisos e menos invasivos, foram desenvolvidas. A pesquisa sobre o câncer está em constante evolução, com cientistas e médicos de todo o mundo trabalhando para entender melhor a doença, desenvolver tratamentos mais eficazes e, idealmente, encontrar uma cura definitiva para várias formas de câncer (Tsimberidou et al., 2020). É importante notar que a história do câncer é repleta de desafios, avanços e esperança contínua na busca por tratamentos melhores e, eventualmente, uma cura completa.

O câncer é um dos principais problemas de saúde pública no mundo. A incidência e mortalidade por esta patologia tem crescido devido ao aumento da expectativa de vida da população, além do crescimento demográfico e o predomínio de fatores de risco ao câncer. Atualmente tem-se observado que a mudança de hábitos associados ao estilo de vida, como alimentação inadequada e sedentarismo, tem contribuído para o desenvolvimento de neoplasias malignas associadas às condições socioeconômicas (Sung et al., 2021). A incidência de novos

casos de câncer no mundo em 2020 foi de cerca de 19,3 milhões e quase 10,0 milhões de mortes por câncer (excluindo câncer de pele não melanoma) (Sung et al., 2021). A estimativa para o Brasil, é de que para o triênio de 2023 a 2025 ocorrerão 483mil casos novos de câncer, (704 mil se incluídos os casos de câncer de pele não melanoma) (INCA, 2023).

O câncer abrange mais de 100 diferentes tipos de doenças caracterizadas pela proliferação celular desordenada, que por serem agressivas e incontrolláveis, desenvolvem a capacidade de danificar e invadir tecidos adjacentes ou órgãos a distância, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (Liu, 2018). O processo de formação (carcinogênese) e progressão tumoral é influenciado por fatores como mutações genéticas (alterações no DNA) e/ou epigenéticas (alterações químicas no DNA) que estimulam a expressão de genes, que a princípio são inativos em células normais. São estes os oncogenes, genes supressores de tumor e genes de integridade do genoma, e são descritos como “genes do câncer”. Alterações nestes oncogenes possibilitam que as células transformadas adquiram características necessárias para sua proliferação (Pecorino, 2016). Estas características compõem os chamados “marcadores do câncer” que tem sido uma ferramenta de entendimento sobre a complexidade dos fenótipos e genótipos do câncer (Hanahan, 2022) (**Figura 1**).



**Figura 1.** Marcadores de Câncer. São reconhecidas atualmente oito capacidades funcionais, duas características habilitantes e quatro características emergentes comuns aos tumores. Adaptado de (Hanahan, 2022).

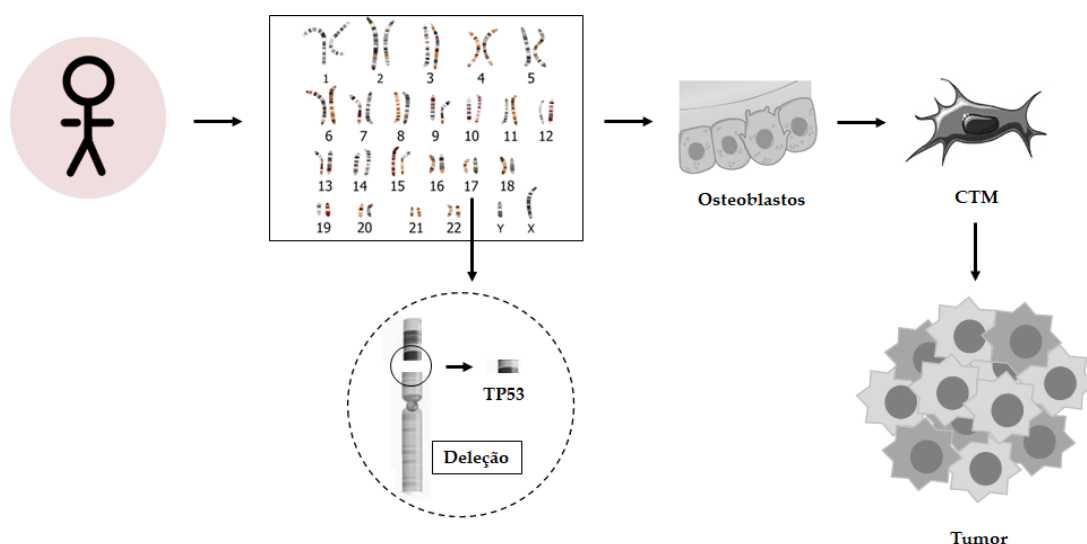
Outro fator importante na carcinogênese é o rearranjo dos componentes do microambiente tumoral, tendo em vista que o desenvolvimento do câncer acompanha alterações no tecido estromal. As células alteradas são capazes de modificar funcionalmente o microambiente em que estão inseridas, através da secreção de mediadores pró-inflamatórios necessários para conduzir a resposta inflamatória aos locais de infecção e lesão, além de reprogramação das células ali presentes, que passam a fornecer fatores de crescimento e suporte estrutural, auxiliando a progressão tumoral (Hinshaw & Shevde, 2019).

## **1.2. Osteossarcoma**

O osteossarcoma (OS) é um tumor maligno, agressivo e metastático, que de forma geral desenvolve-se em tecidos ósseos primários. São neoplasias raras responsáveis por 3 a 5% dos cânceres infantis e adolescentes (Sadykova et al., 2020). Esse tipo de sarcoma possui predileção por tecidos ósseos de rápido crescimento. Sendo assim, o pico de incidência dessa doença ocorre dos 10-14 anos de idade, durante o desenvolvimento puberal (Rojas et al., 2021). Cerca de 42% dos sítios de apresentação do OS são as regiões do fêmur, 19% e 10% dos casos ocorrem nas regiões da tíbia e do úmero respectivamente. Existe ainda risco de fraturas patológicas nos pacientes (S.-H. Park, 2023). Este câncer é caracterizado pela formação irregular do osso imaturo ou tecido osteóide, assim como interações entre células neoplásicas e células do estroma tumoral que também contribuem para o desenvolvimento e progressão do tumor ósseo (Roessner et al., 2021). Embora a origem do OS seja desconhecida, as células-tronco mesenquimais (CTM) precursoras dos osteoblastos são consideradas a origem potencial do tumor, pois estas promovem a produção e o depósito anormal da matriz osteóide (Tran & Slavin, 2021), assim como, a predisposição genética associada a mutações nos genes supressores de tumor retinoblastoma (Rb) e *Tumor protein 53* (TP53), que resultam em perda de sua expressão (Czarnecka et al., 2020).

O microambiente tumoral exerce diversos efeitos nas CTMs não diferenciadas. Diferentes citocinas como SDF-1, MIF e TGF- $\beta$  recrutam essas células para o local do tumor, onde são estimuladas pela rede parácrina, sofrendo uma série de transformações funcionais. A ação de INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1 $\alpha$  fortalece os efeitos promotores de crescimento das CTMs, enquanto INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  aumentam a capacidade das CTMs de promover metástases tumorais. Além disso, sob a estimulação do TGF- $\beta$ , as CTMs podem diferenciar-se em fibroblastos associados ao câncer (Zheng et al., 2018). Inicialmente, as CTMs se diferenciam em condrócitos durante

o processo de formação óssea endocondral até a adolescência, gerando nova cartilagem no local de crescimento ósseo e sendo gradualmente substituídas por células progenitoras osteogênicas e osteoblastos para produzir osso (Alfranca et al., 2015). Interessantemente, a p53 atua como um regulador negativo da osteoblastogênese em condições normais, reprimindo fatores de transcrição como Osterix e Runx2 (Velletri et al., 2016), essenciais na fase inicial da osteogênese nas células osteoprogenitoras (Han et al., 2017; Komori, 2018). No entanto, Runx2 pode atuar inibindo a função do p53 na ativação da apoptose, induzindo a transcrição de c-MYC por modificações de histonas (Shin et al., 2016). Isso explica os níveis elevados de expressão de Runx2 nas células do sistema operacional. Runx2 pode ter um papel duplo como supressor de tumor e oncoproteína, dependendo de seus níveis e contexto celular, bem como de sua regulação (Squire et al., 2011). As CTMs são uma fonte de células precursoras osteogênicas que originam os osteoblastos. Portanto, mutações no gene TP53 dessas células podem levar a defeitos no controle do crescimento celular, aumentando o risco de desenvolvimento de OS (Molchadsky et al., 2008). Entretanto, as mutações não são o evento mais comum nesse tipo de tumor. Pelo contrário, ele é mais caracterizado pela desregulação da expressão de genes supressores de tumor, como retinoblastoma (RB1) e TP53, ruptura da estrutura cromossômica e ciclos celulares descontrolados. Isso sugere a possibilidade de um defeito na vigilância ou nos mecanismos de reparo do DNA como uma das possíveis causas da gênese do tumor (Martin et al., 2012; Tang et al., 2008). As células de OS manifestam um alto nível de instabilidade genômica e partes do cromossomo 17q onde está localizado o gene TP53, sofrem eventos mistos de duplicação e deleção (Lau et al., 2003), o que pode ser a causa da proliferação neoplásica descontrolada dessas células (**Figura 2**).



**Figura 2.** Representação esquemática do possível desenvolvimento do OS.

O tecido ósseo é altamente especializado e envolve uma intrincada rede de comunicação entre células ósseas e imunológicas, mediada por citocinas e outros mediadores químicos. Por exemplo, a formação de osteoclastos depende da interação entre o ativador do receptor do fator nuclear kappa-B (RANKL), produzido por osteoblastos e células T ativadas, e o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), produzido por células do sistema imunológico. O RANKL regula a diferenciação dos osteoclastos, enquanto o M-CSF estimula a expressão de RANKL por células precursoras de osteoclastos, como monócitos e macrófagos. Além disso, várias substâncias segregadas pelas células imunitárias podem modular a formação de osteoclastos, criando uma rede de comunicação complexa que desempenha um papel significativo no desenvolvimento tumoral (Gaspar et al., 2020). A desregulação desses fatores, ou a exposição a novos estímulos como citocinas pró-inflamatórias e pró-tumorais, podem causar um desequilíbrio entre a diferenciação e a proliferação celular, contribuindo para um fenótipo maligno.

Existem vários subtipos de OS, que podem ser classificados (de acordo com a aparência das células vistas ao microscópio), em alto grau, de grau intermediário e de baixo grau. Os osteossarcomas de baixo grau, assim como os de grau intermediário são pouco comuns e de crescimento mais lento, já o osteossarcoma de alto grau é o mais prevalente. Este apresenta rápido crescimento e dediferenciação e reflete o tipo de matriz predominante, podendo ser osteóide (osteoblástico), condroide (condroblástico) ou fibrosa (fibroblástico) (Kuijjer, 2013). Grande parte dos casos de OS apresentam-se como doença localizada ao diagnóstico. Quando há a disseminação de um foco tumoral à distância do tumor original por meio da via hematogênica, as células cancerosas atingem comumente os pulmões. Os pacientes que apresentam metástases à distância, possuem taxa de sobrevivência de cerca de 20% (C. Yang et al., 2020). O OS localizado no sítio primário, pode ser tratado de forma convencional com cirurgia, quimioterapia e radioterapia (Lindsey et al., 2017) e cerca de 70% destes são curados. Entretanto, dos indivíduos que sofrem metástase à distância apresentam sobrevida de 5 anos após o diagnóstico (Fan et al., 2020). A identificação de novas estratégias terapêuticas que objetivem reduzir a agressividade da doença e combater a progressão metastática é essencial para o tratamento dos pacientes.

### 1.3. Alvos moleculares da terapia anticâncer

A molécula de DNA é o alvo de muitas drogas anticancerígenas utilizadas clinicamente em terapias de tratamento do câncer. O impacto destas na estabilidade do genoma celular é um reflexo de sua capacidade de interagirem direta ou indiretamente com o DNA celular e a capacidade das células em anular ou atenuar os efeitos desta interação. As fontes potenciais de danos no DNA incluem fatores endógenos, como aqueles gerados por atividades metabólicas (espécies reativas de oxigênio e replicação do DNA) e fatores exógenos, como agentes ambientais (raios ultravioleta [UV] e radiação ionizante) ou agentes quimioterápicos (O'Connor, 2015). Esses danos no DNA criam alterações estruturais que podem prejudicar a transcrição gênica e a replicação do DNA, comprometendo as funções celulares vitais (Basu, 2018). Para neutralizar a ocorrência constante de lesões ao DNA, as células desenvolveram sistemas complexos de reparo, responsáveis pela manutenção da integridade do material genético.

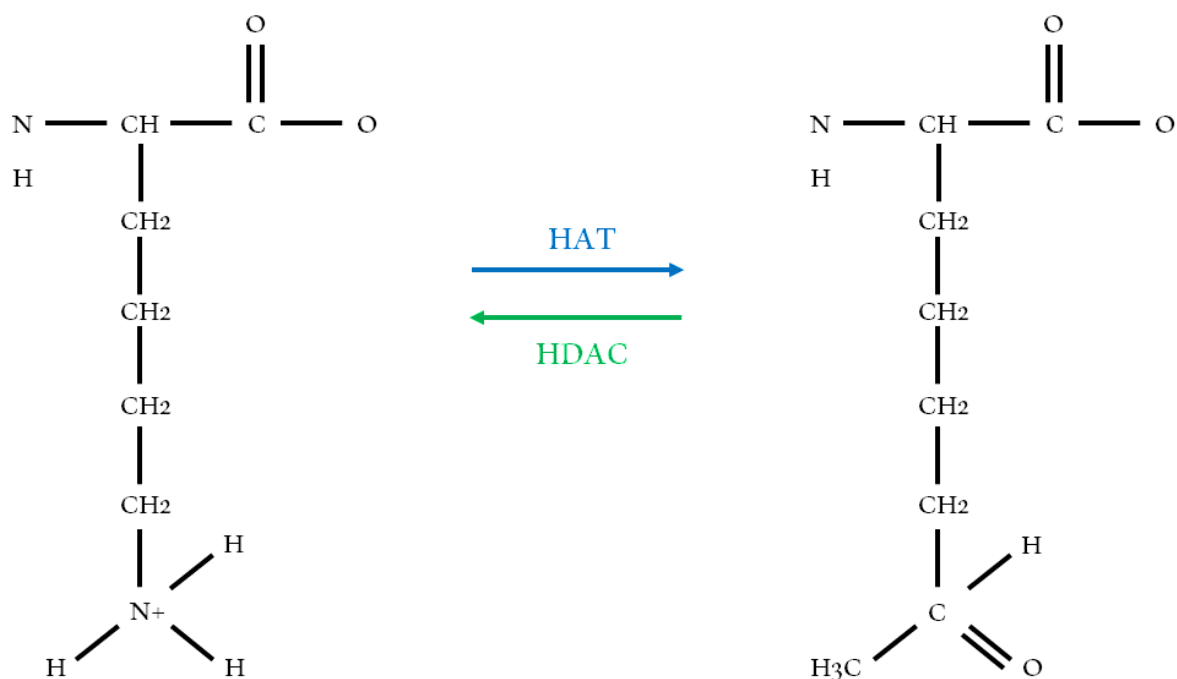
Muitas drogas causam danos no DNA que ativam vias de sinalização celular que desencadearão os mecanismos de resposta ao dano no DNA (RDD) e determinarão a sobrevivência ou a morte celular. Desta forma, a RDD é um elemento determinante no sucesso de terapias de tratamento do câncer que empregam agentes quimioterápicos cujo alvo é o DNA (Jiang et al., 2021). A RDD é disparada a partir da detecção de lesões no DNA, o que pode resultar em arraste do ciclo celular como forma de assegurar o reparo das lesões do DNA. De acordo com o tipo de lesão, diferentes vias de reparo do DNA são ativadas, sendo as principais as de reparo por excisão de bases (REB), que remove lesões causadas por oxidação de bases; a de reparo por excisão de nucleotídeos (REN), que remove lesões que distorcem a dupla hélice do DNA; a de reparo por pareamento errôneo (RPE), que remove nucleotídeos inseridos erroneamente no processo de replicação do DNA; a de recombinação homóloga (RH) e a de junção de extremidades não homóloga (JENH), duas vias implicadas no reparo de lesões que atingem ambas as fitas do DNA (Gentile et al., 2016). Essa RDD protege contra a instabilidade genômica, que é uma característica no desenvolvimento do câncer (Hanahan, 2022). O dano ao DNA e o estresse da replicação são maiores nas células com lesões pré-cancerosas, assim como em tumores, comparados com aqueles em tecidos normais, sugerindo que o estresse da replicação também contribui para instabilidade genômica (Chabanon et al., 2021). A regulação destas vias tem participação de vários fatores de transcrição, que regulam de forma direta e indireta genes de reparo do DNA, porém, atuam também como parte da maquinaria proteica de reparo de DNA (Chatterjee & Walker, 2017).

O gene TP53 desempenha um papel crítico na regulação do ciclo celular e da apoptose, e seu produto (a proteína p53) é sintetizado em resposta a situações de estresse devido a tensões como danos ao DNA, hipóxia e ativação de oncogenes. Este gene frequentemente sofre seleção negativa durante a transformação tumorigênica. Mutações no gene TP53 em resposta a danos no DNA podem promover ciclos celulares descontrolados, inibir a senescência e a morte celular por apoptose, aumentando assim a instabilidade genômica. Isto leva a um acúmulo de mutações e à sobrevivência celular, aumentando por sua vez o risco de transformação maligna, incluindo o desenvolvimento de OS (Z. Chen et al., 2016). A ocorrência de mutação no OS foi investigada em um estudo no qual o exoma completo e o sequenciamento de RNA de 59 pares de amostras tumorais/normais revelaram que apenas o gene supressor de tumor TP53 apresentou mutação com frequência significativa em todas as amostras. A taxa média de mutação somática não silenciosa foi de 1,2 mutações por megabase, com uma mediana de 230 rearranjos somáticos por tumor. Houve grande heterogeneidade genética intratumoral, com presença de cadeias complexas de rearranjos e mutações em quase todos os casos (Kovac et al., 2015; Perry et al., 2014). A análise tumoral por sequenciamento regional do exoma e do genoma completos em 86 regiões tumorais de 10 pacientes com OS revelou uma disparidade genômica evolutiva entre o OS primário e suas metástases pulmonares, onde as metástases exibiram uma maior carga mutacional e instabilidade genômica em comparação ao tumor primário. Foram encontradas mutações em genes que fazem parte da via de sinalização celular chamada PI3K-Akt nos estágios inicial e tardio da evolução do tumor e na via MAPK no estágio metastático. No entanto, as metástases mostraram melhor imunogenicidade, incluindo aumento da carga de neoantígenos e da expressão do gene da superfamília das imunoglobulinas, o PD-L1, tendo mais linfócitos infiltrantes em comparação com o tumor primário. Isto sugere que as metástases devem ser tratadas separadamente dos seus tumores originais por meio de terapia personalizada de metástases, que requer análise genética em tempo real após metástase pulmonar (D. Wang et al., 2019). Mutações silenciosas nos genes TP53 e/ou RB1 foram relatadas como a principal causa do desenvolvimento esporádico de OS (Velletri et al., 2016). Estudo *in vitro* e *in vivo* comparando MSCs com células OS direcionadas para TP53 e RB1 usando camundongos transgênicos com esses genes silenciados em mostrou que excluindo apenas TP53, a incidência de OS poderia atingir 60% dos casos (Lin et al., 2009).

Entre os possíveis mecanismos que contribuem para o desenvolvimento do OS estão alterações na expressão anormal de oncogenes e de genes supressores tumorais desencadeada por eventos genéticos e epigenéticos leva à desregulação de importantes vias de sinalização

celular, criando assim um ambiente favorável à transformação maligna. Isso ocorre porque há maior renovação óssea durante a fase de crescimento e, assim, amplia-se a possibilidade de ocorrência de defeitos no processo de diferenciação e nas vias de sinalização (Ottaviani & Jaffe, 2009). A p53 está envolvida em uma série de processos epigenéticos que afetam a expressão gênica e, portanto, desempenha um papel crucial na regulação do desenvolvimento celular normal, bem como na prevenção do crescimento descontrolado das células, como visto em cânceres.

As alterações epigenéticas correspondem a diversas modificações químicas no DNA e na cromatina, está envolvida na expressão de genes específicos e no silenciamento ou ativação gênica, podendo atuar prevenindo a inserção de agentes mutagênicos em outras partes do genoma (Hogg et al., 2020). A epigenética teve um crescimento exponencial de publicações na última década sendo apontada como importante fonte de novas terapias para o câncer. O controle da atividade da cromatina realizado pela acetilação das histonas representa modificações pós-traducionais com implicações funcionais para diversos processos celulares (Shvedunova & Akhtar, 2022). Quando a lisina presente nas caudas N-terminais das histonas está acetilada, a cromatina apresenta-se relaxada possibilitando a ativação da transcrição gênica naquela região, já a deacetilação de resíduos de lisina está associada a cromatina condensada o que causa um impedimento na transcrição dos genes presentes naquela região (Eckschlager et al., 2017). A acetilação e deacetilação em resíduos de lisina é controlada pela ação oposta de duas enzimas que atuam na regulação gênica. Estas reações são catalisadas por enzimas com atividade "histona acetiltransferase" (HAT) ou "histona deacetilase" (HDAC) que adicionam ou removem grupos acetil respectivamente (Lock, 2018) (**Figura 3**). Diversas formas de HATs e HDACs têm sido identificadas, dentre elas, coativadores que podem interagir com reguladores de transcrição (K. Yu et al., 2020). A deacetilação aumenta as interações iônicas entre as histonas carregadas positivamente e o DNA carregado negativamente, produzindo uma estrutura de cromatina mais compacta, reprimindo a transcrição gênica por impedir o acesso da maquinaria de transcrição naquele local (Seto & Yoshida, 2014), já a acetilação de histonas tem sido associada a outras funções do genoma, como montagem da cromatina mais frouxa influenciando no reparo e na recombinação do DNA (Y.-J. C. Chen et al., 2022).

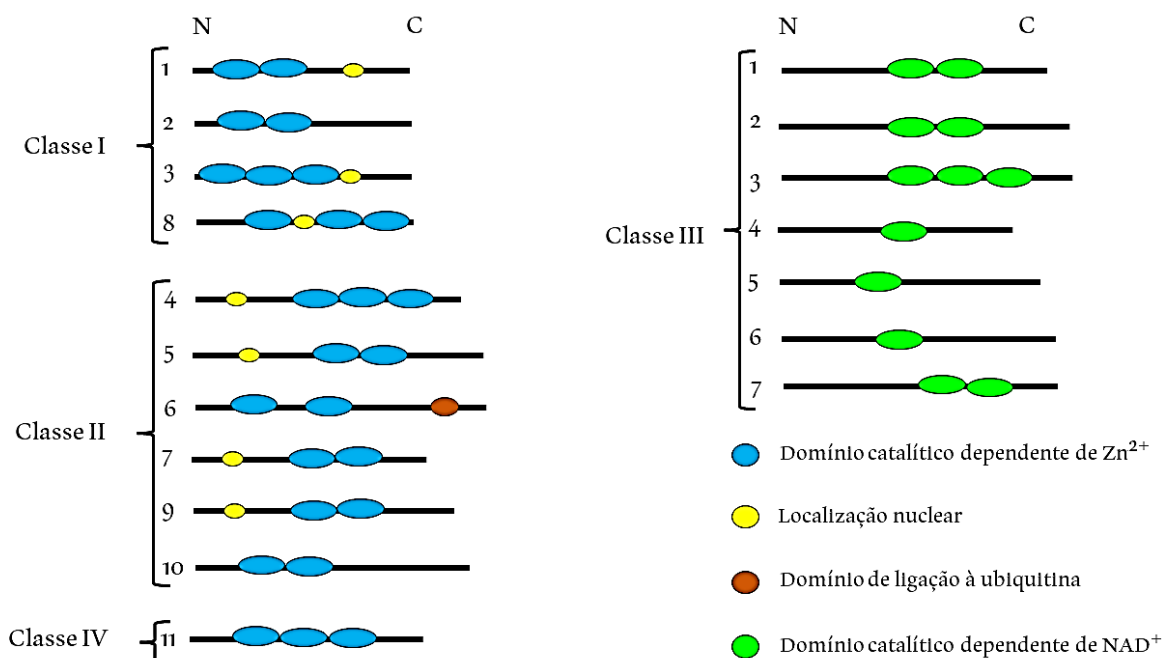


**Figura 3.** Modificações na estrutura das histonas mediadas por HAT e HDAC. A figura mostra o resíduo de lisina sofrendo acetilação (ação HAT) e deacetilação (ação HDAC). Adaptado de (Verza et al., 2020).

As modificações nas cadeias das histonas definem o compactamento ou relaxamento da cromatina através do recrutamento e ligação de diversas proteínas específicas, funcionando como uma maquinaria epigenética (Shvedunova & Akhtar, 2022). Esta informação epigenética é um importante componente na regulação da expressão gênica já que a quebra da integridade epigenética tem sido associada a diversas doenças, incluindo cânceres (Ghasemi, 2019; Hogg et al., 2020). A adição do grupo acetil no resíduo de lisina neutraliza sua carga positiva, altera a estrutura do aminoácido e bloqueia outras modificações neste local específico (Tamkun et al., 1992). Esta alteração epigenética está relacionada a distúrbios e doenças por participar de vários processos fisiológicos atuando em sinergia com fatores de transcrição, oncoproteínas e quinases, afetando a estabilização proteica, ativando ou inibindo a transcrição gênica e o reparo do DNA (Gil et al., 2017).

As HDACs são uma família de enzimas que possuem papéis importantes em diversos processos biológicos, principalmente por apresentarem atividade repressiva na transcrição gênica (Gray et al., 2001). As HDACs são classificadas como enzimas com capacidade de remover grupos acetil ( $\text{O}=\text{C}-\text{CH}_3$ ) de uma lisina ácido amino  $\epsilon$ -N-acetil em uma histona, esse

evento permite que as histonas tenham a capacidade de compactar o DNA (RUIJTER et al., 2003) A atividade enzimática que catalisa a deacetilação das histonas, foi descoberta pela primeira vez em 1969 (Inoue & Fujimoto, 1969). São enzimas que possuem um domínio catalítico que requer um íon  $Zn^{2+}$  (Classes I, II e IV) ou  $NAD^+$  (Classe III) (Seto & Yoshida, 2014) (**Figura 4**).



**Figura 4.** Organização esquemática das HDACs classe I, II e IV mostrando os domínios catalíticos dependentes de  $Zn^{2+}$  em azul, domínios catalíticos dependentes de  $NAD^+$  em rosa, localização nuclear em amarelo, e o domínio de ligação à ubiquitina da HDAC6 em marrom. Adaptado de (Verza et al., 2020).

Em humanos, existem 18 enzimas HDACs que estão divididas em quatro classes: as proteínas semelhantes a Rpd3 de Classe I (HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC8) possui localização nuclear (Werbeck et al., 2020); as proteínas semelhantes a Hda1 de classe IIa (HDAC4, HDAC5, HDAC7 e HDAC9) e IIb (HDAC6 e HDAC10) que tem expressão específica no tecido e podem ser transportadas entre o núcleo e o citoplasma, isso sugere que essa classe de HDACs pode estar envolvida na acetilação de proteínas não-histonas (S. Y. Park & Kim, 2020); as proteínas de classe III são do tipo Sir2 (SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6 e SIRT7) o padrão de expressão específico desta classe é desconhecido e esta classe possui mecanismos que diferem das outras duas classes (G. E. Adams et al., 2018); e a proteína da classe IV (HDAC11) que é homóloga tanto em classe I como em classe II (RAINA et al., 2019). Evidências sugerem que as HDACs também podem deacetilar proteínas não-histonas

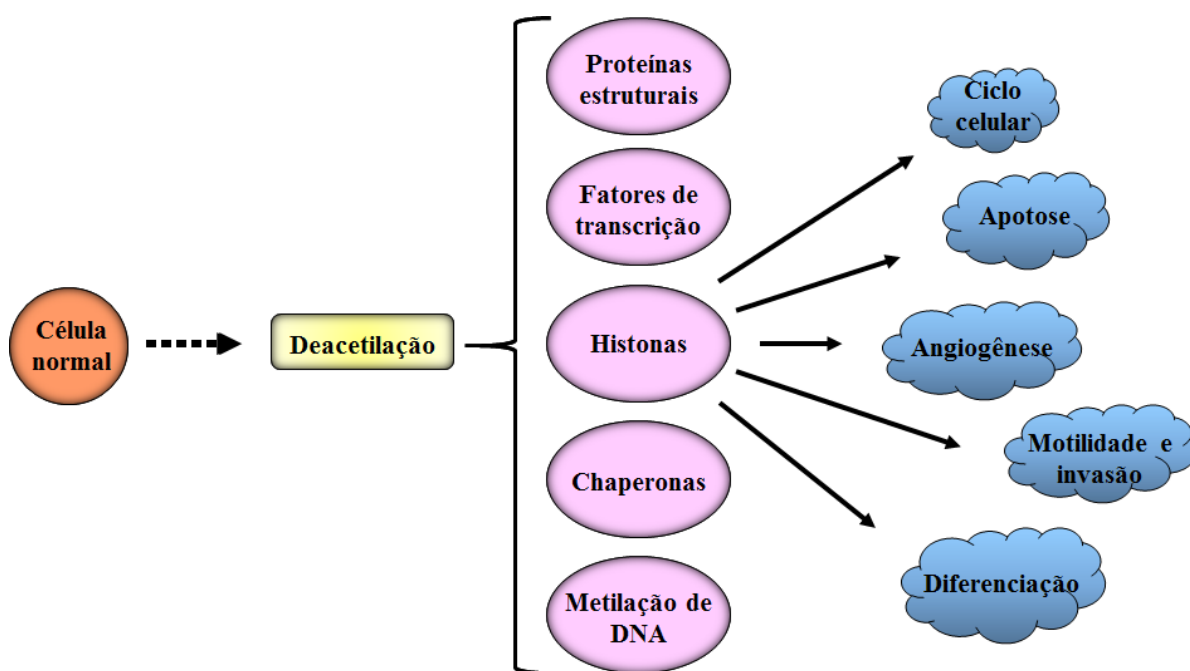
tais como receptores de hormônios, proteínas chaperonas e do citoesqueleto, que regulam a proliferação e a morte celular (Narita et al., 2019).

As HDACs podem formar complexos de silenciamento gênico com receptores nucleares quando não há um ligante específico (Lane & Chabner, 2009). Estudos indicam que as HDACs podem regular a expressão de vários genes através da interação com fatores de transcrição, como STAT3 (Ren et al., 2021), NF- $\kappa$ B (W. Lu et al., 2021), IL-10 (Stanfield et al., 2021), p53 (Zhu et al., 2022), E2F1 (Yun et al., 2022), entre outros (Shvedunova & Akhtar, 2022). A ausência de HDAC1 leva a atividade deacetilase reduzida e a hiperacetilação de outras histonas, assim como o aumento na expressão de HDAC2 e HDAC3 em células deficientes em HDAC1, não é capaz de compensar a perda da HDAC1, sugerindo uma função exclusiva desta enzima (Lagger et al., 2002). O HDAC4 foi descrito como um regulador importante na hipertrofia de condrócitos (Gu et al., 2022), podendo apresentar papéis gerais para as HDACs de classe II no controle da hipertrofia celular (Turkman et al., 2022). A descoberta das enzimas HDAC1 e HDAC2 foi relatada em 1996 (Taunton et al., 1996; W. M. Yang et al., 1996), já a HDAC3 foi descrita em 1997 (W. M. Yang et al., 1997). As HDACs 4, 5 e 6 foram caracterizadas no mesmo ano, em 1999 (Grozinger et al., 1999). A HDAC7 em 2000 (Kao et al., 2000). Muitas formas diferentes de HDACs podem surgir, por polimorfismos nos nucleotídeos (Dondu et al., 2021) ou por *splicings* alternativos (Rahhal & Seto, 2019). Isoformas diferentes da proteína HDAC9 por exemplo, já foram observadas (Petrie et al., 2003) e embora tenham semelhantes funções de regulação no transporte citoplasmático nuclear e ligação direcionada ao DNA as HDACs4, HDAC5, HDAC7 e HDAC9, tem origem em diferentes genes e não são isoformas entre si (Seto & Yoshida, 2014; Witt et al., 2009).

As HDACs têm sido estudadas extensivamente, principalmente por seu papel no câncer (Ruzic et al., 2022), em contraste, não foram descritas aplicações clínicas para as HATs, porém, elas podem desempenhar papéis importantes em doenças inflamatórias, câncer e desordens neurológicas já que a acetilação de histonas leva a um DNA menos condensado e ao aumento da transcrição gênica (Brownell & Allis, 2021). As HATs podem atuar sobre diversos substratos celulares como histonas, fatores de transcrição, enzimas e receptores nucleares (Y.-J. C. Chen et al., 2022). Apesar de seu potencial, o desenvolvimento de inibidores de HATs mostrou-se desafiador e uma grande lacuna permanece entre a atividade biológica dos iHATs em estudos *in vivo* e seu uso como agentes terapêuticos, pois em camundongos o knock-out de muitos genes HAT é incompatível com a vida (Gupta et al., 2008).

#### 1.4. Inibidores de HDAC (iHDAC)

Nas últimas décadas, tem-se descoberto uma classe de inibidores como foco no bloqueio de atividade das HDACs. Estes inibidores são capazes de impedir o silenciamento gênico através da hiperacetilação de histonas, atuando sobre a regulação da expressão gênica, além de influenciar o crescimento celular, diferenciação e indução de apoptose em neoplasias (Bouyahya et al., 2022). O efeito dos iHDAC não está restrito às proteínas histonas, esses inibidores também podem atuar sobre proteínas não-histonas, fatores de transcrição, reguladores, mediadores de transdução de sinal, enzimas de reparo do DNA e proteínas chaperonas (Banik et al., 2019; Kulka et al., 2020) (**Figura 5**).



**Figura 5.** Algumas vias que sofrem alteração induzida pela atividade das HDACs. A acetilação e deacetilação de histonas altera a atividade da cromatina causando importantes alterações epigenéticas. Além de alterar também a atividade de proteínas não-histonas, como fatores de transcrição, chaperonas e proteínas estruturais, influenciando a atividade de diversas vias e do controle do ciclo celular, da apoptose, da diferenciação, da angiogênese e da invasão celular. Adaptado de (Verza et al., 2020).

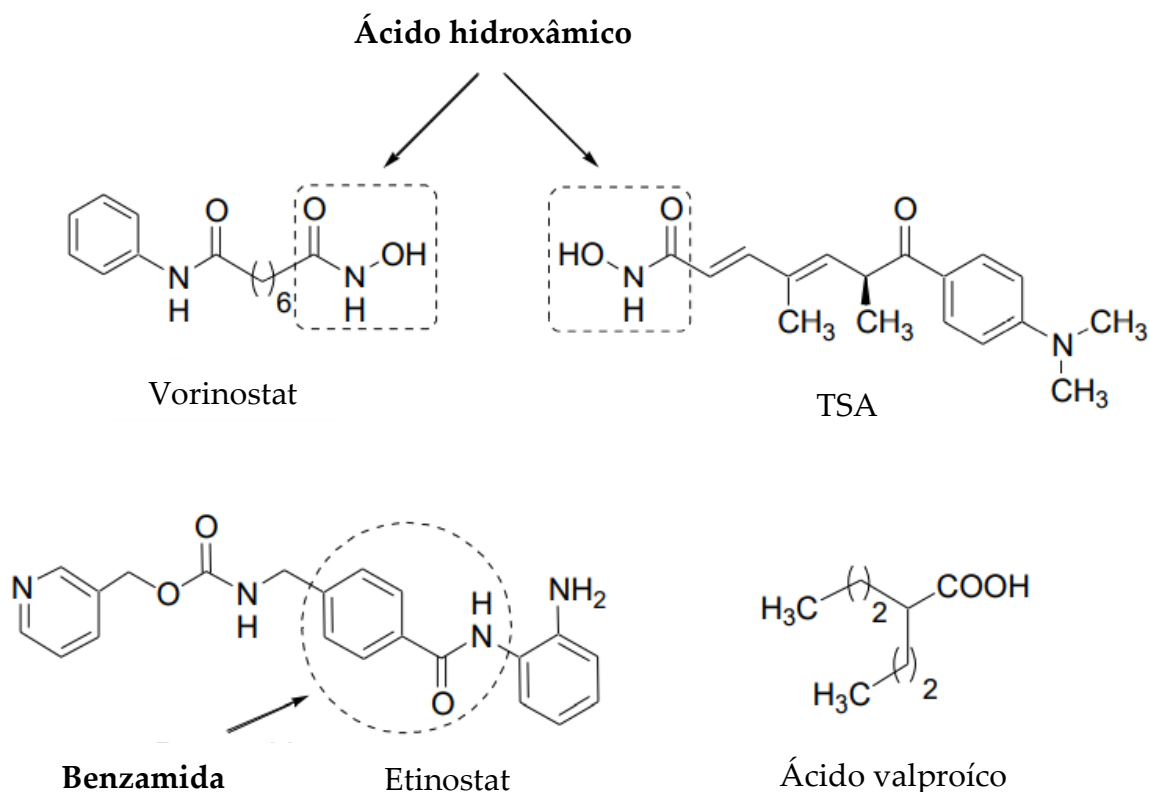
Tem surgido grande interesse em produzir essas drogas para melhor compreensão das funções das HDACs, além de investigar os potenciais anticancerígenos desses inibidores (Ruzic et al., 2022). A maioria das HDACs possui um sítio ativo dependente de  $Zn^{2+}$  que pode ser inibido por compostos que possuem a habilidade de quelar este íon (Kim et al., 2017). Os iHDAC utilizados atualmente possuem um farmacóforo que pode ligar-se a este sítio ativo e bloqueá-lo (H. T. Qin et al., 2017). A eficácia pré-clínica dos iHDACs acontece pela ativação

gênica promovida por eles, que está relacionada com o sucesso na hiperacetilação das caudas N-terminais das histonas, causando alteração na arquitetura da cromatina que ao acontecer, possibilita o acesso de fatores de transcrição aos promotores gênicos (H. Xu et al., 2021). Os iHDAC podem ser compostos naturais ou sintéticos que diferem entre si na especificidade dos alvos de atuação (Ho et al., 2020). Muitos compostos estruturalmente diversos podem se ligar as HDACs e inibir a atividade enzimática, eles são categorizados em duas grandes classes: inibidores seletivos de isoforma HDAC e pan-inibidores, que atuam contra todas as HDACs de classe I (Y. Cheng et al., 2019). Os pan-inibidores englobam diversas classes de inibidores sintéticos e naturais de HDAC, e são classificados de acordo com sua estrutura química como ácidos hidroxâmicos e carboxílicos alifáticos, benzamidas, peptídeos cíclicos e inibidores de sirtuína (H. T. Qin et al., 2017).

Células do sistema imune que apresentam acúmulo excessivo de histonas acetiladas podem apresentar funções alteradas (Hull et al., 2016), sendo assim, é de extrema importância selecionar atentamente as iHDAC para o tratamento de doenças como o câncer, por exemplo. Os iHDAC tornam as células cancerígenas mais sensíveis ao tratamento imunoterápico aumentando a expressão de antígenos presentes no tumor e atuando como imunomoduladores (Burke et al., 2020). A atividade anticâncer observada nos iHDAC engloba diversos eventos moleculares e fisiológicos, como a superexpressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), HIF-1 $\alpha$  e sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS) (Ribatti & Tamma, 2020) e TGF $\beta$ 1 (C. Huang et al., 2019). A apoptose de células tumorais induzida por iHDAC está associada à sua capacidade seletiva de regulação das vias pró-apoptóticas (Newbold et al., 2016), o que não acontece nas células normais (Bolden et al., 2013). Os iHDAC à base de ácido hidroxâmico incluem abexinostat, ácido suberoil-bis-hidroxâmico, belinostat, givinostat, pracinostat, panobinostat, quisinostat, resminostat, trichostatina A (TSA) e vorinostat cuja estrutura, e a de outras HDACis, são apresentadas na **(Figura 6)**.

A função do grupo ácido hidroxâmico é quelar com zinco que está localizado no sítio ativo das enzimas. O belinostat, o panobinostat, o vorinostat e a TSA são capazes de inibir todas as classes de HDACs. No entanto, a TSA possui alta toxicidade (Su et al., 2021). Esses compostos podem inibir todas as classes de HDACs. Os iHDAC compostos por ácidos graxos de cadeia curta são o ácido valproico (AVP) com atividade voltada as HDACs de classe I e IIa, os ácidos butírico e fenilbutírico que atuam sobre as HDACs das classes I e II, sendo os inibidores menos potentes desta classe (Peng & Seto, 2011). O grupo de drogas que também interage com o zinco são os derivados de benzamidas, que inclui o entinostatato um iHDAC de

classe I, a tacedinalina, 4SC202, o mocetinostato, inibidores seletivos de HDAC classe I e IV e a romidepsina que é um inibidor de classe I (Elmallah & Micheau, 2019).



**Figura 6.** Estruturas de alguns iHDACs conhecidos. Adaptado de (Verza et al., 2020).

Até o momento a agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos - *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou os iHDAC vorinostat (SAHA) (Marks & Breslow, 2007), romidepsina (FK-228) (Gryder et al., 2012), belinostat (PXD-101) (Steele et al., 2008) e panobinostat (LBH 589) (Revill et al., 2007) para o tratamento de linfoma cutâneo de células T, linfoma de células T e mieloma múltiplo, quando o paciente não responde ao tratamento convencional.

Os iHDAC voltados para a classe III, visam as sirtuínas que contêm  $\text{NAD}^+$ , têm demonstrado efeito no tratamento de distúrbios cardiovasculares, neurodegenerativos e envelhecimento (Houtkooper et al., 2012). A SIRT1, a mais estudada até o momento, interage com proteínas presentes nos mecanismos de reparo ao dano no DNA através de deacetilação, recrutando-as para o local da lesão (Alves-Fernandes & Jasiulionis, 2019). Seu papel pode ser apontado como guardião da estabilidade genômica, no entanto, o vínculo desta enzima com o

início e progressão do câncer ainda permanece incompreendido. Os iHDACs têm surgido como uma nova classe em potencial de agentes anticâncer, pois afetam a diferenciação e proliferação de células atípicas, apoptose, reparo ao DNA, morte celular programada e angiogênese *in vitro* e *in vivo* (Rettig et al., 2015; Wu et al., 2018; Q. Xu et al., 2020). Atualmente, estão em desenvolvimento diversos inibidores de HDAC em vários estágios de ensaios clínicos contra cânceres, de forma isolada ou sinérgica com terapias usuais contra o câncer, como radioterapia, quimioterapia, fototerapia, terapia alvo e imunoterapia (Zhou et al., 2021).

### 1.5. Inibidores alternativos

Apesar de os iHDAC sintéticos utilizados atualmente terem seus efeitos comprovados em ensaios clínicos, estes não são seletivos e ainda apresentam efeitos adversos indesejáveis (Suraweera et al., 2018), sendo assim, a busca por inibidores alternativos potencialmente seletivos destas isoenzimas, se faz necessária. Uma alternativa é a pesquisa de produtos naturais e seus derivados capazes de inibir as alterações epigenéticas geradas por alterações na expressão gênica, com menor risco ao paciente (X. Qiu et al., 2021).

Um dos mais efetivos inibidores de deacetilases de histonas é a TSA, um alcaloide natural derivado do ácido dienohidroxiâmico, extraído de espécies do gênero bacteriano *Streptomyces*. Sua atividade antiproliferativa foi investigada, e descobriu-se que causa um acúmulo de histonas acetiladas em linhagens de células tumorais, de modo que o DNA se apresenta menos disponível para transcrição (Yoshida et al., 1990). A TSA continua sendo um dos inibidores de HDAC mais poderosos disponíveis atualmente, e seu estudo tem sido estendido para outras terapias epigenéticas (Y. Yu et al., 2022). A psammaplina A (PsA) é um produto natural derivado de bissulfetos de bromotirosina isolado de algumas espécies de esponjas marinhas (Arabshahi & Schmitz, 1987). Este composto tem sido descrito como inibidor de atividades enzimáticas que implicam em controles epigenéticos, como as HDACs e as DNA metiltransferase (DNMT) (Baud et al., 2012; Piña et al., 2007), além de apresentar atividade citotóxica (Y. Park et al., 2003) e antiproliferativa em linhagens cancerígenas (Bao et al., 2021).

O Largazole é um depsipeptídeo macrocíclico isolado de cianobactérias marinhas do gênero *Symploca* (Taori et al., 2008) que apresenta atividade antiproliferativa por inibição das HDACs de classe I (Al-Awadhi et al., 2020), sendo um pró-fármaco promissor no tratamento epigenético direcionado, assim como os compostos provenientes deste potente agente

anticâncer (Junker et al., 2022). Diversos produtos naturais apresentam atividade reduzida de iHDAC, porém a modificação na estrutura química desses compostos orgânicos pode produzir análogos com alta atividade inibitória. O FK228 (FR901228), conhecido como depsipeptideo (peptídeo em que um ou mais dos seus grupos amida são substituídos por éster) é produzido por *Chromobacterium violaceum*, apresenta potencial iHDAC e atividade antitumoral *in vivo* (UEDA et al., 2012), seus análogos foram confirmados como promissores agentes anticâncer. Alguns destes foram responsáveis pela inibição do complexo HDAC/PI3K induzindo apoptose em células cancerígenas humanas (Pojani & Barlocco, 2020).

Compostos naturais obtidos a partir de plantas como o resveratrol e a epigallocatequina-3-galato (EGCG) podem induzir alterações epigenéticas, aumentando a sensibilidade de células tumorais à medicamentos quimioterápicos e reduzindo a multiplicação e diferenciação de células malignas (Maleki Dana et al., 2022). O resveratrol é um polifenol natural, biologicamente ativo que pode ser encontrado principalmente em sementes de uva e possui aplicação terapêutica no tratamento de diversas doenças, incluindo o câncer (Espinoza et al., 2019; D. D. Huang et al., 2020; R. Yang et al., 2022). O resveratrol induziu a expressão de genes responsáveis por desencadear o processo de apoptose em células de câncer de mama, processo mediado por eventos epigenéticos, especificamente acetilação de histonas (Izquierdo-Torres et al., 2019). O tratamento com resveratrol em conjunto com a quercetina, inibiu a expressão de HDACs em células de câncer de boca (V. Singh et al., 2020), o que pode ser uma alternativa interessante na busca de compostos naturais aditivos e sinérgicos com atividade epigenética, no tratamento de neoplasias no futuro.

A EGCG é um antioxidante natural, abundante no chá verde, que apresenta propriedades farmacológicas e antioxidantes, sendo capaz de ativar caspases, induzir apoptose e alterar a expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular em células tumorais (F. Li et al., 2021). O tratamento com este polifenol reduziu significativamente a atividade das HDACs de classe I em células leucêmicas (Moradzadeh et al., 2018) e de câncer de próstata (Deb et al., 2019). A EGCG apresenta amplo potencial epigenético, podendo afetar a expressão de moduladores do epigenoma em células normais (Ciesielski et al., 2020) e tumorais (F. Li et al., 2021). Um grande número de compostos já foi purificados e isolados a partir de vegetais e possuem atividade antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral (Atrahimovich et al., 2021; Seca & Pinto, 2018). Dentre estes, os flavonoides representam um extenso grupo de polifenóis obtidos a partir de plantas com propriedade citotóxica em linhagens cancerígenas e efeitos adversos reduzidos em células normais. Estes compostos fenólicos representam uma classe de

metabólitos secundários biologicamente ativos em plantas e possuem baixo peso molecular (Davies et al., 2020).

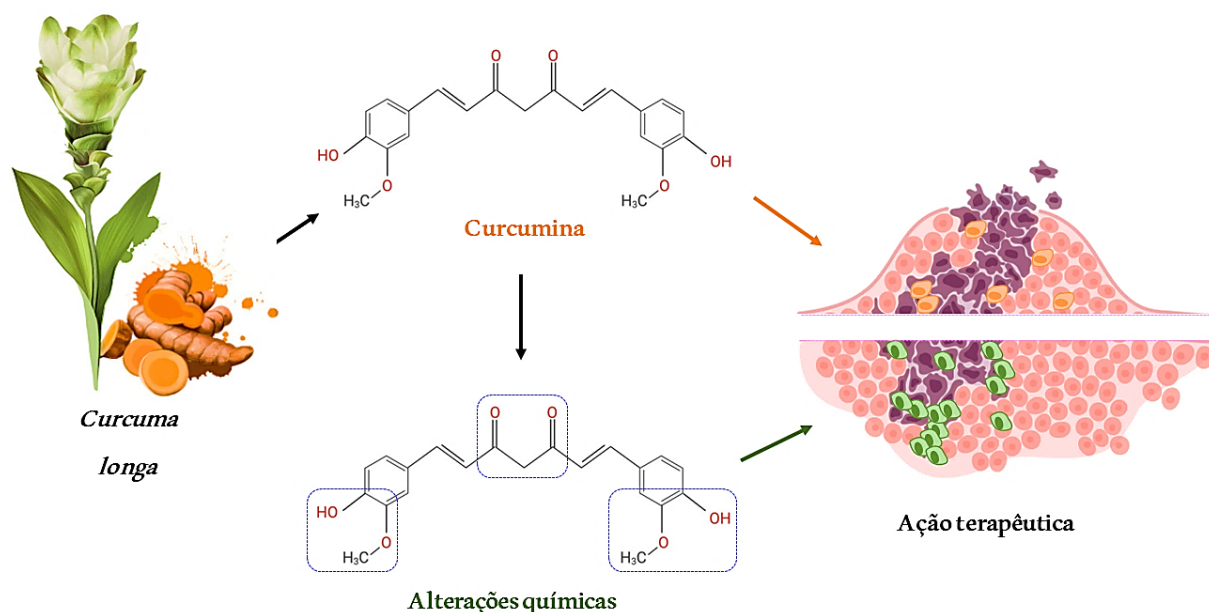
### **1.6. Análogos de curcumina**

Outro possível iHDAC é a curcumina (diferuloilmetano), um composto polifenólico presente no açafrão, componente ativo da planta herbácea *Curcuma longa* (X. Qiu et al., 2021). Muito conhecida por apresentar ações farmacológicas diversas, contra várias doenças, incluindo o câncer (Zoi et al., 2021). É composta por 75% de curcuminoide, 10-20% de dimetoxicurcumina e 5% de bisdemetoxicurcumina (Shirsath et al., 2017). A curcumina pode alterar diversas vias de sinalização molecular importantes, responsáveis por modular a sobrevivência celular, as respostas inflamatórias, redução da expressão de genes como o fator de necrose tumoral (TNF), moléculas de adesão, interleucinas, quimiocina receptor tipo 4 (CXCR-4) e proteína C-reativa (Costa et al., 2022; L. Deng et al., 2021; M. Li et al., 2022; Ni et al., 2021; Sethy et al., 2021).

Atualmente diversos pesquisadores têm buscado desvendar os potenciais mecanismos epigenéticos da curcumina e sua ação como agente de ligação ao DNA e interação com fatores de transcrição. As atividades anticâncer deste polifenol sobre as mudanças reversíveis na expressão gênica incluem a inibição de DNA metiltransferases (DNMTs) (Fabianowska-Majewska et al., 2021), microRNAs (miRNA) (Akbari et al., 2021), RNA longo não-codificante (lncRNAs) (Amini et al., 2021), regulação de HATs e HDACs (Ni et al., 2021). A curcumina aumenta a sensibilidade ao dano no DNA, reduz o reparo de quebra da dupla fita e inibe a recombinação homóloga através da inibição de HDACs, promovendo a degradação de recombinases (S. H. Wang et al., 2015). Em outro estudo, a curcumina além de interagir com o sítio ativo contendo o íon zinco, demonstrou ótima inibição das HDACs classe I e III (Sangeetha et al., 2013).

A administração oral de curcumina é capaz de alterar a expressão de HDACs em pacientes saudáveis (D. Cheng et al., 2019). No entanto, a eficácia clínica da curcumina é reduzida, pois esta apresenta baixa biodisponibilidade, sendo assim, os pesquisadores têm buscado alternativas para melhorar a aplicabilidade deste polifenol. Nanopartículas desenvolvidas para amplificar o potencial anticâncer da curcumina como um iHDAC foram capazes de suprimir a progressão tumoral *in vivo* (Lee et al., 2019). Alguns análogos da curcumina podem apresentar atividade anticâncer potencialmente maior do que a encontrada

no composto original (**Figura 7**), podendo alterar vias epigenéticas e a expressão de genes correlacionados à apoptose regulados por fatores de transcrição como a p53 e o fator de especificidade 1 (Sp1) (Lima et al., 2018).



**Figura 7.** Estrutura molecular da curcumina indicando alguns locais de possíveis alterações químicas a fim de obter ação terapêutica melhorada e atividade anticâncer mais específica (em verde ou laranja).

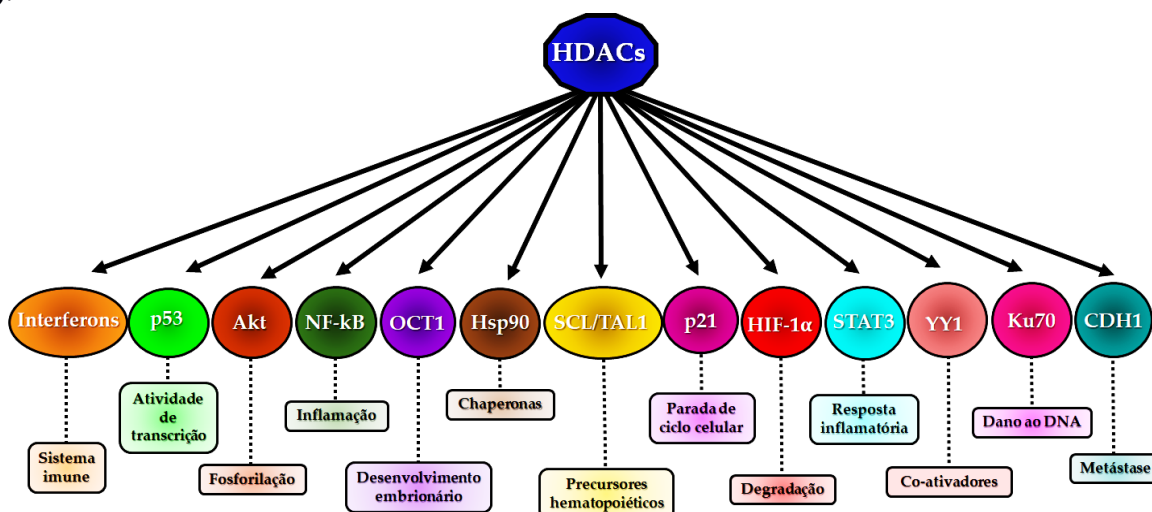
Os análogos de curcumina tem demonstrado atividade inibitória das HDACs que pode suprimir vias de reparo do dano do DNA e ser usada para aumentar a eficácia dos tratamentos contra o câncer (Selvam et al., 2019). Células tumorais tratadas com o curcuminoide calebina-A, apresentaram atividade enzimática da HAT reduzida, o que não foi observado com a HDAC (M. J. Lee et al., 2019). No entanto, já foi demonstrado que a calebina-A pode inibir a HDAC1 de forma semelhante a curcumina (Novaes et al., 2017). O tetrahidrocurcumina (THC) é um curcuminoide obtido através da redução da curcumina. É sintetizado em laboratório por hidrogenação, mas pode ser produzido *in vivo* através do metabolismo no fígado (Pari & Amali, 2005). O THC não demonstrou inibição de provavelmente por apresentar um mecanismo de ação diferente da calebina-A e da curcumina que são semelhantes, porém demonstra ter potencial anti-inflamatório e atividade antioxidante, o que pode explicar sua atividade anticâncer (Aggarwal et al., 2015). Estudos *in vitro* e em modelos animais têm explorado o potencial destes análogos de curcumina no tratamento do osteossarcoma, que já demonstram

atividade na redução do crescimento tumoral, apoptose, inibição da angiogênese e modulação da expressão (K. H. Lu et al., 2023).

A acetilação de proteínas não histonas também tem sido alvo de diversas pesquisas, considerando-se que este evento pode alterar mecanismos de comunicação celular de crescimento, metástase, manutenção celular e resistência terapêutica em diferentes tipos de câncer. A curcumina e seus análogos podem ser responsáveis por suprimir ou instigar esta sinalização (You et al., 2022). A ativação da proteína supressora de tumor p53 através de sua acetilação, medeia a transcrição de outras proteínas como GADD45 e p21, responsáveis por interromper o ciclo celular e induzir apoptose (Fu et al., 2018). A p53 encontra-se muitas vezes inativa nas células tumorais, sendo assim, sua reativação é vista como uma importante estratégia terapêutica no tratamento de câncer.

### 1.7.Participação dos fatores de transcrição no mecanismo de regulação por HDACs

As HDACs podem exercer efeitos diretos sobre processos fisiológicos, como apoptose, diferenciação, metabolismo e inflamação através da acetilação e deacetilação de proteínas não histonas, afetando suas funções, localização celular e interações proteína-proteína (Shvedunova & Akhtar, 2022). Algumas proteínas como: p53, NF- $\kappa$ B, STAT3, Hsp90, SCL/TAL1, OCT1, YY1, Akt, Ku70, Interferons e E-caderinas (CDH1) podem sofrer alterações induzidas pelas HDACs que causam modificações no desenvolvimento, proliferação, diferenciação e morte celular (Nusinzon & Horvath, 2003; B. N. Singh et al., 2010; von Burstin et al., 2009) (**Figura 8**).



**Figura 8.** Algumas proteínas não histonas alteradas pelas HDACs e as modificações causadas por este evento. Adaptado de (Verza et al., 2020).

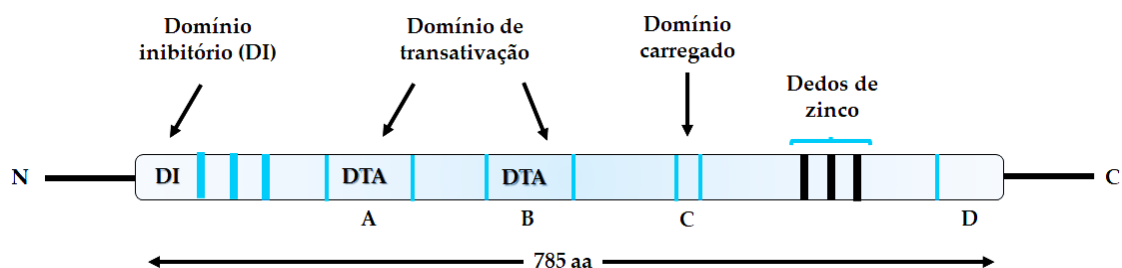
Outras proteínas que funcionam como fatores de transcrição também podem ser moduladas pelo estado da cromatina, o que limita a sua capacidade de se ligar ao DNA e ativar a transcrição. Alguns fatores de transcrição são expressos em determinados tecidos de maneira específica e regulam funções celulares especializadas, portanto, o silenciamento desses fatores de transcrição pode resultar em bloqueio funcional. A deleção do fator de transcrição SCL/TAL1 por exemplo, resultou em incapacidade de geração de precursores hematopoiéticos e morte embrionária em camundongos (Shivdasani et al., 1995). O SCL/TAL1 pode induzir leucemia ao reprimir o complexo E47/HEB, neste estudo os autores sugerem que os iHDACs podem ser eficazes em pacientes com leucemia linfoblástica aguda de células T (LLA-T) que expressam SCL/TAL1, tendo em vista que a repressão dos genes alvo E47/HEB, é mediada pelo recrutamento do complexo mSin3A/HDAC1 (O’Neil et al., 2004).

Assim como o silenciamento do gene que codifica o fator de transcrição transportador de cátions orgânicos (OCT1), pode levar a distúrbios no desenvolvimento embrionário (Sebastiano et al., 2010), a fosforilação induzida de Yin Yang 1 (YY1), leva a interações com HDAC, e consequente diminuição na atividade do transportador de glutamato do tipo 2 (EAAT2), que modula a função dos neurônios e está associado a distúrbios neurológicos, como as doenças de Parkinson e Alzheimer (Rizor et al., 2022). Quando avaliado no câncer, o YY1 diminuiu o nível de microRNA-873-5p (miR-873-5p) recrutando as HDACs 4 e 9 para o seu promotor. Em seguida, ativou as vias PI3K/AKT e ERK1/2, que foram suprimidas por miR-873-5p. O eixo YY1/miR-873-5p está envolvido na quimiorresistência das células do câncer de mama (Guo et al., 2020). A regulação destas vias tem a participação de vários fatores de transcrição, que regulam de forma direta e indireta genes de reparo do DNA, porém, atuam também como parte da maquinaria proteica de reparo de DNA (Bhaskar Rao et al., 2021).

A proteína supressora de tumor p53 é um fator de transcrição importante principalmente na resposta ao estresse e homeostase celular. Em condições fisiológicas normais, esta proteína é mantida em baixos níveis por seu regulador negativo, o MDM2 (J. Yang & Zhang, 2021). Suas vias moleculares de atuação podem formar mecanismos associados como p53/p21/p27 e p53/Bcl-2/Bax e estes complexos moleculares podem afetar diversos processos biológicos, incluindo proliferação celular, fase G2/M e apoptose (L. Qiu et al., 2021). A inibição de MDM2 e das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL, induziu a parada do ciclo celular na fase G2/M, aumentando os níveis de p53 e Bax e estimulando a apoptose em células de câncer de mama (Ahmed et al., 2022).

A acetilação da p53 pode ser feita por p300/CBP em diversos resíduos de lisina, induzindo o aumento da sua capacidade de ligação ao DNA e consequente transcrição de seus genes-alvo (J. Yang & Zhang, 2021). Esse evento pode ocorrer em resposta a danos celulares, porém ocorre de forma transitória e é reversível, já que as modificações pós-traducionais mantêm a acetilação da p53 sob controle (Appella & Anderson, 2001). Em resposta ao estresse genotóxico, a p53 funciona como um fator de transcrição e de genes efetores como GADD45A e p21 (Kaiser & Attardi, 2018). As HDACs podem reduzir a atividade da p53, através da remoção dos grupos acetil da p53, tornando as HDACs alvos terapêuticos importantes em pesquisas relacionadas ao câncer. Essa reativação da p53 pode ajudar a impedir a proliferação descontrolada de células cancerosas. Já a superexpressão de HDAC1 por exemplo, diminuiu a acetilação da p53, *in vivo* (Luo et al., 2000). A MDM2 pode recrutar HDAC1, promovendo a deacetilação da p53 e esse silenciamento pode interromper sua função de forma mais rápida, quando seus genes-alvo não são mais necessários (Ito et al., 2002).

O fator de transcrição Sp1 é encontrado em todas as células animais (**Figura 9**), e regula de forma direta ou indireta a expressão de genes como o Gadd45A e p21 (Silva et al., 2016), também tem sido associado à remodelação da cromatina através de interações com fatores associados à modificadores da cromatina, como p300 (Suzuki et al., 2000) e HDACs (Zhao et al., 2003).

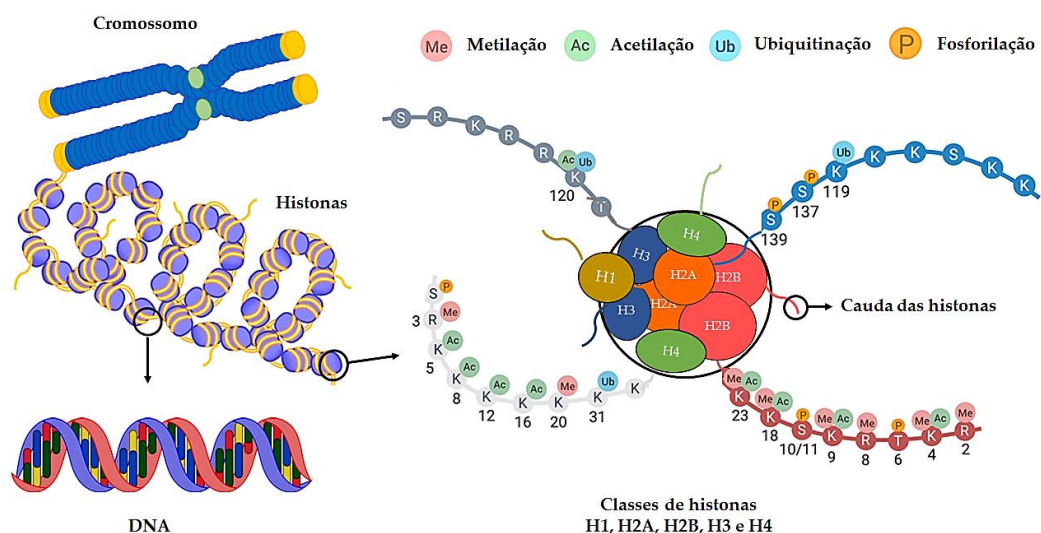


**Figura 9.** Domínios estruturais da proteína Sp1.

Entretanto, também em resposta à lesões no DNA, o Sp1 é fosforilado e recrutado para regiões de lesão na dupla fita no DNA e nestes sítios, possivelmente medeia o recrutamento de fatores de remodelação da cromatina que atuam no reparo destas lesões (Beishline et al., 2012). O Sp1 pode definir a ligação específica de Gadd45A em um local específico de dano no DNA por exemplo (Rajput et al., 2016). A Sp1 é uma proteína de especificidade que pertence à família dos fatores de transcrição Krüppel (Sp/KLF) que possui 26 membros (Van Vliet et al., 2006).

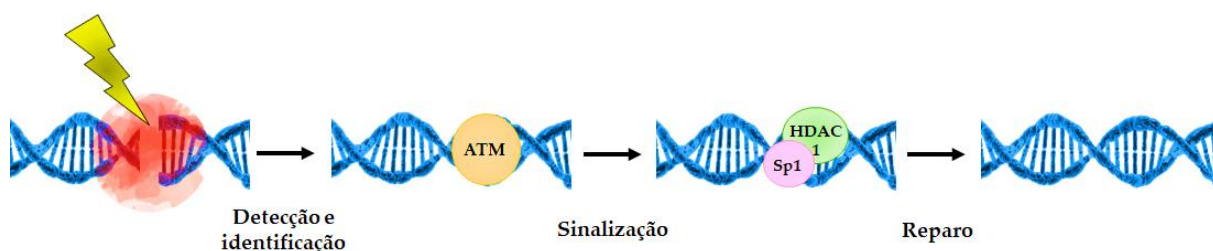
O domínio de ligação ao DNA é composto por três dedos de zinco (domínios proteicos com capacidade de ligação ao DNA) do tipo Cys2His2 com 81 aminoácidos em cada proteína, responsáveis por reconhecer as sequências GC como 5'-G/T-GGGCGG-G/A-G/A-C/T-3' ou 5'-G/T-G/A-GGCG-G/T-G/A-G/A-C/T-3' no DNA, com alta afinidade (Briggs et al., 1986). Modificações pós-traducionais no Sp1 modulam sua interação com fatores de remodelação da cromatina, DNA, maquinário de transcrição e outros fatores de transcrição para induzir ou reprimir a expressão (L. Li & Davie, 2010; Solomon et al., 2008). A alta expressão de Sp1 já foi observada em vários tipos de câncer (L. Li & Davie, 2010). O Sp1 pode aumentar a atividade de um promotor gênico ou recrutar outros complexos proteicos diversos para exercer funções ativadoras ou repressivas. A sinalização do receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) em câncer de mama, fosforila Sp1 que recruta a HDAC1 para regiões de regulação gênica formando um complexo proteico que pode envolver outros reguladores (G. Li et al., 2019).

A GM2-sintase é uma enzima que produz glicosfingolipídeos e sua alta expressão está ligada ao pior prognóstico tumoral. Sua ativação é regulada por acetilações nas histonas e diminuição do complexo repressor Sp1/HDAC1 (Banerjee et al., 2019). Em mieloma múltiplo, a inibição das HDACs foi associada a baixa regulação de Sp1 o que indica que os efeitos da expressão de HDACs pode ser mediado por Sp1 (Juli et al., 2019). A atividade de Sp1 com participação em diversos processos celulares é mediada por modificações pós-traducionais como acetilação, fosforilação, metilação e ubiquitinação (**Figura 10**), além de associação com RNAs não codificantes e outras proteínas (Beishline & Azizkhan-Clifford, 2015).



**Figura 10.** Modificações pós-traducionais das histonas H2A, H2B, H3 e H4.

A fosforilação de Sp1, por exemplo, nos resíduos Tre453 e Tre739 é induzida por HER-2/neu. Esta fosforilação aumenta a afinidade ao DNA de Sp1 e juntamente com a interação com a acetilase de histonas HDAC1, resulta na repressão da expressão do gene RECK, um inibidor de metaloproteinases (MMPs) e supressor de metástase. A inibição libera a expressão da metaloproteinase 9 (MMP-9) e contribui para o processo de invasão celular (M. C. Hsu et al., 2006). A fosforilação pode também ditar a localização de Sp1, como no caso da fosforilação do resíduo Ser101 pela ataxia-telangiectasia mutada (ATM), uma proteína quinase diretamente associada ao mecanismo celular de resposta a lesões no DNA (**Figura 11**).



**Figura 11.** A resposta ao dano do DNA é uma cascata de eventos celulares que podem ser resumidos em três estágios: detecção e identificação, sinalização e reparo.

Evidências científicas descrevem que cerca de 442 interações proteína-proteína são necessárias para a progressão de tumores ósseos (Cabrera-Andrade et al., 2020). Na linhagem celular de osteossarcoma U2OS foi demonstrado que em resposta à radiação ionizante, ATM fosforila Sp1 o que aumenta sua localização nos sítios de dupla quebra do DNA. Nestes sítios, Sp1 provavelmente atua como recrutador de proteínas modificadoras de cromatina, sendo interessante notar que HDAC1 participa no reparo de lesões de dupla fita do DNA (Miller et al., 2010) e sua interação com Sp1 já foi descrita para regulação da expressão gênica (Doetzelhofer et al., 1999).

Nosso grupo de pesquisa tem trabalhado na elucidação dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na atividade anticancerígena de compostos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados, especialmente chalconas e análogos de curcumina, contra linhagens celulares de OS (dos Santos et al., 2019; Komoto et al., 2018; Lima et al., 2018; Seba et al., 2018; Silva, Lima, et al., 2018; Silva, Marins, et al., 2018). Estes trabalhos indicam que, além de afetarem a expressão de genes relacionados à vias de apoptose e reparo do DNA, várias destas moléculas inibem a migração e invasão celular em células de OS, com possível envolvimento do fator de transcrição Sp1 e de mecanismos epigenéticos (Lima et al., 2018; Silva, Lima, et al., 2018).

Essas descobertas sugerem que essas moléculas podem ter potencial terapêutico no tratamento do osteossarcoma, ajudando a impedir a disseminação das células cancerosas para outras partes do corpo.

## **2. HIPÓTESE**

Análogos de curcumina podem ser promissores agentes terapêuticos no tratamento do câncer, através da possível modulação epigenética da atividade da proteína p53, o que irá abrir novas perspectivas para abordagens inovadoras no combate ao osteossarcoma.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Investigar o perfil citotóxico e apoptótico de análogos de curcumina, candidatos a inibidores de HDACs sobre a atividade de linhagens celulares com diferentes status da p53.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

1. Triagem de compostos com atividade inibidora de HDAC1 sobre a linhagem de osteossarcoma U2OS (p53+/+);
2. Determinar o índice de citotoxicidade do composto, que induza 50% da morte celular ( $IC_{50}$ ) nas linhagens avaliadas HaCat, HCT-116, Saos-2 (p53-/-) e U2OS p53+/+);
3. Analisar o índice de inviabilidade das células metabolicamente ativas, a fim de determinar o  $IC_{50}$  do composto frente as linhagens avaliadas, HaCat, HCT-116, Saos-2 (p53-/-) e U2OS (p53+/+);
4. Analisar o efeito atividade apoptótico do composto sobre as linhagens de OS;
5. Avaliar a atividade migratória de células U2OS (p53+/+) tratadas com o análogo de curcumina.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Compostos

Os análogos de curcumina, assim como os possíveis compostos inibidores de HDAC foram gentilmente cedidos pelo Professor Emérito Dr. Jonathan Dimmock (Universidade de Saskatchewan) (**Anexo 1**), foram dissolvidos em DMSO (Sigma Aldrich). Em todos os experimentos a concentração final de DMSO foi  $\leq 0,05\%$ . Por isso, 0,05% de DMSO foi utilizado como controle negativo em todos os experimentos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### 4.2. Linhagens celulares

Todas as linhagens celulares foram obtidas da American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). As linhagens U2OS (osteossarcoma humano p53 selvagem) e HCT-116 (carcinoma de cólon humano) foram cultivadas em meio McCoy's 5A (Corning), enquanto as linhagens HaCat (queratinócito de pele humano) e Saos-2 (osteossarcoma humano p53 nulo) em meio RPMI (Corning). Todos os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Corning), 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (Sigma Aldrich) e as células foram mantidas a 37°C sob uma atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>. As técnicas e materiais empregados no cultivo e manutenção das linhagens estão presentes no **Anexo 2**.

### 4.3. Transfecção das células de osteossarcoma U2OS p53(+/-)

As células U2OS (p53+/+) foram cultivadas em placas de 96 poços (1x10<sup>4</sup> células/poço), em seguida para a transfecção estável, foram transfectadas utilizando o ViaFect™ Transfection Reagent (Promega) com 1µg de plasmídeo contendo construções repórteres do promotor luciferase. Após 72 horas da transfecção, as células foram tratadas com 150µg/mL de higromicina em meio de cultura substituído a cada 72 horas durante 15 dias. Posteriormente, as células foram expandidas em garrafas de cultura. Para a transfecção transiente, as células foram transfectadas utilizando o ViaFect™ Transfection Reagent (Promega) com 1µg de plasmídeo contendo construções repórteres do promotor luciferase juntamente com os vetores contendo as sequências de interesse. Para o ensaio de atividade da luciferase, a ação do repórtere-luciferase foi mensurada e normalizada pela atividade luciferase do vetor pGL4.31[luc2P/GAL4UAS/Hygro] utilizando o DualGlo Luciferase Assay Kit

(Promega), de acordo com as instruções do fabricante. A detecção da luminescência foi executada em luminômetro Microplate Reader & Luminometer (Promega).

#### **4.4. Avaliação da atividade dos inibidores de HDAC**

A fim de avaliar a atividade inibidora de HDAC dos compostos, utilizamos o HDAC-Glo™ I/II Assay and Screening System (Promega). Os compostos foram diluídos à 50nM ou 500nM e a Tricostatina A (TSA) (controle positivo) à 50nM ou 500nM, em HDAC-Glo™ I/II Buffer, assim como o extrato Nuclear de HeLa (1:3000) (fonte enzimática). Posteriormente, foi adicionado 50µL dos compostos diluídos juntamente com 50µL do extrato por poço, realizamos breve agitação em shaker orbital (100rpm) por 1 minuto, seguida de incubação da placa em temperatura ambiente por 1 hora. Após este período, foi adicionado 100µL de HDAC-Glo™ I/II Reagent por poço seguido por nova agitação de 1 minuto. Após 15, 30 e 45 minutos respectivamente, a luminescência foi mensurada em luminômetro Microplate Reader & Luminometer (Promega). A atividade dos compostos como inibidores de HDAC foram calculadas da seguinte forma:  $\text{=(inibição final/extrato inicial) * 100}$ .

#### **4.5. Ensaio de citotoxicidade celular**

A determinação da citotoxicidade foi realizada através do ensaio CellTox™ Green Cytotoxicity Assay (Promega). As células U2OS (p53+/+) foram semeadas em placas de 96 poços ( $1 \times 10^4$  células/poço) e após a adesão celular, foram tratadas com 0 e 10µM de cada composto, em meio de cultura contendo 10% de SFB por 48 horas. Após o tratamento para mensurar a proliferação celular, 20µL de CellTox™ Green Reagent 2x (Promega) foram adicionados a cada poço, seguido por agitação de 1 minuto em shaker orbital (100rpm) e incubação por 15 minutos, no escuro, em temperatura ambiente. Finalmente, a fluorescência do controle e dos tratamentos foi mensurada em luminômetro Microplate Reader & Luminometer (Promega).

#### **4.6. Ensaio de viabilidade celular**

A determinação da viabilidade foi realizada através do ensaio CellTiter-Glo® 2.0 (Promega). As células U2OS (p53+/+) foram semeadas em placas de 96 poços ( $1 \times 10^4$  células/poço) e após a adesão celular, foram tratadas com 0 e 4µM de cada composto, em meio

de cultura contendo 10% de SFB por 24 e 48 horas. Após o tratamento, para mensurar a proliferação celular, 100µL de CellTiter-Glo® 2.0 Reagent (Promega) foram adicionados a cada poço, seguido por agitação de 2 minutos em shaker orbital (100rpm) e incubação por 10 minutos em temperatura ambiente. Finalmente, a luminescência do controle e dos tratamentos foi mensurada em luminômetro Microplate Reader & Luminometer (Promega).

#### **4.7. Ensaio da atividade das caspases 3/7**

A atividade enzimática das caspases 3/7 foi mensurada através do Caspase-Glo® 3/7 Assay Technology (Promega). Basicamente, as células de OS foram semeadas em placas de 96 poços ( $1 \times 10^5$  células/poço) e após a adesão celular, foram tratadas com 0 e 5µM do análogo de curcumina selecionado (2615) e de doxorrubicina (controle positivo) por 12, 24 e 48 horas. Após o tratamento, para mensurar a proliferação celular, 75µL de Caspase 3/7Glo® Reagent (Promega) foram adicionados a cada poço, seguido por agitação de 30 segundos em shaker orbital (300rpm) e incubação por 30 minutos, 45 minutos e 1 hora à 37°C. Finalmente, a luminescência do controle e dos tratamentos foi mensurada em luminômetro Microplate Reader & Luminometer (Promega).

#### **4.8. Análise da apoptose e necrose celular**

A determinação da exposição em tempo real da fosfatidilserina na superfície externa da membrana celular durante o processo apoptótico, foi detectada através do RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay (Promega). As células de OS foram semeadas em placas de 96 poços ( $1 \times 10^4$  células/poço) e após a adesão celular, foram tratadas com o composto 2615 e com doxorrubicina (controle positivo) à 0 e 5µM, seguida por adição do 2x Detection Reagent e incubação por 12, 24 e 48 horas. A indução de apoptose foi mensurada a partir da ligação da Anexina V, seguida por necrose obtida após a perda de integridade da membrana. A luminescência do controle e dos tratamentos foi mensurada em luminômetro Microplate Reader & Luminometer (Promega).

#### **4.9. Ensaio de migração celular**

A avaliação da atividade migratória foi realizada através do método *Wound-healing*. As células U2OS (p53+/+) foram semeadas em placas de 24 poços ( $1 \times 10^6$  células/poço) e após a

adesão celular, com auxílio de uma ponteira de 10 µL, foi feita uma “ferida” na monocamada, criando uma área livre de células. O meio de cultura foi retirado e os poços foram lavados com Hanks à 37°C. As células foram então tratadas com 0 e 6µM do composto 2615 em meio de cultura contendo 10% de SFB por 24 e 48 horas. Os poços foram fotografados no tempo 0h, 24h e 48h. O índice de migração celular foi determinado pela diferença da área da “ferida” na comparação do tempo 0h com os tempos 24h e 48h, utilizando-se o programa Image J. As taxas de migração das células tratadas com o composto 2615 e com DMSO foram calculadas da seguinte forma: taxa de migração (%) = (área da ferida às 0 horas - área da ferida às 24 horas) / área da ferida às 0 horas \* 100%.

#### **4.10. Análise Estatística**

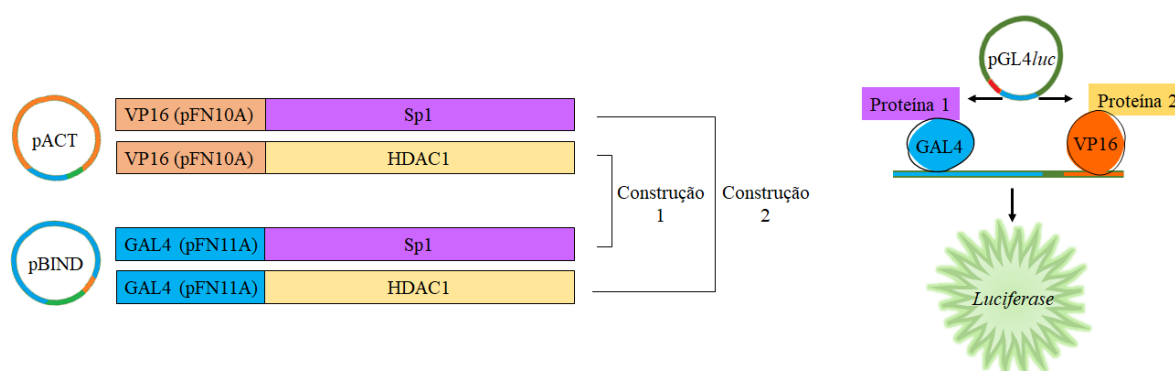
Análises estatísticas foram realizadas com o teste *t* de Student não pareado. Os dados são expressos como média ± desvio padrão de no mínimo três experimentos independentes, utilizando o software GraphPad Prism 9.0. Os resultados foram considerados estaticamente significativos para \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$  e \*\*\*\* $p \leq 0.0001$  (CN - DMSO 0,05% vs tratamento).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Análise da interação entre HDAC1 /Sp1

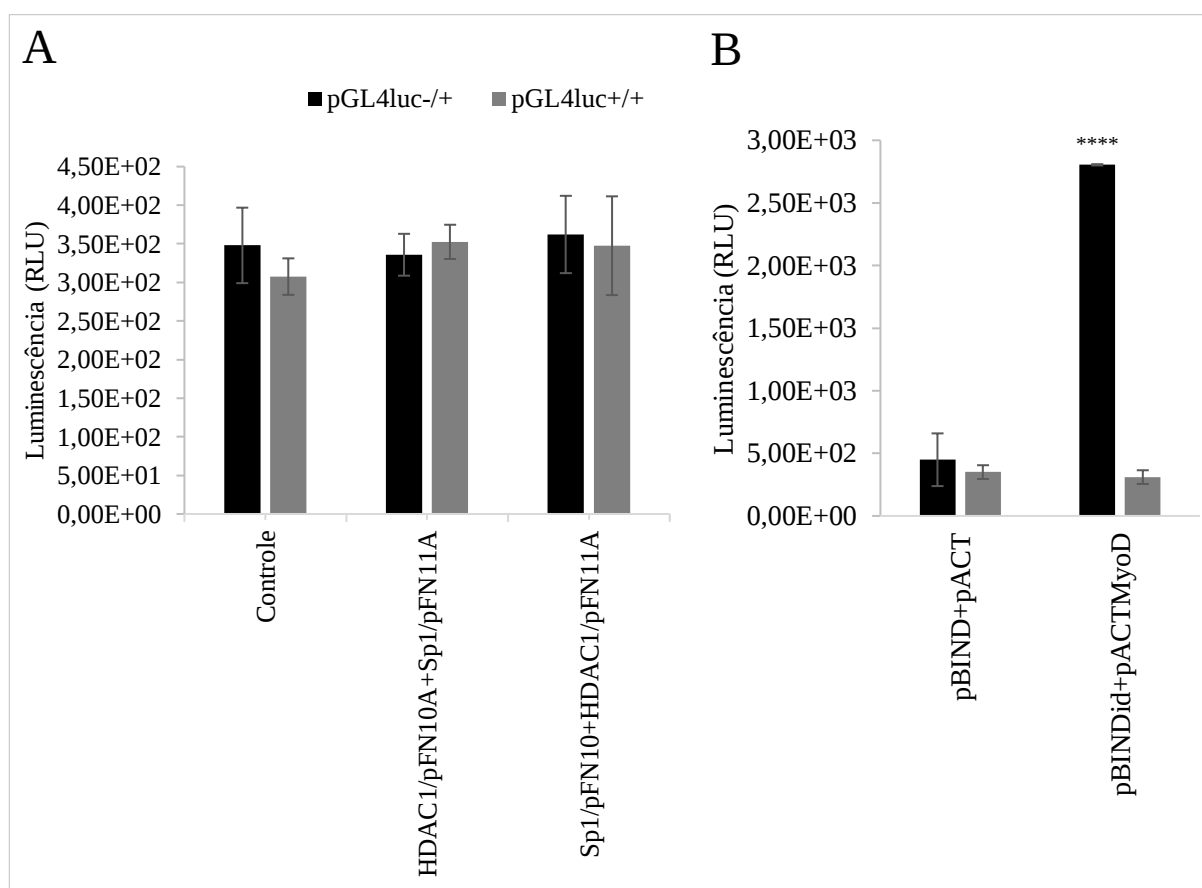
Considerando o papel das modificações pós-traducionais na determinação da atividade transcricional de Sp1 e sua interação com outras proteínas como HDAC1 (J. H. Huang et al., 2020; W. Bin Yang et al., 2020), relatamos um sistema para o desenvolvimento de inibidores do complexo HDAC1/Sp1 utilizando o método duplo-híbrido de mamíferos.

Para este ensaio, um gene que codifica uma proteína de interesse (Proteína 1) é fundido ao domínio de ligação ao DNA da proteína pACT, enquanto outro gene (Proteína 2) é fundido ao domínio de ativação transcricional da proteína pBIND. Essas construções de duplo híbrido são cotransfectadas em uma linhagem celular hospedeira de mamífero juntamente com o plasmídeo repórter (pGL4luc). Se as proteínas de interesse interagem, elas criam um ativador de transcrição funcional, trazendo o domínio de ativação próximo ao domínio de ligação ao DNA, detectado pela expressão do plasmídeo repórter (pGL4luc). A inserção em cada vetor deve estar na orientação e fase de leitura aberta (ORF – do inglês *open reading frame*) corretos. Sendo assim, podemos observar que algumas inserções podem ter direcionalidade ou preferência de vetor. Neste contexto, as interações entre as proteínas podem parecer mais fortes, condicionando um vetor específico para as inserções. Devido a esse fenômeno, subclonamos cada cDNA de interesse nos vetores pACT e pBIND e testamos as duas possíveis interações de proteínas de fusão (**Figura 12**).



**Figura 12.** Representação esquemática do sistema duplo híbrido de mamíferos. Esquema ilustrando as construções usadas no ensaio. O GAL4 no vetor pBIND e o domínio de ativação VP16 do vetor pACT são mostrados em azul e laranja, respectivamente. O vetor pGL4luc contém sítios de ligação GAL4 (verde) a montante de uma caixa TATA mínima (vermelho), que por sua vez está a montante do gene da luciferase. O vetor pBIND contém GAL4 e o pACT, o domínio de ativação VP16. A interação entre as proteínas de interesse (HDAC1 e Sp1), a partir de construtos de fusão GAL4 e VP16, resulta na expressão de luciferase.

Para a análise da interação entre as proteínas de interesse (HDAC1/Sp1), as células U2OS (p53+/+) foram transfectadas de forma transiente (pGL4luc-/+) com os vetores Sp1 e HDAC1 juntamente com o vetor da luciferase (pGL4luc), também realizamos a transfecção estável (pGL4luc+/+) do vetor pGL4luc de forma isolada nas células U2OS (p53+/+) e após o crescimento celular e tratamento com o antibiótico de seleção (higromicina à 150µg), transfectamos os outros dois vetores (Sp1 e HDAC1) (**Figura 13A**). Os níveis de sinal de fundo (ruído) de luciferase do vetor pG4luc são determinados na presença dos vetores vazios pACT e pBIND (controle negativo). A reação de controle positivo fornece níveis de luciferase acima dos níveis de fundo mensurados na transfecção, os vetores utilizados (pBINDid/pACTMyoD) codificam e expressam duas proteínas conhecidas por interagirem *in vivo* (**Figura 13B**).



**Figura 13. (A)** Células não transfectadas foram utilizadas como Controle, os vetores Sp1, HDAC1 e pGL4luc foram transfectados em células U2OS (p53+/+) e a atividade da luciferase foi detectada (pGL4luc-/+). O repórter pGL4luc foi transfectado de forma isolada nas células U2OS (p53+/+) e após 15 dias, transfectamos os repórteres Sp1 e HDAC1 (pGL4luc+/+). **(B)** Controles negativo (pBIND+pACT) e positivo (pBINDid+pACTMyoD) da transfecção. Após 24 horas, os dados foram registrados como unidades relativas de luz (RLU) através de um luminômetro. As barras de erro indicam média  $\pm$  DP. \*\*\*  $p < 0.0001$ .

A atividade da luciferase obtida no controle positivo, não foi observada na transfecção dos plasmídeos de interesse no ensaio realizado, o que pode indicar impurezas no DNA e baixa eficiência da transfecção. A fraca interação entre as proteínas clonadas nos vetores, também pode indicar a necessidade de moléculas adicionais que possibilitem a correta interação entre Sp1 e HDAC1, tendo em vista que elas podem fazer parte de um complexo multicomponente. Em células de glioblastoma, observa-se a formação da via HDAC1/2/6/Sp1, que atua sobre diferentes fatores de transcrição, responsáveis pela progressão tumoral quando associada a piores prognósticos (W. Bin Yang et al., 2020).

Apesar de a Sp1 e a HDAC1 estarem positivamente reguladas no osteossarcoma (J. H. Huang et al., 2020), o que pode indicar uma visão abrangente das características moleculares e alvos terapêuticos, outras vias e fatores de transcrição podem estar envolvidos na formação deste complexo. É importante mencionar que o entendimento do papel exato da Sp1 no osteossarcoma ainda está em desenvolvimento, e mais pesquisas são necessárias para determinar as implicações terapêuticas precisas dessa proteína na doença.

Embora grandes avanços tenham sido feitos nas últimas décadas, a terapêutica para o osteossarcoma é bastante limitada. Centenas de potenciais alvos terapêuticos foram identificados até o momento, porém a compreensão destes como reguladores do osteossarcoma é incerta. As HDACs 1 e 2 podem atuar como possíveis biomarcadores prognósticos, pois sua expressão aumentada tem sido direcionada a uma expectativa menos favorável (McGuire et al., 2020). Embora os tumores ósseos tenham alta morbimortalidade, os mecanismos moleculares subjacentes ao desenvolvimento e progressão ainda são pouco explorados, sendo assim, modelos mais direcionados são necessários para um maior entendimento a respeito da biologia básica do OS, a fim de possibilitar a tradução para ensaios clínicos.

Uma ampla gama de fitoconstituintes tem sido investigada por sua capacidade de prevenir a carcinogênese, tanto em testes de laboratório (*in vitro*) quanto em modelos vivos (*in vivo*), por meio de várias abordagens celulares e moleculares (Majrashi et al., 2023; Rudzińska et al., 2023). Além disso, há uma crescente exploração de informações sobre fatores limitantes específicos, como o microambiente tumoral e a biodisponibilidade dos componentes ativos dos biomoléculas orgânicas usados em ensaios pré-clínicos e clínicos (Iyer et al., 2023). Em nosso trabalho, temos buscado compreender os mecanismos envolvidos na biologia do osteossarcoma, assim como na quimiorresistência adquirida, frequentemente observada nos pacientes. Temos buscado novas estratégias terapêuticas para sensibilizar as células

cancerígenas, já demonstramos que análogos de curcumina podem suprimir vias de reparo do dano do DNA e ser usada para aumentar a eficácia dos tratamentos (Seba et al., 2018). Sendo assim, optamos por investigar a atividade biológica de análogos de curcumina com potencial inibidor de HDACs de classes I e II.

5.2. Análise da atividade inibitória dos compostos iHDAC

A princípio, avaliamos o efeito de 78 análogos de curcumina divididos em dois grupos. O Grupo I engloba 21 compostos utilizados em trabalhos anteriores do nosso laboratório e a concentração escolhida foi a indicada para a TSA (50nM), que inibe seletivamente as famílias de enzimas histonas desacetilases de mamíferos de classe I e II. A **Tabela 1** apresenta os dados obtidos dos 10 compostos de melhor atividade iHDAC deste grupo. Estes compostos apresentaram baixa eficácia na inibição da atividade de HDACs quando comparados a atividade observada pela TSA. Sendo assim, avaliamos os 57 compostos do Grupo II em maior concentração (500nM), assim como a substância controle (TSA). Este grupo é composto por novos análogos de curcumina, desenhados especificamente para inibir HDACs. Seu desenvolvimento foi realizado substituindo ou introduzindo diferentes porções funcionais em diversas posições de sua estrutura, a **Tabela 2** apresenta os dados obtidos dos 10 compostos de melhor atividade iHDAC. As modificações realizadas na estrutura básica de curcumina buscam uma maior variedade de análogos com atividades biológicas e anticancerígenas aprimoradas. Os compostos de ambos os grupos foram analisados em três tempos diferentes.

**Tabela 1.** Atividade das HDACs (%) dos compostos presentes no Grupo I à 50nM. Foram utilizados os controles negativo (extrato de HeLa) e positivo, TSA à 50nM. Os experimentos foram realizados em 15, 30 e 45 minutos.

| Grupo I    |          |             |      |      |      |      |      |      |      |      |     |     |
|------------|----------|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|
| *          | Controle | TSA<br>50nM | 2611 | 2612 | 2613 | 2615 | 2616 | 1831 | 2624 | 2625 | D14 | D15 |
| 15 minutos | 100      | 37          | 96   | 94   | 92   | 98   | 97   | 96   | 97   | 97   | 96  | 95  |
| 30 minutos | 100      | 73          | 111  | 111  | 108  | 113  | 112  | 112  | 113  | 113  | 113 | 114 |
| 45 minutos | 100      | 75          | 112  | 112  | 108  | 113  | 112  | 112  | 113  | 120  | 113 | 113 |

\* Resultados apresentados em % de atividade.

**Tabela 2.** Atividade das HDACs (%) dos compostos presentes no Grupo II à 500nM. Foram utilizados os controles negativo (extrato de HeLa) e positivo, TSA à 500nM. Os experimentos foram realizados em 15, 30 e 45 minutos.

|            |          | Grupo II     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|------------|----------|--------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| *          | Controle | TSA<br>500nM | 2626 | 2629 | 2630 | 2659 | 2660 | 2664 | 2667 | 2680 | 2682 | 2684 |
| 15 minutos | 100      | 0,57         | 55   | 54   | 54   | 54   | 54   | 54   | 54   | 52   | 54   | 53   |
| 30 minutos | 100      | 0,53         | 55   | 54   | 54   | 55   | 54   | 54   | 54   | 53   | 55   | 55   |
| 45 minutos | 100      | 0,53         | 61   | 54   | 54   | 55   | 54   | 54   | 55   | 54   | 56   | 55   |

\* Resultados apresentados em % de atividade.

Os análogos de curcumina avaliados apresentaram atividade iHDAC semelhante entre si, de acordo com cada grupo respectivo. O primeiro tempo avaliado (15 minutos) foi o que apresentou resultados mais promissores em todos os análogos analisados, porém a inibição obtida pelos compostos à 50nM (Grupo I) não foi tão eficaz quanto a obtida pela TSA à 50nM, o que também foi observado nos compostos do Grupo II em comparação à TSA nas mesmas concentrações (500nM).

A TSA é um potente iHDACs e tem sido amplamente estudada por suas potenciais aplicações terapêuticas em várias áreas, incluindo tratamento de câncer e pesquisa epigenética. No entanto, existem desafios e limitações associados ao uso da TSA, tais como sua baixa biodisponibilidade, sendo rapidamente metabolizada ou ter penetração tecidual limitada, afetando sua eficácia em atingir as células-alvo pois possui efeito citostático, atuando sobre a diferenciação celular e/ou a apoptose de células em proliferação (Jian et al., 2019), limitando aplicabilidade clínica. Devido ao seu amplo impacto na expressão gênica e nas vias celulares, a TSA pode ter efeitos fora do alvo, levando potencialmente a consequências não intencionais ou eventos adversos.

A exposição prolongada ao TSA pode levar ao desenvolvimento de resistência nas células cancerígenas, reduzindo sua eficácia a longo prazo como opção de tratamento (B. Wang et al., 2014). A resistência a múltiplas drogas (MDR, do inglês "*Multidrug Resistance*") no câncer é um fenômeno em que as células cancerosas se tornam insensíveis ou resistentes a várias classes diferentes de medicamentos, tornando o tratamento eficaz mais desafiador. Isso é especialmente problemático no contexto da quimioterapia, onde o objetivo é usar drogas para

destruir as células cancerosas ou impedir seu crescimento. A constante evolução das células cancerosas que desenvolvem resistência a múltiplos agentes terapêuticos pode restringir consideravelmente as opções disponíveis. A MDR no osteossarcoma, é um desafio significativo que afeta o sucesso das estratégias de tratamento. Embora a TSA tenha se mostrado promissora em ambientes de laboratório e estudos com animais, traduzir essas descobertas em tratamentos clínicos seguros e eficazes para humanos requer testes rigorosos, incluindo abordar as preocupações mencionadas acima. Pesquisadores continuam a estudar a TSA, e esforços estão em andamento para enfrentar esses desafios. Além disso, o desenvolvimento de iHDACs mais seletivos com toxicidade reduzida e farmacocinética aprimorada, é uma área ativa de pesquisa para superar algumas das limitações associadas à TSA. Tendo em vista que os iHDAC modulam e modificam as proteínas histonas e não histonas, inibem a invasão celular, induzem apoptose e sensibilizam as células à quimioterapia (Kaur et al., 2019; Ramaiah et al., 2021), o direcionamento dessas proteínas poderia simplificar a detecção de agentes anticancerígenos com potencial promissor.

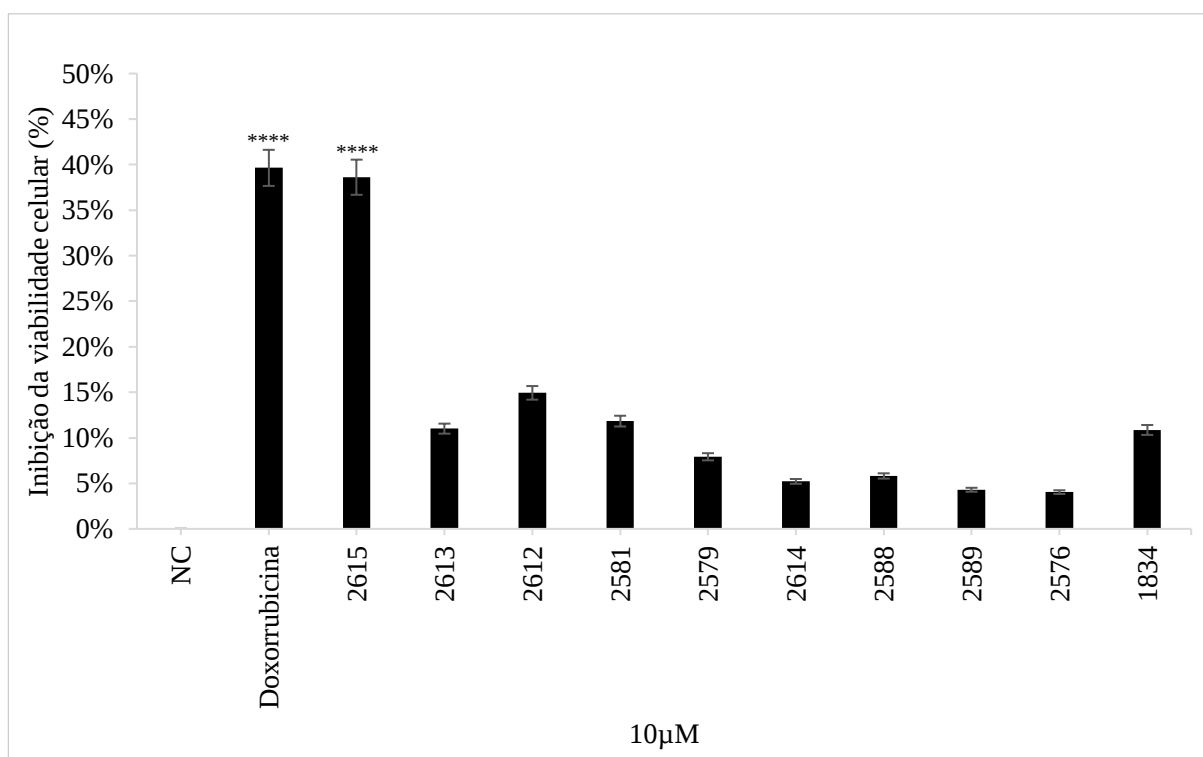
Uma possível alternativa contra os efeitos adversos presentes nos iHDACs disponíveis atualmente, é a busca por compostos que apresentem atividade sinérgica com essas drogas, podendo atuar também, em outras proteínas envolvidas no processo de carcinogênese. O tratamento combinado com TSA e paclitaxel inibiu a proliferação de células de câncer endometrial (Dowdy et al., 2006), demonstrando que a TSA aumenta sinergicamente os efeitos citotóxicos do paclitaxel, além de mediar a supressão da via ERK em células de carcinoma urotelial (F. S. Hsu et al., 2019). A TSA tem desempenhado funções sobre diferentes proteínas e vias, mecanismo pelo qual potencialmente atue com vários medicamentos quimioterápicos.

Outro estudo mostrou que a TSA, promoveu a apoptose de células de osteossarcoma através da reativação da via de sinalização p53 (Z. Deng et al., 2016). Estes estudos fornecem evidências de que a acetilação de proteínas não histonas é um possível mecanismo pelo qual os iHDACs reduzem o crescimento do câncer e ainda, sabendo que a eficácia antitumoral da TSA pode ser potencializada sinergicamente pela sua combinação com outros compostos. A recuperação da atividade da p53 em células cancerígenas pode induzir a regressão de diversos tipos de tumores, tais como o osteossarcoma (Samsa et al., 2020) carcinomas de cólon (Hu et al., 2018). Essa abordagem oferece a vantagem adicional, pois não afeta significativamente os tecidos normais através do restabelecimento genético do p53. Juntamente com sua estabilização, a restauração funcional da p53 por meio de compostos específicos mostra-se uma estratégia promissora no desenvolvimento de novas terapias contra o câncer. Resultados

anteriores do nosso grupo de pesquisa, sugerem que o um análogo de curcumina (CH-5) possui atividade anticâncer reguladas pelos fatores de transcrição Sp1 e p53 (Lima et al., 2018). Sendo assim, a p53 é um alvo atraente para terapias anticâncer, restaurar sua função ou explorar vias alternativas que dependam da p53 disfuncional pode levar ao desenvolvimento de tratamentos inovadores que visam especificamente células cancerosas, minimizando o impacto em células saudáveis.

### 5.3. Análise da atividade citotóxica dos análogos de curcumina

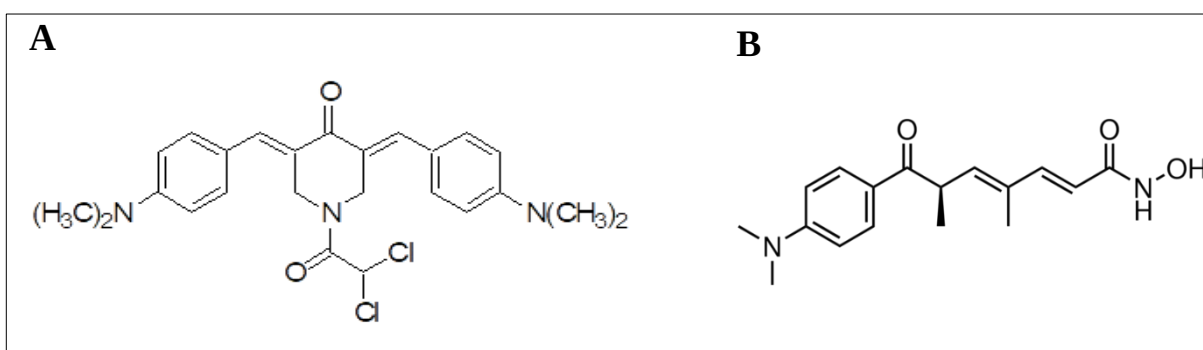
A fim de determinar a toxicidade dos 78 análogos de curcumina testados na triagem anterior, avaliamos a viabilidade de células U2OS (p53+/+) tratadas com os compostos à 10 $\mu$ M. A **Figura 14** apresenta o resultado dos 10 análogos com maior potencial citotóxico, assim como a citotoxicidade do quimioterápico doxorrubicina (controle positivo) os experimentos foram realizados em 48h.



**Figura 14.** As células U2OS (p53+/+) foram tratadas com 10  $\mu$ M de diferentes compostos ou 5  $\mu$ M de doxorrubicina, e após 48 h sua viabilidade foi mensurada por fluorescência. Cada experimento foi realizado em triplicata. (CN: controle negativo DMSO 0,5%). Em todos os experimentos, os dados representam a média  $\pm$  DP de três experimentos. \*\*  $p \leq 0,007$  em comparação com o CN.

Dentre os análogos de curcumina testados, é interessante observar que poucos destes apresentaram boa atividade iHDAC (**Tabelas 1 e 2**). A atividade iHDAC dos análogos de curcumina pode regular a expressão gênica em células cancerosas, ajudando a controlar seu crescimento e sobrevivência através de diferentes mecanismos (W. Li et al., 2016, 2018). No entanto, é importante ressaltar que a pesquisa nessa área está em andamento, e diversas vias podem ser moduladas, influenciando a capacidade de atuação dos compostos, assim como no nosso estudo.

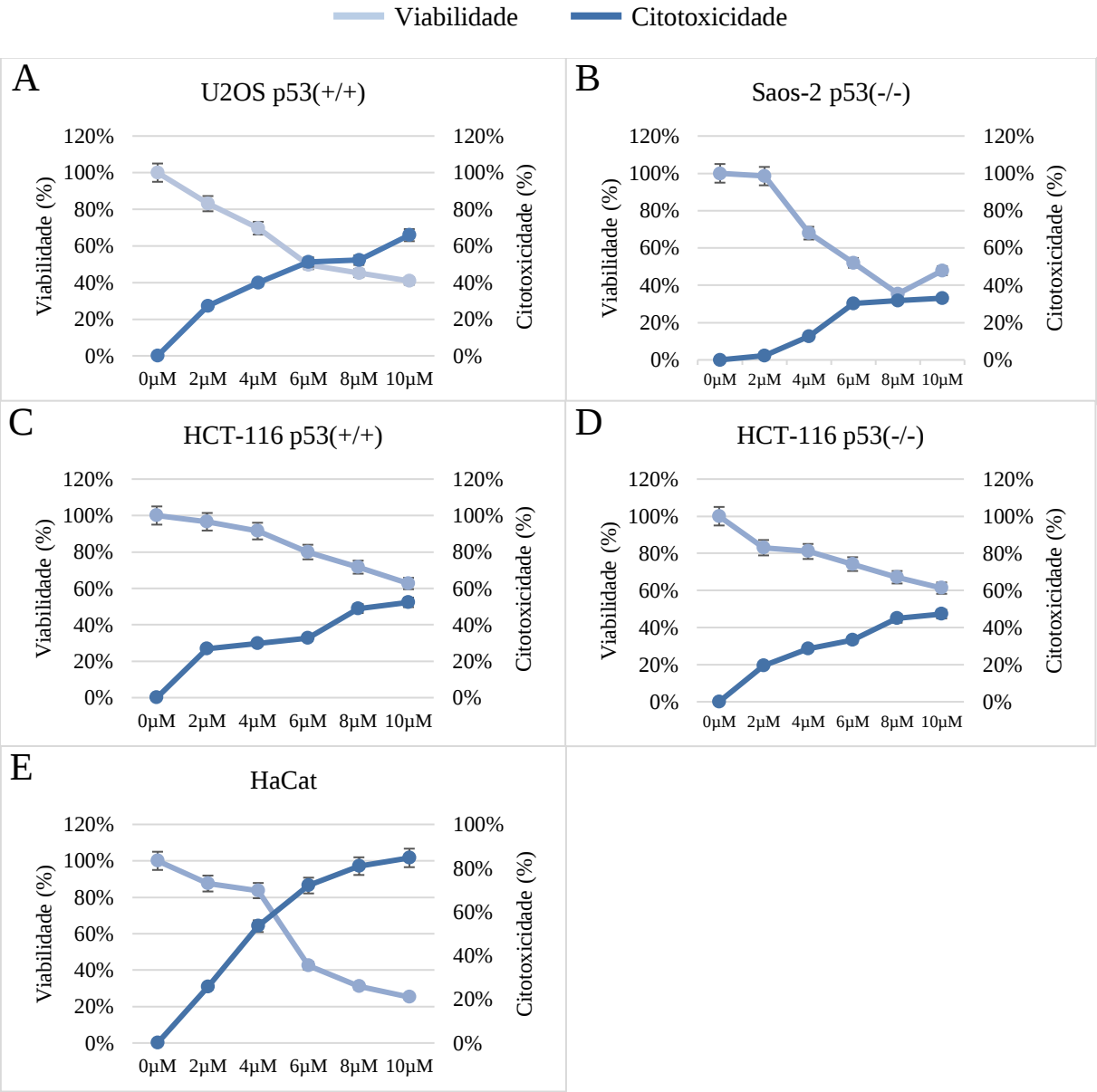
O composto 2615 apresentou maior atividade citotóxica contra as células de osteossarcoma U2OS (p53+/+) (39%), atividade semelhante a obtida pela doxorrubicina (40%). Este composto (2615) em especial (**Figura 15A**), possui estrutura química semelhante à da TSA (**Figura15B**).



**Figura 15.** Estrutura química do análogo de curcumina 2615 (**A**) e da Tricostatina A (**B**).

O mecanismo de inibição da TSA sobre as HDACs resulta em hiperacetilação das histonas, levando a alterações na estrutura da cromatina, relaxando a compactação do DNA e, consequentemente, tornando os genes mais acessíveis para a maquinaria de transcrição, ou seja, a TSA modifica o ambiente epigenético, promovendo uma maior acessibilidade aos genes (W. S. Xu et al., 2007). O aumento na acessibilidade dos genes pode reativar proteínas supressoras de tumor como a p53(Xia et al., 2022), bem como, induzir apoptose (Patra et al., 2019). Tendo em vista a potencial atuação dos análogos de curcumina aqui avaliados, decidimos caracterizar a atividade do 2615 sobre a p53, inicialmente utilizando linhagens celulares de câncer com diferentes status da proteína p53. A fim de obter uma curva de dose-reposta para melhor investigação sobre a citotoxicidade deste composto em específico, determinamos os valores de IC<sub>50</sub> (concentração que inibe 50% da viabilidade celular). A compreensão das resposta dose-dependente é fundamental para determinar a faixa de concentração mais eficaz do composto

analisado, avaliar a toxicidade potencial e entender melhor a relação entre uma substância e seus efeitos biológicos. Para tal, avaliamos a citotoxicidade celular (azul-claro) e simultaneamente a viabilidade celular (azul escuro) em 48h, nas concentrações de 0µM, 2µM, 4µM, 6µM, 8µM e 10µM em diferentes linhagens celulares **Figura 16**. As legendas das curvas têm de estar na legenda do gráfico



**Figura 16.** A toxicidade do análogo 2615 foi testada em ensaio multiplex. **(A)** U2OS (p53+/-), **(B)** Saos-2 (p53-/-), **(C)** HCT-116 (p53+/-), **(D)** HCT-116 (p53-/-) e **(E)** HaCat foram tratadas com várias concentrações do análogo 2615 e por 48 h. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos individuais.

Os dados apresentados acima são demonstrados como fluorescência que está associada à citotoxicidade e luminescência, associada à viabilidade celular. Essas medidas inversas produzem valores IC<sub>50</sub> semelhantes. A partir das curvas dose-resposta, obteve-se os valores de IC<sub>50</sub> apresentados na **Tabela 3**.

**Tabela 3.** Valores de IC<sub>50</sub> do composto 2615 para as linhagens de osteossarcoma U2OS (p53+/+) e Saos-2 (p53-/-), para as linhagens de carcinoma de cólon HCT-116 (p53+/+) e HCT-116 (p53-/-), assim como para a linhagem normal de queratinócitos de pele HaCat.

|                         | 2615            |              |
|-------------------------|-----------------|--------------|
|                         | Citotoxicidade* | Viabilidade* |
| <i>U2OS (p53+/+)</i>    | 5,24            | 1,61         |
| <i>Saos-2 (p53-/-)</i>  | 4,77            | 3,89         |
| <i>HCT-116 (p53+/+)</i> | 4,67            | 1,89         |
| <i>HCT-116 (p53-/-)</i> | 4,67            | 1,44         |
| <i>HaCat</i>            | 4,81            | 4,80         |

\*Resultados apresentados em concentrações micro molares (μM).

A citotoxicidade e inibição da viabilidade celular apresentam diferenças pontuais entre ambas. O teste de citotoxicidade, mensura os parâmetros associados à perda de integridade da membrana após a morte celular e baseia-se em um pró-substrato que juntamente com a luciferase são adicionados diretamente ao meio de cultura celular, como um reagente. As células viáveis com um metabolismo ativo reduzem o pró-substrato em um substrato, que é usado pela luciferase, para gerar um sinal luminescente, ou seja, este ensaio baseia-se na conversão da luciferina em oxiluciferina, catalizada pela enzima luciferase junto ao ATP celular, produzindo luminescência. O reagente é bem tolerado pelas células (não depende da lise celular) e é estável. Já o teste de viabilidade celular foi mensurado através da análise das células metabolicamente ativas na cultura celular mensurando marcadores celulares, como o ATP como indicadores da saúde das células, a fim de avaliar sua atividade qualitativa e quantitativamente.

Ambos os ensaios, de citotoxicidade e viabilidade celular, são ferramentas valiosas para avaliar os efeitos de substâncias em células, mas eles enfocam aspectos diferentes. A citotoxicidade concentra-se mais na morte celular causada diretamente por uma substância,

enquanto a viabilidade celular avalia a proporção de células vivas após um tratamento. Ambos os tipos de ensaios têm aplicações importantes na pesquisa científica e no desenvolvimento de produtos.

Podemos observar que, o composto apresentou um valor de  $IC_{50}$  menor para a linhagem de osteossarcoma que expressa a p53, U2OS (p53+/+) do que para a linhagem p53 nula, Saos-2 (p53-/-), quanto a viabilidade, 1,61 $\mu$ M (\*\*p < 0.0003) e 3,89 $\mu$ M (\*\*p < 0.001) respectivamente). Indicando uma possível participação da p53 na atividade desse análogo. Entretanto, este resultado não foi observado nas linhagens de carcinoma de cólon, HCT-116 (p53+/+) e HCT-116 (p53-/-) (1,89 $\mu$ M e 1,44 $\mu$ M respectivamente) sendo assim, não podemos descartar que nas linhagens de osteossarcoma pode ter ocorrido maior resistência, independente de p53, da linhagem Saos-2 (p53-/-). A citotoxicidade de compostos em células de osteossarcoma pode ser influenciada pela presença ou ausência de p53 funcional. Células de osteossarcoma com p53 funcional podem ser mais propensas a responder à citotoxicidade induzida por compostos, enquanto células com p53 mutante ou inativa podem ser mais resistentes ao tratamento (Celik et al., 2022). No entanto, a resposta à citotoxicidade é uma interação complexa, envolvendo não apenas a presença ou ausência de p53 funcional, mas também outros fatores genéticos e propriedades dos próprios compostos. Portanto, a relação entre a p53 e a citotoxicidade deve ser avaliada considerando todos esses aspectos.

É interessante observar que o valor de  $IC_{50}$  para a linhagem normal de queratinócito humano HaCat no teste de viabilidade celular, foi superior aos resultados encontrados para as linhagens cancerígenas, o que indica uma seletividade potencial do composto testado contra células tumorais. Inicialmente, pensou-se que essas células tivessem um gene p53 do tipo selvagem, mas pesquisas posteriores revelaram que as células HaCaT abrigam uma mutação no gene p53, uma mutação que leva a uma proteína não funcional (Lehman et al., 1993).

A p53 é a mais importante proteína de supressão tumoral, pois possui várias funções vitais que desempenha no controle do ciclo celular, manutenção da integridade do DNA e prevenção da formação de tumores (Brown et al., 2023) e normalmente está inativada em células tumorais. Sua ativação envolve a estabilização da proteína, aumento da atividade transcricional e ligação ao DNA. Uma vez estabilizada, a p53 pode acumular-se no núcleo e desencadear a ativação de diversos genes alvos (Hanson et al., 2019). Portanto, a ativação da p53 tem importante implicação no bloqueio da carcinogênese. O que demonstra que os efeitos observados em nosso trabalho, após o tratamento com o 2615 (indução da p53) em células

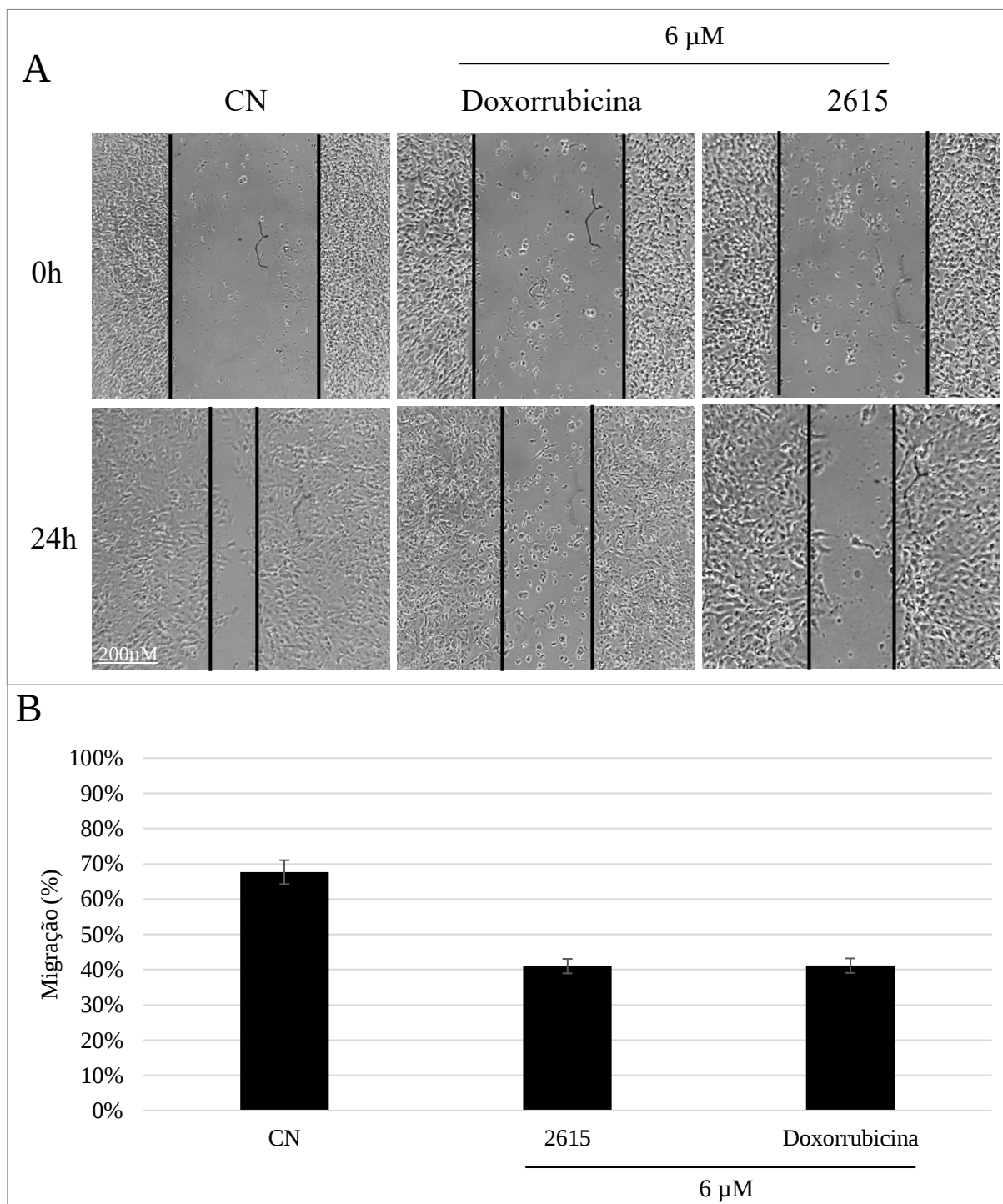
U2OS (p53+/+) são importantes e promissores, visto que este análogo atuou sobre uma proteína de grande importância no desenvolvimento de estratégias terapêuticas.

#### **5.4. Análise da inibição do crescimento das células de osteossarcoma U2OS (p53+/+) pelo ensaio de cicatrização celular (*Wound-Healing*)**

O processo de migração celular é fundamental para o desenvolvimento embrionário, angiogênese, cicatrização de feridas, resposta imune e inflamação. Porém, a migração celular descontrolada é uma das principais causas da metástase, evento em que as células neoplásicas precisam se desprender do tumor primário para invadir a membrana basal, o sistema vascular e através deste, atingir sítios distantes, onde poderão colonizar outros tecidos e órgãos (Novikov et al., 2021). Como a doença metastática é o principal fator que leva à mortalidade por câncer, entender os mecanismos de migração celular é essencialmente importante nos estudos oncológicos. Sendo assim, a migração e invasão celular são fundamentais para o processo de metástase e, assim, são consideradas alvos promissores para bloquear o processo metastático.

O ensaio de cicatrização celular é normalmente utilizado para quantificar a migração celular em superfícies bidimensionais (2-D) ao longo do tempo. É um dos ensaios *in vitro* de mais comumente usados para este fim, permitindo determinar a dose ideal dos agentes que estão sendo testados. As células são cultivadas até 100% de confluência em monocamada, e uma cicatriz é feita com uma ponteira de pipeta para criar um espaço semelhante a uma incisão. A área "ferida" é fotografada imediatamente após o ferimento (0h) e em pontos de tempo definidos posteriormente (24 e 48h), e a migração celular é quantificada e expressa como porcentagem média de fechamento da área arranhada.

Para tal, avaliamos o efeito inibitório do composto 2615, assim como da doxorrubicina, sobre a migração das células U2OS (p53+/+). As concentrações foram 0 $\mu$ M (CN) e 6 $\mu$ M e o ensaio foi realizado através da técnica de cicatrização. Verificamos que o tratamento com o composto 2615 reduziu a migração das células cancerígenas U2OS (p53+/+) em cerca de 25%, resultado semelhante ao obtido pela doxorrubicina em 24h (**Figura 17**).



**Figura 17.** Os efeitos do 2615 na concentração de 6 $\mu$ M foram avaliados sobre a capacidade migratória das células U2OS (p53+/+). **(A)** Uma monocamada confluyente foi ferida com uma ponta de pipeta estéril e as células foram deixadas migrar por 24h na presença de doxorrubicina ou 2615. **(B)** Gráfico de barras resumido ilustrando a porcentagem de fechamento. As barras de erro indicam média  $\pm$  EP. Cada experimento foi realizado em triplicata. (CN: controle negativo DMSO 0,5%). Não houve significância estatística.

A migração celular desempenha um papel crucial no desenvolvimento e progressão do câncer. As células mutadas adquirem a capacidade de se moverem a partir do local original de

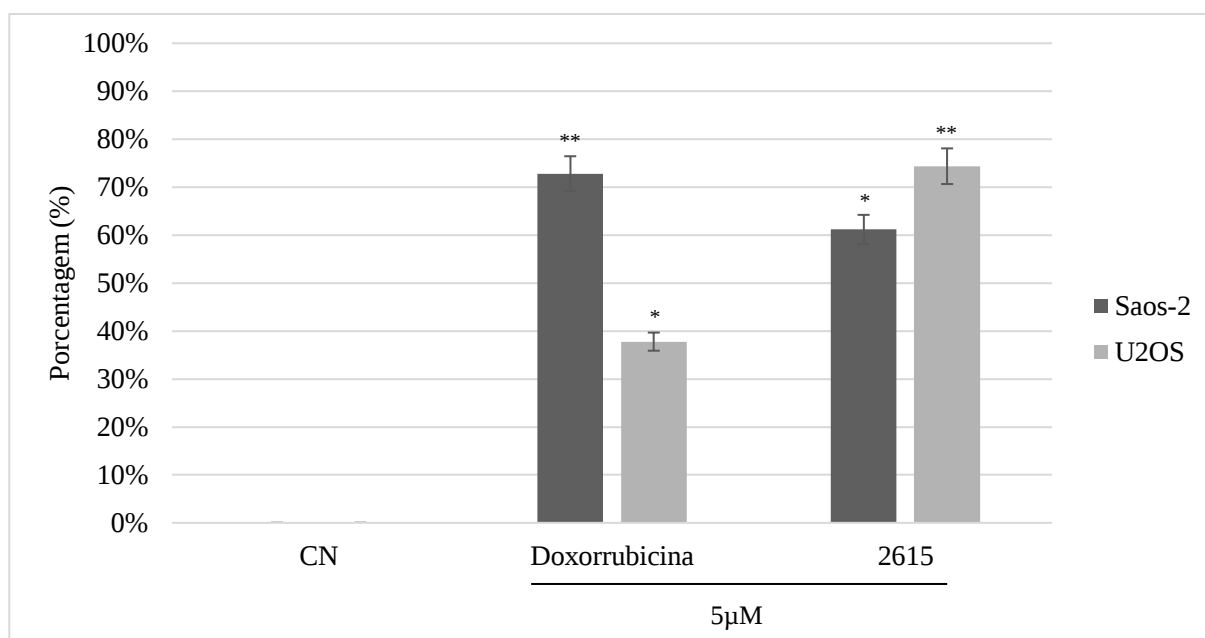
crescimento e invadir tecidos saudáveis ou órgãos adjacentes, evento conhecido como metástase (Ohshima & Morii, 2021). No osteossarcoma, a metástase normalmente atinge os pulmões, sendo uma das principais razões pelas quais essa doença é tão perigosa e muitas vezes fatal (Basile et al., 2020).

Sabendo que a migração celular permite que células cancerosas invadam e se infiltrem em tecidos circundantes, o que não apenas afeta o funcionamento normal desses tecidos, mas também pode resultar em complicações graves, como obstrução de órgãos e disfunção de sistemas biológicos, compreender e controlar a migração celular é fundamental para desenvolver abordagens mais eficazes para tratar o câncer e melhorar os prognósticos dos pacientes. Em nosso trabalho podemos observar o efeito inibitório do análogo 2615 sobre a migração das células U2OS (p53<sup>+/+</sup>), evento que pode ocorrer através de diversos mecanismos. Possivelmente através da regulação de moléculas relacionadas à migração celular.

Ao avaliarmos os resultados obtidos, podemos comparar os efeitos do 2615 sobre as células de OS aos da doxorrubicina, é importante mencionar que, embora a doxorrubicina seja um agente eficaz contra o câncer, também pode causar efeitos colaterais significativos devido à sua toxicidade. Assim como, a quimiorresistência adquirida do osteossarcoma é frequentemente observada em pacientes com tumor recorrente e metástases pulmonares. Alguns pacientes desenvolveram resistência à quimioterapia, explicando em alguns casos, recidivas e progressão tumoral (Marchandet et al., 2021). Para prolongar o tempo de sobrevida destes pacientes, é fundamental identificar novas estratégias terapêuticas para sensibilizar as células cancerígenas aos medicamentos usuais, assim como, os e mecanismos de atuação dos compostos em questão.

### 5.5. Análise da atividade indutora de caspases 3/7 do análogo 2615

A fim de averiguar se o composto 2615 exerce atividade sobre a p53 relacionada com a indução de apoptose, mensuramos a atividade enzimática das caspases 3/7 em células de osteossarcoma com diferentes *status* desta proteína. As células U2OS (tipo selvagem para p53) e Saos-2 (p53 nulo) (**Figura 18**) foram tratadas com o composto 2615 e com a doxorrubicina (5 $\mu$ M) por 48h.



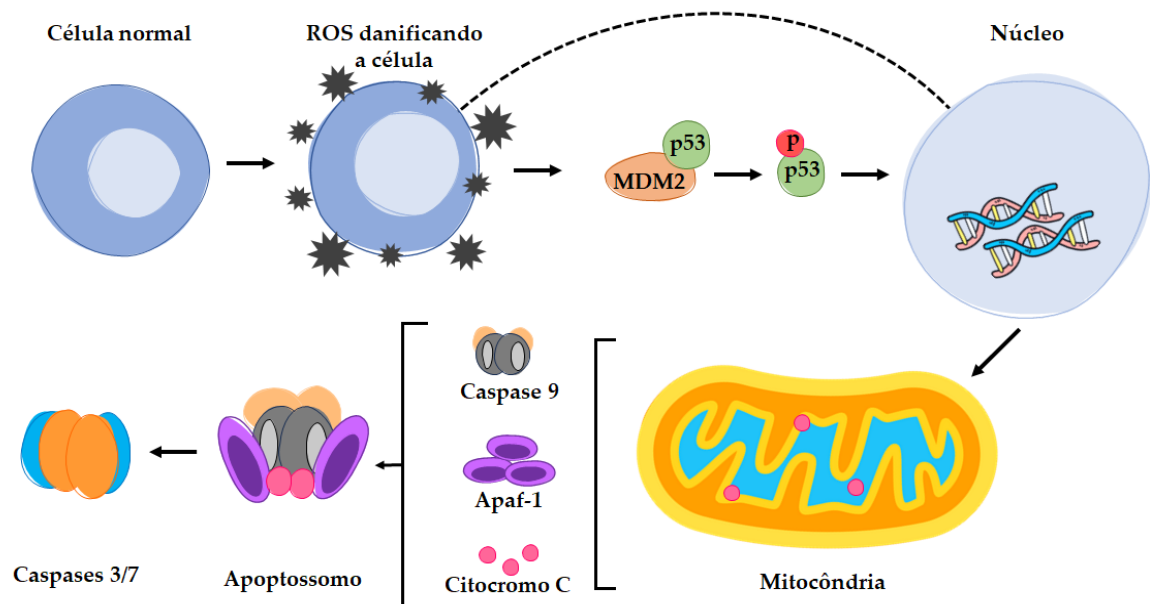
**Figura 18.** As células U2OS (p53+/+) e Saos-2 (p53-/-) foram tratadas com 0 e 5µM do composto 2615 48 horas e a atividade das caspases3/7 foi mensurada através da detecção de fluorescência e conversão em porcentagem de indução. As barras de erro indicam média ± EP. \*p ≤ 0,004; \*\*p ≤ 0,009 em comparação com o CN.

As caspases 3 e 7 são enzimas proteolíticas que desempenham um papel central na via de apoptose, ou morte celular programada. Sua ativação ocorre durante a apoptose para executar a clivagem de proteínas celulares, levando à desmontagem controlada da célula (McComb et al., 2019). Essas caspases são expressas a princípio, em uma forma inativa (procaspase) e, após ativação por clivagem, elas podem desmembrar diversas proteínas celulares, causando a fragmentação do DNA, desestabilização do citoesqueleto celular, condensação da cromatina e, por fim, apoptose (McComb et al., 2019).

O composto 2615 demonstrou indução da atividade das caspases 3/7 nas linhagens de OS, contudo, observou-se que o resultado obtido na linhagem celular Saos-2 (p53-/-) foi comparativamente menor. Esta linhagem pode apresentar regulação negativa de enzimas apoptóticas, como a pró-caspase 3, isto sugere que a resistência à indução de apoptose pode indicar um possível envolvimento da proteína p53 (Wong et al., 2007). É notável que a indução de caspases 3/7 pela doxorrubicina foi mais significativa em nas Saos-2 (p53-/-). Este quimioterápico é projetado para ativar vias de apoptose nas células cancerígenas, incluindo a indução das caspases 3 e 7 (Al-Oudat et al., 2019). As caspases 3/7 são centrais na cascata de eventos que leva à apoptose, desempenhando um papel fundamental na morte celular

programada, que é essencial para o desenvolvimento normal, a homeostase tecidual e a remoção de células danificadas, contribuindo para a saúde e a integridade do organismo.

A p53 também pode influenciar a atividade das caspases, incluindo as caspases 3 e 7, através de interações com proteínas envolvidas na via apoptótica. Quando a célula é exposta a danos extensos no DNA ou outros tipos de estresse como ROS, a p53 ativa a expressão de diversos genes-alvo, incluindo aqueles envolvidos na indução da apoptose, através da liberação de fatores apoptogênicos, incluindo o citocromo C (Wei et al., 2021). A liberação do citocromo C desencadeia a formação de um complexo de grande porte chamado apoptossomo, uma estrutura multiproteica que desempenha um papel central na ativação da cascata apoptótica. O citocromo C liberado se liga à proteína adaptadora Fas-associada com domínio de morte 1 (Apaf-1), promovendo a formação do apoptossomo. A Apaf-1 interage com a caspase 9 que é ativada e por sua vez, desencadeia uma série de eventos em cascata. Ela cliva e ativa as caspases efetoras, tais como as caspases-3 e -7, que executam o programa de morte celular (Schuler & Green, 2001) (**Figura 19**).



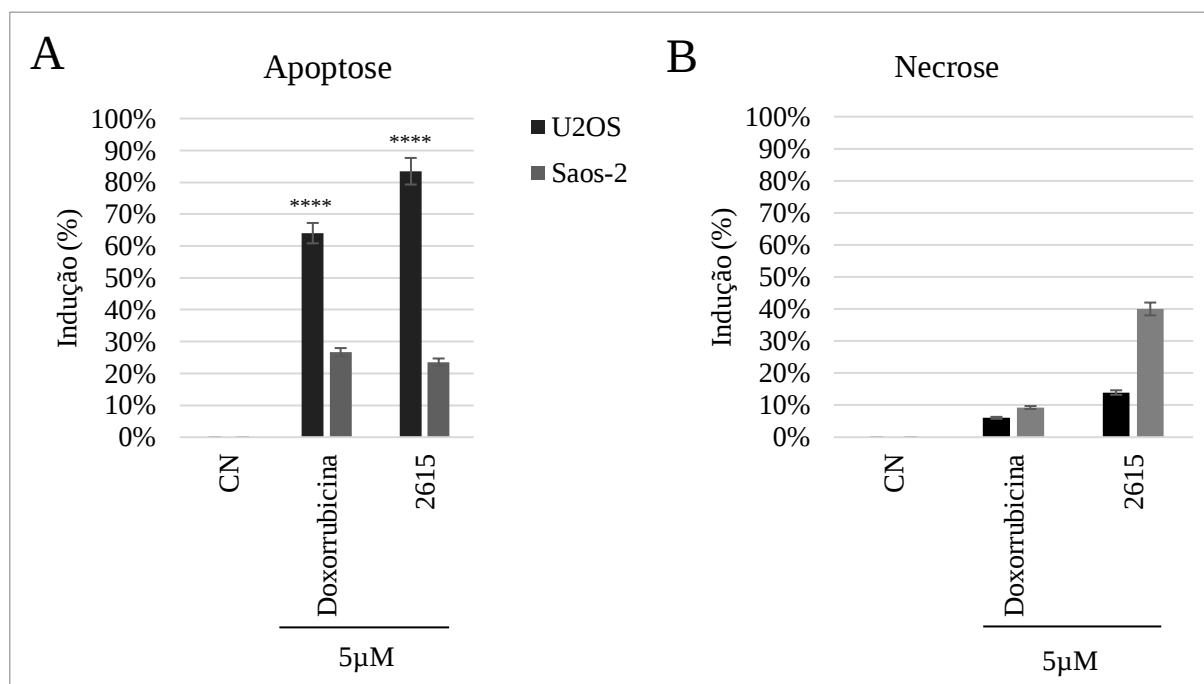
**Figura 19.** Mecanismo da via apoptótica intrínseca através da ativação das caspases 3/7.

Sendo assim, a regulação da p53 desempenha um papel fundamental na determinação do destino celular em momentos de estresse ou dano, iniciando a liberação de fatores apoptogênicos e a subsequente ativação das caspases efetoras 3/7. Sua modulação é essencial

no controle da apoptose e na resposta a condições adversas que ameaçam a integridade celular, a fim de promover a saúde celular e a resposta ao estresse em geral.

## 5.6. Avaliação da atividade indutora de apoptose e necrose celular do análogo 2615

As caspases 3 e 7 são enzimas chave na regulação da apoptose, um processo fundamental de morte celular programada que ocorre naturalmente em células multicelulares. A apoptose é um mecanismo crítico para o desenvolvimento, a manutenção e o equilíbrio dos tecidos, bem como para eliminar células danificadas, perigosas ou não funcionais. Sendo assim, verificamos se a liberação de caspases 3/7 observada em células U2OS (p53+/+) estava relacionada com a indução de apoptose. Esta avaliação da indução de apoptose foi realizada através da medição da ligação da Anexina V (luminescência) que reflete o processo apoptótico (**Figura 16A**). Avaliamos em sequência o processo necrótico, que mensura a perda de integridade da membrana (fluorescência), consistente com necrose secundária após apoptose ou outros mecanismos não apoptóticos (**Figura 16B**). As células U2OS (p53+/+) foram tratadas com o composto 2615 e com a doxorrubicina (0 e 5µM) 48 horas.



**Figura 20. (A)** Análise da indução de apoptose em células U2OS (p53+/+) e Saos-2 (p53-/-) tratadas com Doxorrubicina e 2615 à 5µM por 48 h. **(B)** A perda da integridade da membrana foi avaliada na mesma amostra por fluorescência após o tratamento. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de três experimentos individuais. \*\*\*\*p < 0,0001 em comparação com NC.

A atividade apoptótica do 2615 é um resultado importante na avaliação da eficácia do análogo. Como candidato a agente terapêutico, especialmente em doenças onde a regulação defeituosa da apoptose desempenha um papel central, como no câncer, a regulação da morte celular é crítica. A capacidade de um composto de induzir apoptose nas células-alvo é um indicador promissor de sua potencial utilidade como tratamento. Na avaliação de indução de apoptose, o composto 2615 apresentou maior efeito que a doxorrubicina em 48 horas de tratamento. Estudos de nosso laboratório indicaram que os análogos da curcumina podem estar associados à ativação da p53, aumentando sua expressão ou atividade (Lima et al., 2018; Silva, Lima, et al., 2018). Esta interação pode resultar na inibição de proteínas anti-apoptóticas, como as da família Bcl-2, que normalmente impedem a morte celular, favorecendo a ativação da apoptose (J. M. Adams & Cory, 2018; Shankar & Srivastava, 2007). Porém, estudos mais detalhados são necessários para compreender completamente os efeitos destes compostos na regulação da p53 e suas vias de atuação, a fim de descobrir como esses efeitos podem ser aplicados em contextos de saúde e tratamento de doenças.

A indução de apoptose pela doxorrubicina é uma característica crucial para sua eficácia como agente quimioterápico. No entanto, é importante lembrar que a doxorrubicina possui efeitos colaterais significativos devido à sua toxicidade, afetando células saudáveis, como células do coração (Piegari et al., 2020). Portanto, seu uso requer uma cuidadosa avaliação de riscos e benefícios, e geralmente é administrado sob supervisão médica rigorosa.

A necrose tumoral é uma característica complexa e pode ter implicações tanto na biologia do tumor quanto no desenvolvimento de estratégias de tratamento. No entanto, é importante distinguir a necrose tumoral da apoptose, que é uma morte celular programada que ocorre naturalmente em células saudáveis e é regulada de maneira precisa (X. Qin et al., 2019).

Assim como o resultado encontrado neste trabalho, os estudos comparando a citotoxicidade de diferentes drogas anticancerígenas mostram que a eficácia da droga é extremamente influenciada pelas condições de cultura das células. No entanto, as tecnologias atuais não imitam totalmente o complexo microambiente tumoral. Se os modelos de câncer *in vitro* puderem imitar a fisiologia *in vivo* mais de perto, a eficácia e a toxicidade dos candidatos a medicamentos poderiam ser avaliadas com maior precisão (Jo et al., 2018).

## 6. CONCLUSÃO

Neste trabalho, relatamos um sistema para o desenvolvimento de inibidores do complexo HDAC1/Sp1. Apesar de termos validado a transfecção com os vetores do sistema, ainda não foi possível a aplicação do ensaio na identificação de compostos inibidores deste complexo. Uma segunda abordagem envolvendo o ensaio de inibição direta de HDACs foi utilizado para a triagem de análogos de curcumina, levando ao isolamento do composto 2615 que apresentou maior atividade citotóxica contra a linhagem U2OS (p53+/+), resultado diferente do encontrado na linhagem Saos-2 (p53-/-), o que pode estar relacionado à diferença de *status* para a proteína supressora de tumor p53. Em geral, a presença da p53 mostra-se importante para a atividade biológica dos análogos aqui estudados, como demonstrado pelo maior efeito citotóxico e apoptótico contra a linhagem U2OS (p53+/+). O fato de o composto 2615 afetar vias moleculares desreguladas no câncer, como apoptose e sinalização da p53 faz com que este composto seja um possível candidato para o desenvolvimento de drogas antitumorais.

## REFERÊNCIAS

- Ackerknecht, E. H. (1958). Historical notes on cancer. *Medical History*, 2(2). <https://doi.org/10.1017/S0025727300023528>
- Adams, G. E., Chandru, A., & Cowley, S. M. (2018). Co-repressor, co-activator and general transcription factor: The many faces of the Sin3 histone deacetylase (HDAC) complex. *Biochemical Journal*, 475(24), 3921–3932. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170314>
- Adams, J. M., & Cory, S. (2018). The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets. *Cell Death and Differentiation*, 25(1). <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.161>
- Aggarwal, B. B., Deb, L., & Prasad, S. (2015). Curcumin differs from tetrahydrocurcumin for molecular targets, signaling pathways and cellular responses. In *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules20010185>
- Ahmed, E. Y., Latif, N. A. A., Nasr, T., Awad, H. M., & Abdelhafez, O. M. (2022). Design, synthesis, and molecular modeling of coumarin derivatives as MDM2 inhibitors targeting breast cancer. *Chemical Biology & Drug Design*. <https://doi.org/10.1111/CBDD.14028>
- Akbari, A., Sedaghat, M., Heshmati, J., Tabaeian, S. P., Dehghani, S., Pizarro, A. B., Rostami, Z., & Agah, S. (2021). Molecular mechanisms underlying curcumin-mediated microRNA regulation in carcinogenesis; Focused on gastrointestinal cancers. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 141). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111849>
- Al-Awadhi, F. H., Salvador-Reyes, L. A., Elsadek, L. A., Ratnayake, R., Chen, Q. Y., & Luesch, H. (2020). Largazole is a Brain-Penetrant Class I HDAC Inhibitor with Extended Applicability to Glioblastoma and CNS Diseases. *ACS Chemical Neuroscience*, 11(13). <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.0c00093>
- Alfranca, A., Martinez-Cruzado, L., Tornin, J., Abarrategi, A., Amaral, T., De Alava, E., Menendez, P., Garcia-Castro, J., & Rodriguez, R. (2015). Bone microenvironment signals in osteosarcoma development. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(16), 3097–3113. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1918-y>
- Al-Oudat, B. A., Alqudah, M. A., Audat, S. A., Al-Balas, Q. A., El-Elimat, T., Hassan, M. A., Frhat, I. N., & Azaizeh, M. M. (2019). Design, synthesis, and biologic evaluation of novel chrysin derivatives as cytotoxic agents and caspase-3/7 activators. *Drug Design, Development and Therapy*, 13. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S189476>
- Alves-Fernandes, D. K., & Jasiulionis, M. G. (2019). No Title. 20(13), 3153. <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/13/3153/htm>
- Amini, A., Khadivar, P., Ahmadnia, A., Alipour, M., Majeed, M., Jamialahmadi, T., Sathyapalan, T., & Sahebkar, A. (2021). Role of Curcumin in Regulating Long Noncoding RNA Expression in Cancer. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1308). [https://doi.org/10.1007/978-3-030-64872-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-64872-5_2)
- Appella, E., & Anderson, C. W. (2001). Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. In *European Journal of Biochemistry*. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02225.x>
- Arabshahi, L., & Schmitz, F. J. (1987). Brominated Tyrosine Metabolites from an Unidentified Sponge. *Journal of Organic Chemistry*, 52(16). <https://doi.org/10.1021/jo00392a016>

- Atrahimovich, D., Avni, D., & Khatib, S. (2021). Flavonoids-macromolecules interactions in human diseases with focus on alzheimer, atherosclerosis and cancer. In *Antioxidants* (Vol. 10, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/antiox10030423>
- Banerjee, A., Mahata, B., Dhir, A., Mandal, T. K., & Biswas, K. (2019). Elevated histone H3 acetylation and loss of the Sp1–HDAC1 complex de-repress the GM2-synthase gene in renal cell carcinoma. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004485>
- Banik, D., Moufarrij, S., & Villagra, A. (2019). Immunoepigenetics combination therapies: An overview of the role of HDACs in cancer immunotherapy. In *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms20092241>
- Bao, Y., Xu, Q., Wang, L., Wei, Y., Hu, B., Wang, J., Liu, D., Zhao, L., & Jing, Y. (2021). Studying Histone Deacetylase Inhibition and Apoptosis Induction of Psammaplin A Monomers with Modified Thiol Group. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 12(1). <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.0c00369>
- Basile, P., Greengard, E., Weigel, B., & Spector, L. (2020). Prognostic Factors for Development of Subsequent Metastases in Localized Osteosarcoma: A Systematic Review and Identification of Literature Gaps. *Sarcoma*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/7431549>
- Basu, A. K. (2018). DNA damage, mutagenesis and cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4). <https://doi.org/10.3390/ijms19040970>
- Baud, M. G. J., Leiser, T., Haus, P., Samlal, S., Wong, A. C., Wood, R. J., Petrucci, V., Gunaratnam, M., Hughes, S. M., Buluwela, L., Turlais, F., Neidle, S., Meyer-Almes, F. J., White, A. J. P., & Fuchter, M. J. (2012). Defining the mechanism of action and enzymatic selectivity of psammaplin A against its epigenetic targets. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(4). <https://doi.org/10.1021/jm2016182>
- Beishline, K., & Azizkhan-Clifford, J. (2015). Sp1 and the “hallmarks of cancer.” In *FEBS Journal*. <https://doi.org/10.1111/febs.13148>
- Beishline, K., Kelly, C. M., Olofsson, B. A., Koduri, S., Emrich, J., Greenberg, R. A., & Azizkhan-Clifford, J. (2012). Sp1 Facilitates DNA Double-Strand Break Repair through a Nontranscriptional Mechanism. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.00049-12>
- Bhaskar Rao, D., Panneerandian, P., Balakrishnan, K., & Ganesan, K. (2021). YY1 regulated transcription-based stratification of gastric tumors and identification of potential therapeutic candidates. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 15(2). <https://doi.org/10.1007/s12079-021-00608-4>
- Bolden, J. E., Shi, W., Jankowski, K., Kan, C. Y., Cluse, L., Martin, B. P., MacKenzie, K. L., Smyth, G. K., & Johnstone, R. W. (2013). HDAC inhibitors induce tumor-cell-selective pro-apoptotic transcriptional responses. *Cell Death and Disease*. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.9>
- Bouyahya, A., Mechchate, H., Oumeslakht, L., Zeouk, I., Aboulaghras, S., Balahbib, A., Zengin, G., Kamal, M. A., Gallo, M., Montesano, D., & El Omari, N. (2022). The Role of Epigenetic Modifications in Human Cancers and the Use of Natural Compounds as Epidrugs: Mechanistic Pathways and Pharmacodynamic Actions. In *Biomolecules* (Vol. 12, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/biom12030367>
- Briggs, M. R., Kadonaga, J. T., Bell, S. P., & Tjian, R. (1986). Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1. *Science*, 234(4772). <https://doi.org/10.1126/science.3529394>

- Brown, K., Jenkins, L. M. M., Crooks, D. R., Surman, D. R., Mazur, S. J., Xu, Y., Arimilli, B. S., Yang, Y., Lane, A. N., Fan, T. W. M., Schrupp, D. S., Linehan, W. M., Ripley, R. T., & Appella, E. (2023). Targeting mutant p53-R248W reactivates WT p53 function and alters the onco-metabolic profile. *Frontiers in Oncology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1094210>
- Brownell, J. E., & Allis, C. D. (2021). HAT discovery: Heading toward an elusive goal with a key biological assist. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1864(2). <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2020.194605>
- Burke, B., Eden, C., Perez, C., Belshoff, A., Hart, S., Plaza-Rojas, L., Delos Reyes, M., Prajapati, K., Voelkel-Johnson, C., Henry, E., Gupta, G., & Guevara-Patiño, J. (2020). Inhibition of Histone Deacetylase (HDAC) Enhances Checkpoint Blockade Efficacy by Rendering Bladder Cancer Cells Visible for T Cell-Mediated Destruction. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00699>
- Cabrera-Andrade, A., López-Cortés, A., Jaramillo-Koupermann, G., Paz-Y-miño, C., Pérez-Castillo, Y., Munteanu, C. R., González-Díaz, H., Pazos, A., & Tejera, E. (2020). Gene prioritization through consensus strategy, enrichment methodologies analysis, and networking for osteosarcoma pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3). <https://doi.org/10.3390/ijms21031053>
- Cairns, J. (1975). Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature*, 255(5505). <https://doi.org/10.1038/255197a0>
- Celik, B., Cicek, K., Leal, A. F., & Tomatsu, S. (2022). Regulation of Molecular Targets in Osteosarcoma Treatment. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 20). <https://doi.org/10.3390/ijms232012583>
- Chabanon, R. M., Rouanne, M., Lord, C. J., Soria, J. C., Pasero, P., & Postel-Vinay, S. (2021). Targeting the DNA damage response in immuno-oncology: developments and opportunities. *Nature Reviews Cancer*, 21(11), 701–717. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00386-6>
- Chatterjee, N., & Walker, G. C. (2017). Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 58(5), 235–263. <https://doi.org/10.1002/em.22087>
- Chen, Y.-J. C., Koutelou, E., & Dent, S. Y. R. (2022). Now open: Evolving insights to the roles of lysine acetylation in chromatin organization and function. *Molecular Cell*. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2021.12.004>
- Chen, Z., Guo, J., Zhang, K., & Guo, Y. (2016). TP53 Mutations and Survival in Osteosarcoma Patients: A Meta-Analysis of Published Data. *Disease Markers*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4639575>
- Cheng, D., Li, W., Wang, L., Lin, T., Poiani, G., Wassef, A., Hudlikar, R., Ondar, P., Brunetti, L., & Kong, A. N. (2019). Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and PKPD Modeling of Curcumin in Regulating Antioxidant and Epigenetic Gene Expression in Healthy Human Volunteers. *Molecular Pharmaceutics*, 16(5). <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b01246>
- Cheng, Y., He, C., Wang, M., Ma, X., Mo, F., Yang, S., Han, J., & Wei, X. (2019). Targeting epigenetic regulators for cancer therapy: Mechanisms and advances in clinical trials. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0095-0>
- Ciesielski, O., Biesiekierska, M., & Balcerczyk, A. (2020). Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) alters histone acetylation and methylation and impacts chromatin architecture profile in human endothelial cells. *Molecules*, 25(10). <https://doi.org/10.3390/molecules25102326>

- Costa, S. O. A. M., Rodrigues, I. B., Braga, A. V., Barbosa, B. C. M., Silva, R. R. L., Rodrigues, F. F., Melo, I. S. F., Morais, M. Í., Castro, B. F. M., Júnior, A. S. C., Maltarollo, V. G., Oliveira, R. B., Coelho, M. M., & Machado, R. R. (2022). RI75, a curcumin analogue, inhibits tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6 production and exhibits antiallodynic and antiedematogenic activities in mice. *Inflammopharmacology*. <https://doi.org/10.1007/S10787-021-00913-9>
- Czarnecka, A. M., Synoradzki, K., Firlej, W., Bartnik, E., Sobczuk, P., Fiedorowicz, M., Grieb, P., & Rutkowski, P. (2020). *No Title*. 12(8), 1–27. <https://doi.org/10.3390/cancers12082130>
- David, A. R., & Zimmerman, M. R. (2010). Cancer: An old disease, a new disease or something in between? In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 10, Issue 10). <https://doi.org/10.1038/nrc2914>
- Davies, K. M., Jibrán, R., Zhou, Y., Albert, N. W., Brummell, D. A., Jordan, B. R., Bowman, J. L., & Schwinn, K. E. (2020). The Evolution of Flavonoid Biosynthesis: A Bryophyte Perspective. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 11). <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00007>
- Deb, G., Shankar, E., Thakur, V. S., Ponsky, L. E., Bodner, D. R., Fu, P., & Gupta, S. (2019). Green tea-induced epigenetic reactivation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-3 suppresses prostate cancer progression through histone-modifying enzymes. *Molecular Carcinogenesis*, 58(7). <https://doi.org/10.1002/mc.23003>
- Deng, L., Wu, X., Zhu, X., Yu, Z., Liu, Z., Wang, J., & Zheng, Y. (2021). Combination effect of curcumin with docetaxel on the PI3K/AKT/mTOR pathway to induce autophagy and apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma. *American Journal of Translational Research*, 13(1), 57. <https://doi.org/10.3934/ajtr.2021057>
- Deng, Z., Liu, X., Jin, J., Xu, H., Gao, Q., Wang, Y., & Zhao, J. (2016). Histone deacetylase inhibitor trichostatin A promotes the apoptosis of osteosarcoma cells through p53 signaling pathway activation. *International Journal of Biological Sciences*, 12(11). <https://doi.org/10.7150/ijbs.16569>
- Doetzlhofer, A., Rotheneder, H., Lagger, G., Koranda, M., Kurtev, V., Brosch, G., Wintersberger, E., & Seiser, C. (1999). Histone Deacetylase 1 Can Repress Transcription by Binding to Sp1. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.8.5504>
- Dondu, A., Caliskan, M., & Orenay-Boyacioglu, S. (2021). Link between obsessive-compulsive disorder and polymorphisms in HDAC genes. *Revista Brasileira de Psiquiatria (Sao Paulo, Brazil : 1999)*. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2020-1715>
- dos Santos, M. B., Bertholin Anselmo, D., de Oliveira, J. G., Jardim-Perassi, B. V., Alves Monteiro, D., Silva, G., Gomes, E., Lucia Fachin, A., Marins, M., de Campos Zuccari, D. A. P., & Octavio Regasini, L. (2019). Antiproliferative activity and p53 upregulation effects of chalcones on human breast cancer cells. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.1080/14756366.2019.1615485>
- Dowdy, S. C., Jiang, S., Zhou, X. C., Hou, X., Jin, F., Podratz, K. C., & Jiang, S. W. (2006). Histone deacetylase inhibitors and paclitaxel cause synergistic effects on apoptosis and microtubule stabilization in papillary serous endometrial cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(11). <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0209>
- Eckschlager, T., Plch, J., Stiborova, M., & Hrabeta, J. (2017). Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms18071414>
- Elmallah, M. I. Y., & Micheau, O. (2019). Epigenetic Regulation of TRAIL Signaling: Implication for Cancer Therapy. *Cancers*. <https://doi.org/10.3390/cancers11060850>

- Espinoza, J. L., Kurokawa, Y., & Takami, A. (2019). Rationale for assessing the therapeutic potential of resveratrol in hematological malignancies. In *Blood Reviews* (Vol. 33). <https://doi.org/10.1016/j.blre.2018.07.001>
- Estimativa 2020 - Introdução | INCA - Instituto Nacional de Câncer.* (n.d.). Retrieved January 24, 2022, from <https://www.inca.gov.br/estimativa/introducao>
- Fabianowska-Majewska, K., Kaufman-Szymczyk, A., Szymanska-Kolba, A., Jakubik, J., Majewski, G., & Lubecka, K. (2021). Curcumin from turmeric rhizome: A potential modulator of dna methylation machinery in breast cancer inhibition. In *Nutrients* (Vol. 13, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/nu13020332>
- Fan, T. M., Roberts, R. D., & Lizardo, M. M. (2020). Understanding and Modeling Metastasis Biology to Improve Therapeutic Strategies for Combating Osteosarcoma Progression. *Frontiers in Oncology*, 10, 13.
- Fu, H., Wang, C., Yang, D., Wei, Z., Xu, J., Hu, Z., Zhang, Y., Wang, W., Yan, R., & Cai, Q. (2018). Curcumin regulates proliferation, autophagy, and apoptosis in gastric cancer cells by affecting PI3K and P53 signaling. *Journal of Cellular Physiology*, 233(6). <https://doi.org/10.1002/jcp.26190>
- Gaspar, N., Marques da Costa, M. E., Fromigue, O., Droit, R., Berlanga, P., & Marchais, A. (2020). Recent advances in understanding osteosarcoma and emerging therapies. *Faculty Reviews*, 9. <https://doi.org/10.12703/r/9-18>
- Gentile, F., A. Tuszynski, J., & H. Barakat, K. (2016). Modelling DNA Repair Pathways: Recent Advances and Future Directions. *Current Pharmaceutical Design*. <https://doi.org/10.2174/1381612822666160420141435>
- Ghasemi, S. (2019). Cancer's epigenetic drugs: where are they in the cancer medicines? In *Pharmacogenomics Journal*. <https://doi.org/10.1038/s41397-019-0138-5>
- Gil, J., Ramírez-Torres, A., & Encarnación-Guevara, S. (2017). Lysine acetylation and cancer: A proteomics perspective. In *Journal of Proteomics*. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.10.003>
- Gray, S. S. G., Ekström, T. J., research, T. E.-E. cell, & 2001, undefined. (2001). No Title. *Elsevier*. <https://doi.org/10.1006/excr.2000.5080>
- Grozinger, C. M., Hassig, C. A., & Schreiber, S. L. (1999). Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Gryder, B. E., Sodji, Q. H., & Oyelere, A. K. (2012). Targeted cancer therapy: Giving histone deacetylase inhibitors all they need to succeed. In *Future Medicinal Chemistry* (Vol. 4, Issue 4). <https://doi.org/10.4155/fmc.12.3>
- Gu, X., Li, F., Gao, Y., Che, X., & Li, P. (2022). HDAC4 mutant represses chondrocyte hypertrophy by locating in the nucleus and attenuates disease progression of posttraumatic osteoarthritis. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 23(1), 8. <https://doi.org/10.1186/S12891-021-04947-6>
- Guo, Q., Wang, T., Yang, Y., Gao, L., Zhao, Q., Zhang, W., Xi, T., & Zheng, L. (2020). Transcriptional Factor Yin Yang 1 Promotes the Stemness of Breast Cancer Cells by Suppressing miR-873-5p Transcriptional Activity. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 21. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2020.06.018>
- Gupta, A., Guerin-Peyrou, T. G., Sharma, G. G., Park, C., Agarwal, M., Ganju, R. K., Pandita, S., Choi, K., Sukumar, S., Pandita, R. K., Ludwig, T., & Pandita, T. K. (2008). The Mammalian Ortholog

- of *Drosophila* MOF That Acetylates Histone H4 Lysine 16 Is Essential for Embryogenesis and Oncogenesis. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.01045-07>
- Haddow, A. (1936). Historical Notes on Cancer from the MSS. of Louis Westenra Sambon. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 29(9). <https://doi.org/10.1177/003591573602900901>
- Hajdu, S. I. (2012). A note from history: Landmarks in history of cancer, part 3. In *Cancer* (Vol. 118, Issue 4). <https://doi.org/10.1002/cncr.26320>
- Han, Y., Kim, Y. M., Kim, H. S., & Lee, K. Y. (2017). Melatonin promotes osteoblast differentiation by regulating Osterix protein stability and expression. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06304-x>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanson, R. L., Porter, J. R., & Batchelor, E. (2019). Protein stability of p53 targets determines their temporal expression dynamics in response to p53 pulsing. *Journal of Cell Biology*, 218(4). <https://doi.org/10.1083/jcb.201803063>
- Hinshaw, D. C., & Shevde, L. A. (2019). The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Research*, 79(18), 4557–4567. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3962>
- Ho, T. C. S., Chan, A. H. Y., & Ganesan, A. (2020). Thirty Years of HDAC Inhibitors: 2020 Insight and Hindsight. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(21), 12460–12484. <https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.0C00830>
- Hogg, S. J., Beavis, P. A., Dawson, M. A., & Johnstone, R. W. (2020). Targeting the epigenetic regulation of antitumour immunity. *Nature Reviews Drug Discovery*, 19(11), 776–800. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0077-5>
- Houtkooper, R. H., Pirinen, E., & Auwerx, J. (2012). Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/nrm3293>
- Hsu, F. S., Wu, J. T., Lin, J. Y., Yang, S. P., Kuo, K. L., Lin, W. C., Shi, C. S., Chow, P. M., Liao, S. M., Pan, C. I., Hong, J. Y., Chang, H. C., & Huang, K. H. (2019). Histone deacetylase inhibitor, trichostatin a, synergistically enhances paclitaxel-induced cytotoxicity in urothelial carcinoma cells by suppressing the ERK pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5). <https://doi.org/10.3390/ijms20051162>
- Hsu, M. C., Chang, H. C., & Hung, W. C. (2006). HER-2/neu represses the metastasis suppressor RECK via ERK and Sp transcription factors to promote cell invasion. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510937200>
- Hu, M., Liu, L., & Yao, W. (2018). Activation of p53 by costunolide blocks glutaminolysis and inhibits proliferation in human colorectal cancer cells. *Gene*, 678. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.08.048>
- Huang, C., Wu, X. fen, & Wang, X. lian. (2019). Trichostatin a inhibits phenotypic transition and induces apoptosis of the TAF-treated normal colonic epithelial cells through regulation of TGF- $\beta$  pathway. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 114. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2019.105565>
- Huang, D. D., Shi, G., Jiang, Y., Yao, C., & Zhu, C. (2020). A review on the potential of Resveratrol in prevention and therapy of diabetes and diabetic complications. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 125, 109767. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2019.109767>

- Huang, J. H., Xu, Y., & Lin, F. Y. (2020). The inhibition of microRNA-326 by SP1/HDAC1 contributes to proliferation and metastasis of osteosarcoma through promoting SMO expression. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(18). <https://doi.org/10.1111/jcmm.15716>
- Hull, E. E., Montgomery, M. R., & Leyva, K. J. (2016). HDAC Inhibitors as Epigenetic Regulators of the Immune System: Impacts on Cancer Therapy and Inflammatory Diseases. In *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2016/8797206>
- Inoue, A., & Fujimoto, D. (1969). Enzymatic deacetylation of histone. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(69\)90661-5](https://doi.org/10.1016/0006-291X(69)90661-5)
- Ito, A., Kawaguchi, Y., Lai, C. H., Kovacs, J. J., Higashimoto, Y., Appella, E., & Yao, T. P. (2002). MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation. *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf616>
- Iyer, M., Pal, K., & Upadhye, V. (2023). Phytochemicals and cancer. In *Recent Frontiers of Phytochemicals: Applications in Food, Pharmacy, Cosmetics, and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-19143-5.00007-4>
- Izquierdo-Torres, E., Hernández-Oliveras, A., Meneses-Morales, I., Rodríguez, G., Fuentes-García, G., & Zarain-Herzberg, Á. (2019). Resveratrol up-regulates ATP2A3 gene expression in breast cancer cell lines through epigenetic mechanisms. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 113, 37–47. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2019.05.020>
- Jian, X., Qu, L., Wang, Y., Zou, Q., Zhao, Q., Chen, S., Gao, X., Chen, H., & He, C. (2019). Trichostatin A-induced miR-30a-5p regulates apoptosis and proliferation of keloid fibroblasts via targeting BCL2. *Molecular Medicine Reports*, 19(6). <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10185>
- Jiang, M., Jia, K., Wang, L., Li, W., Chen, B., Liu, Y., Wang, H., Zhao, S., He, Y., & Zhou, C. (2021). Alterations of DNA damage response pathway: Biomarker and therapeutic strategy for cancer immunotherapy. *Acta Pharmaceutica Sinica. B*, 11(10), 2983–2994. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.01.003>
- Jo, Y., Choi, N., Kim, K., Koo, H. J., Choi, J., & Kim, H. N. (2018). Chemoresistance of cancer cells: Requirements of tumor microenvironment-mimicking in vitro models in anti-cancer drug development. In *Theranostics* (Vol. 8, Issue 19). <https://doi.org/10.7150/thno.29098>
- Juli, G., Oliverio, M., Bellizzi, D., Gallo Cantafio, M. E., Grillone, K., Passarino, G., Colica, C., Nardi, M., Rossi, M., Procopio, A., Tagliaferri, P., Tassone, P., & Amodio, N. (2019). Anti-tumor Activity and Epigenetic Impact of the Polyphenol Oleacein in Multiple Myeloma. *Cancers*. <https://doi.org/10.3390/cancers11070990>
- Junker, L. H., Li, B., Zhu, X., Koti, S., Cerbone, R. E., Hendrick, C. L., Sangerman, J., Perrine, S., & Pace, B. S. (2022). Novel histone deacetylase inhibitor CT-101 induces  $\gamma$ -globin gene expression in sickle erythroid progenitors with targeted epigenetic effects. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 93. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2021.102626>
- Kaiser, A. M., & Attardi, L. D. (2018). Deconstructing networks of p53-mediated tumor suppression in vivo. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 25, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.171>
- Kao, H. Y., Downes, M., Ordentlich, P., & Evans, R. M. (2000). Isolation of a novel histone deacetylase reveals that class I and class II deacetylases promote SMRT-mediated repression. *Genes and Development*.
- Kaur, J., Daoud, A., & Eblen, S. T. (2019). Targeting Chromatin Remodeling for Cancer Therapy. *Current Molecular Pharmacology*, 12(3). <https://doi.org/10.2174/1874467212666190215112915>

- Kim, B., Ratnayake, R., Lee, H., Shi, G., Zeller, S. L., Li, C., Luesch, H., & Hong, J. (2017). Synthesis and biological evaluation of largazole zinc-binding group analogs. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 25(12), 3077–3086. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.03.071>
- Komori, T. (2018). Runx2, an inducer of osteoblast and chondrocyte differentiation. In *Histochemistry and Cell Biology* (Vol. 149, Issue 4). <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1640-6>
- Komoto, T. T., Bernardes, T. M., Mesquita, T. B., Bortolotto, L. F. B., Silva, G., Bitencourt, T. A., Baek, S. J., Marins, M., & Fachin, A. L. (2018). Chalcones repressed the AURKA and MDR proteins involved in metastasis and multiple drug resistance in breast cancer cell lines. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules23082018>
- Kovac, M., Blattmann, C., Ribí, S., Smida, J., Mueller, N. S., Engert, F., Castro-Giner, F., Weischenfeldt, J., Kovacova, M., Krieg, A., Andreou, D., Tunn, P. U., Dürr, H. R., Rech, H., Schaser, K. D., Melcher, I., Burdach, S., Kulozik, A., Specht, K., ... Baumhoer, D. (2015). Exome sequencing of osteosarcoma reveals mutation signatures reminiscent of BRCA deficiency. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms9940>
- Kuijjer, M. (2013). *A systems biology approach to study high-grade osteosarcoma*. <https://scholarlypublications.universiteitleiden.nl/handle/1887/21043>
- Kulka, L. A. M., Fangmann, P. V., Panfilova, D., & Olzscha, H. (2020). Impact of HDAC Inhibitors on Protein Quality Control Systems: Consequences for Precision Medicine in Malignant Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 425. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2020.00425/BIBTEX>
- Lagger, G., O'Carroll, D., Rembold, M., Khier, H., Tischler, J., Weitzer, G., Schuettengruber, B., Hauser, C., Brunmeir, R., Jenuwein, T., & Seiser, C. (2002). Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.11.2672>
- Lane, A. A., & Chabner, B. A. (2009). Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. In *Journal of Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.22.1291>
- Lau, C. C., Harris, C. P., Lu, X.-Y., Perlaky, L., Gogineni, S., Chintagumpala, M., Hicks, J., Johnson, M. E., Davino, N. A., Huvos, A. G., Meyers, P. A., Healy, J. H., Gorlick, R., & Rao, P. H. (2003). Frequent amplification and rearrangement of chromosomal bands 6p12-p21 and 17p11. 2 in osteosarcoma. *Wiley Online Library*, 39(1), 11–21. <https://doi.org/10.1002/gcc.10291>
- Lee, M. J., Tsai, Y. J., Lin, M. Y., You, H. L., Kalyanam, N., Ho, C. T., & Pan, M. H. (2019). Cabelin-A induced death of malignant peripheral nerve sheath tumor cells by activation of histone acetyltransferase. *Phytomedicine*. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.01.001>
- Lee, S. Y., Hong, E. H., Jeong, J. Y., Cho, J., Seo, J. H., Ko, H. J., & Cho, H. J. (2019). Esterase-sensitive cleavable histone deacetylase inhibitor-coupled hyaluronic acid nanoparticles for boosting anticancer activities against lung adenocarcinoma. *Biomaterials Science*, 7(11). <https://doi.org/10.1039/c9bm00895k>
- Lehman, T. A., Modali, R., Boukamp, P., Stanek, J., Bennett, W. P., Welsh, J. A., Metcalf, R. A., Stampfer, M. R., Fusenig, N., Rogan, E. M., & Harris, C. C. (1993). P53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis*, 14(5). <https://doi.org/10.1093/carcin/14.5.833>
- Li, F., Qasim, S., Li, D., & Dou, Q. P. (2021). Updated review on green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate as a cancer epigenetic regulator. *Seminars in Cancer Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.11.018>

- Li, G., Xie, Q., Yang, Z., Wang, L., Zhang, X., Zuo, B., Zhang, S., Yang, A., & Jia, L. (2019). Sp1-mediated epigenetic dysregulation dictates HDAC inhibitor susceptibility of HER2-overexpressing breast cancer. *International Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.32425>
- Li, L., & Davie, J. R. (2010). The role of Sp1 and Sp3 in normal and cancer cell biology. *Annals of Anatomy*. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2010.07.010>
- Li, M., Guo, T., Lin, J., Huang, X., Ke, Q., Wu, Y., Fang, C., & Hu, C. (2022). Curcumin inhibits the invasion and metastasis of triple negative breast cancer via Hedgehog/Gli1 signaling pathway. *Journal of Ethnopharmacology*, 283. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114689>
- Li, W., Pung, D., Su, Z. Y., Guo, Y., Zhang, C., Yang, A. Y., Zheng, X., Du, Z. Y., Zhang, K., & Kong, A. N. (2016). Epigenetics Reactivation of Nrf2 in Prostate TRAMP C1 Cells by Curcumin Analogue FN1. *Chemical Research in Toxicology*, 29(4). <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00016>
- Li, W., Su, Z. Y., Guo, Y., Zhang, C., Wu, R., Gao, L., Zheng, X., Du, Z. Y., Zhang, K., & Kong, A. N. (2018). Curcumin Derivative Epigenetically Reactivates Nrf2 Antioxidative Stress Signaling in Mouse Prostate Cancer TRAMP C1 Cells. *Chemical Research in Toxicology*, 31(2). <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.7b00248>
- Lima, F. T., Seba, V., Silva, G., Torrezan, G. S., Polaquini, C. R., Pinhanelli, V. C., Baek, S. J., Fachin, A. L., Regasini, L. O., & Marins, M. (2018). The curcumin analog CH-5 exerts anticancer effects in human osteosarcoma cells via modulation of transcription factors p53/Sp1. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms19071909>
- Lin, P. P., Pandey, M. K., Jin, F., Raymond, A. K., Akiyama, H., & Lozano, G. (2009). Targeted mutation of p53 and Rb in mesenchymal cells of the limb bud produces sarcomas in mice. *Carcinogenesis*, 30(10). <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp180>
- Lindsey, B. A., Markel, J. E., & Kleinerman, E. S. (2017). Osteosarcoma Overview. *Rheumatology and Therapy*, 4(1), 25–43. <https://doi.org/10.1007/S40744-016-0050-2>
- Liu, J. (2018). The dualistic origin of human tumors. *Seminars in Cancer Biology*, 53, 1–16. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2018.07.004>
- Lock, M. (2018). Epigenetics. In *Routledge Handbook of Genomics, Health and Society*. <https://doi.org/10.4324/9781315451695>
- Lu, K. H., Lu, P. W. A., Lin, C. W., & Yang, S. F. (2023). Curcumin in human osteosarcoma: From analogs to carriers. In *Drug Discovery Today* (Vol. 28, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.103437>
- Lu, W., Yang, C., Xu, X., Chen, C., Hou, X., Fang, H., & Liu, S. (2021). A novel selective histone deacetylase I inhibitor CC-4a activates latent HIV-1 through NF- $\kappa$ B pathway. *Life Sciences*, 267. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118427>
- Luo, J., Su, F., Chen, D., Shiloh, A., & Gu, W. (2000). Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/35042612>
- Majrashi, T. A., Alshehri, S. A., Alsayari, A., Muhsinah, A. Bin, Alrouji, M., Alshahrani, A. M., Shamsi, A., & Atiya, A. (2023). Insight into the Biological Roles and Mechanisms of Phytochemicals in Different Types of Cancer: Targeting Cancer Therapeutics. In *Nutrients* (Vol. 15, Issue 7). <https://doi.org/10.3390/nu15071704>

- Maleki Dana, P., Sadoughi, F., Asemi, Z., & Yousefi, B. (2022). The role of polyphenols in overcoming cancer drug resistance: a comprehensive review. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 27(1), 1–26. <https://doi.org/10.1186/S11658-021-00301-9/FIGURES/3>
- Marchandet, L., Lallier, M., Charrier, C., Baud'huin, M., Ory, B., & Lamoureux, F. (2021). Mechanisms of resistance to conventional therapies for osteosarcoma. In *Cancers* (Vol. 13, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/cancers13040683>
- Marks, P. A., & Breslow, R. (2007). Dimethyl sulfoxide to vorinostat: Development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. In *Nature Biotechnology* (Vol. 25, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/nbt1272>
- Martin, J. W., Squire, J. A., & Zielenska, M. (2012). The genetics of osteosarcoma. In *Sarcoma* (Vol. 2012). <https://doi.org/10.1155/2012/627254>
- McComb, S., Chan, P. K., Guinot, A., Hartmannsdottir, H., Jenni, S., Dobay, M. P., Bourquin, J. P., & Bornhauser, B. C. (2019). Efficient apoptosis requires feedback amplification of upstream apoptotic signals by effector caspase-3 or -7. *Science Advances*, 5(7). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau9433>
- McGuire, J. J., Nerlakanti, N., Lo, C. H., Tauro, M., Utset-Ward, T. J., Reed, D. R., & Lynch, C. C. (2020). Histone deacetylase inhibition prevents the growth of primary and metastatic osteosarcoma. *International Journal of Cancer*, 147(10). <https://doi.org/10.1002/ijc.33046>
- Miller, K. M., Tjeertes, J. V., Coates, J., Legube, G., Polo, S. E., Britton, S., & Jackson, S. P. (2010). Human HDAC1 and HDAC2 function in the DNA-damage response to promote DNA nonhomologous end-joining. *Nature Structural and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1899>
- Molchadsky, A., Shats, I., Goldfinger, N., Pevsner-Fischer, M., Olson, M., Rinon, A., Tzahor, E., Lozano, G., Zipori, D., Sarig, R., & Rotter, V. (2008). P53 plays a role in mesenchymal differentiation programs, in a cell fate dependent manner. *PLoS ONE*, 3(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003707>
- Moradzadeh, M., Roustazadeh, A., Tabarraei, A., Erfanian, S., & Sahebkar, A. (2018). Epigallocatechin-3-gallate enhances differentiation of acute promyelocytic leukemia cells via inhibition of PML-RAR $\alpha$  and HDAC1. *Phytotherapy Research*, 32(3). <https://doi.org/10.1002/ptr.5990>
- Narita, T., Weinert, B. T., & Choudhary, C. (2019). Functions and mechanisms of non-histone protein acetylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(3), 156–174. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0081-3>
- Newbold, A., Falkenberg, K. J., Prince, H. M., & Johnstone, R. W. (2016). How do tumor cells respond to HDAC inhibition? In *FEBS Journal* (Vol. 283, Issue 22). <https://doi.org/10.1111/febs.13746>
- Ni, W., Liu, F., Yu, S., Li, F., Zhu, J., Chen, Z., Cheng, Y., & Li, C. (2021). Curcumin affects the prognosis of renal cell carcinoma (RCC) through a negative feedback loop of H19/miR-675/HDAC/CTCF. *Archives of Medical Science*. <https://doi.org/10.5114/aoms/118940>
- Novaes, J. T., Lillico, R., Sayre, C. L., Nagabushnam, K., Majeed, M., Chen, Y., Ho, E. A., Oliveira, A. L. de P., Martinez, S. E., Alrushaid, S., Davies, N. M., & Lakowski, T. M. (2017). Disposition, metabolism and histone deacetylase and acetyltransferase inhibition activity of tetrahydrocurcumin and other curcuminoids. *Pharmaceutics*. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9040045>

- Novikov, N. M., Zolotaryova, S. Y., Gautreau, A. M., & Denisov, E. V. (2021). Mutational drivers of cancer cell migration and invasion. In *British Journal of Cancer* (Vol. 124, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01149-0>
- Nusinzon, I., & Horvath, C. M. (2003). Interferon-stimulated transcription and innate antiviral immunity require deacetylase activity and histone deacetylase 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(25). <https://doi.org/10.1073/pnas.2433987100>
- O'Connor, M. J. (2015). Targeting the DNA Damage Response in Cancer. In *Molecular Cell* (Vol. 60, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.040>
- Ohshima, K., & Morii, E. (2021). Metabolic reprogramming of cancer cells during tumor progression and metastasis. In *Metabolites* (Vol. 11, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/metabo11010028>
- O'Neil, J., Shank, J., Cusson, N., Murre, C., & Kelliher, M. (2004). TAL1/SCL induces leukemia by inhibiting the transcriptional activity of E47/HEB. *Cancer Cell*, 5(6). <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.05.023>
- Ottaviani, G., & Jaffe, N. (2009). The epidemiology of osteosarcoma. *Cancer Treatment and Research*, 152. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0284-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0284-9_1)
- Pari, L., & Amali, D. R. (2005). Protective role of tetrahydrocurcumin (THC) an active principle of turmeric on chloroquine induced hepatotoxicity in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*.
- Park, S. Y., & Kim, J. S. (2020). A short guide to histone deacetylases including recent progress on class II enzymes. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(2), 204–212. <https://doi.org/10.1038/S12276-020-0382-4>
- Park, S.-H. (2023). Special Issue “Osteosarcomas: Treatment Strategies.” *Pharmaceuticals*, 16(9). <https://doi.org/10.3390/ph16091233>
- Park, Y., Liu, Y., Hong, J., Lee, C. O., Cho, H., Kim, D. K., Im, K. S., & Jung, J. H. (2003). New Bromotyrosine Derivatives from an Association of Two Sponges, *Jaspis wondoensis* and *Poecillastra wondoensis*. *Journal of Natural Products*, 66(11). <https://doi.org/10.1021/np030162j>
- Patra, S., Panigrahi, D. P., Praharaj, P. P., Bhol, C. S., Mahapatra, K. K., Mishra, S. R., Behera, B. P., Jena, M., & Bhutia, S. K. (2019). Dysregulation of histone deacetylases in carcinogenesis and tumor progression: a possible link to apoptosis and autophagy. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 76, Issue 17). <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03098-1>
- Pecorino, L. (2016). *Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics*. [https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=KbvyDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Molecular+biology+of+cancer:+mechanisms,+targets,+and+therapeutics&ots=z4Yd81nzx3&sig=REC\\_wwZflh15fpUzbc41r\\_kUrOg](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=KbvyDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Molecular+biology+of+cancer:+mechanisms,+targets,+and+therapeutics&ots=z4Yd81nzx3&sig=REC_wwZflh15fpUzbc41r_kUrOg)
- Peng, L., & Seto, E. (2011). Deacetylation of nonhistone proteins by HDACs and the implications in cancer. *Handbook of Experimental Pharmacology*. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-21631-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-21631-2_3)
- Perry, J. A., Kiezun, A., Tonzi, P., Van Allen, E. M., Carter, S. L., Baca, S. C., Cowley, G. S., Bhatt, A. S., Rheinbay, E., Peadarallu, C. S., Helman, E., Taylor-Weiner, A., McKenna, A., DeLuca, D. S., Lawrence, M. S., Ambrogio, L., Sougnez, C., Sivachenko, A., Walensky, L. D., ... Janeway, K. A. (2014). Complementary genomic approaches highlight the PI3K/mTOR pathway as a common vulnerability in osteosarcoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(51). <https://doi.org/10.1073/pnas.1419260111>

- Petrie, K., Guidez, F., Howell, L., Healy, L., Waxman, S., Greaves, M., & Zelent, A. (2003). The histone deacetylase 9 gene encodes multiple protein isoforms. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212935200>
- Piegari, E., Cozzolino, A., Ciuffreda, L. P., Cappetta, D., De Angelis, A., Urbanek, K., Rossi, F., & Berrino, L. (2020). Cardioprotective effects of miR-34a silencing in a rat model of doxorubicin toxicity. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69038-3>
- Piña, I. C., Gautschi, J. T., Wang, G.-Y.-S., Sanders, M. L., Schmitz, F. J., France, D., Cornell-Kennon, S., Sambucetti, L. C., Remiszewski, S. W., Perez, L. B., Bair, K. W., & Crews, P. (2007). Psammaplins from the Sponge *Pseudoceratina purpurea*: Inhibition of Both Histone Deacetylase and DNA Methyltransferase. *The Journal of Organic Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jo034248t>
- Pojani, E., & Barlocco, D. (2020). Romidepsin (FK228), An Histone Deacetylase Inhibitor, and its Analogues in Cancer Chemotherapy. *Current Medicinal Chemistry*, 28(7). <https://doi.org/10.2174/0929867327666200203113926>
- Qin, H. T., Li, H. Q., & Liu, F. (2017). Selective histone deacetylase small molecule inhibitors: recent progress and perspectives. In *Expert Opinion on Therapeutic Patents* (Vol. 27, Issue 5). <https://doi.org/10.1080/13543776.2017.1276565>
- Qin, X., Ma, D., Tan, Y. xiong, Wang, H. yang, & Cai, Z. (2019). The role of necroptosis in cancer: A double-edged sword? In *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* (Vol. 1871, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.01.006>
- Qiu, L., Liu, H., Wang, S., Dai, X. H., Shang, J. W., Lian, X. L., Wang, G. H., & Zhang, J. (2021). FKBP11 promotes cell proliferation and tumorigenesis via p53-related pathways in oral squamous cell carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 559. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.04.096>
- Qiu, X., Zhu, L., Wang, H., Tan, Y., Yang, Z., Yang, L., & Wan, L. (2021). From natural products to HDAC inhibitors: An overview of drug discovery and design strategy. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 52. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116510>
- Rahhal, R., & Seto, E. (2019). Emerging roles of histone modifications and HDACs in RNA splicing. *Nucleic Acids Research*, 47(10), 4911–4926. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz292>
- RAINA, S., Acad, A. K.-P. I. N. S., & 2019, undefined. (2019). HDAC11: The Lone Mystic Member of Class IV HDAC. *Researchgate.Net*. <https://doi.org/10.16943/ptinsa/2019/49577>
- Rajput, P., Pandey, V., & Kumar, V. (2016). Stimulation of ribosomal RNA gene promoter by transcription factor Sp1 involves active DNA demethylation by Gadd45-NER pathway. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.05.002>
- Ramaiah, M. J., Tangutur, A. D., & Manyam, R. R. (2021). Epigenetic modulation and understanding of HDAC inhibitors in cancer therapy. In *Life Sciences* (Vol. 277). <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119504>
- Ren, Y., Li, S., Zhu, R., Wan, C., Song, D., Zhu, J., Cai, G., Long, S., Kong, L., & Yu, W. (2021). Discovery of STAT3 and Histone Deacetylase (HDAC) Dual-Pathway Inhibitors for the Treatment of Solid Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(11), 7468–7482. [https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.1C00136/SUPPL\\_FILE/JM1C00136\\_SI\\_003.PDF](https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.1C00136/SUPPL_FILE/JM1C00136_SI_003.PDF)
- Rettig, I., Koenke, E., Trippel, F., Mueller, W. C., Burhenne, J., Kopp-Schneider, A., Fabian, J., Schober, A., Fernekorn, U., Von Deimling, A., Deubzer, H. E., Milde, T., Witt, O., & Oehme, I.

- (2015). Selective inhibition of HDAC8 decreases neuroblastoma growth in vitro and in vivo and enhances retinoic acid-mediated differentiation. *Cell Death and Disease*. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.24>
- Revill, P., Mealy, N., Serradell, N., Bolós, J., & Rosa, E. (2007). Panobinostat: Histone deacetylase (HDAC) inhibitor, apoptosis inducer, oncolytic. *Drugs of the Future*, 32(4). <https://doi.org/10.1358/dof.2007.032.04.1094476>
- Ribatti, D., & Tamma, R. (2020). Epigenetic control of tumor angiogenesis. *Microcirculation*, 27(3), e12602. <https://doi.org/10.1111/MICC.12602>
- Rizor, A., Pajarillo, E., Son, D. S., Aschner, M., & Lee, E. (2022). Manganese phosphorylates Yin Yang 1 at serine residues to repress EAAT2 in human H4 astrocytes. *Toxicology Letters*, 355. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2021.11.007>
- Roessner, A., Lohmann, C., & Jechorek, D. (2021). Translational cell biology of highly malignant osteosarcoma. *Pathology International*, 71(5), 291–303. <https://doi.org/10.1111/pin.13080>
- Rojas, G. A., Hubbard, A. K., Diessner, B. J., Ribeiro, K. B., & Spector, L. G. (2021). International trends in incidence of osteosarcoma (1988-2012). *International Journal of Cancer*, 149(5), 1044–1053. <https://doi.org/10.1002/IJC.33673>
- Rudzińska, A., Juchaniuk, P., Oberda, J., Wiśniewska, J., Wojdan, W., Szklener, K., & Mańdziuk, S. (2023). Phytochemicals in Cancer Treatment and Cancer Prevention—Review on Epidemiological Data and Clinical Trials. In *Nutrients* (Vol. 15, Issue 8). <https://doi.org/10.3390/nu15081896>
- RUIJTER, A. J. M. de, GENNIP, A. H. van, CARON, H. N., KEMP, S., & KUILENBURG, A. B. P. van. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochemical Journal*. <https://doi.org/10.1042/bj20021321>
- Ruzic, D., Djoković, N., Srdić-Rajić, T., Echeverria, C., Nikolic, K., Santibanez, J. F., Djoković, N., Srdić, T., Rajić, S.-R., Echeverria, C., Nikolic, K., Santibanez, J. F., Djoković, N., Srdić-Rajić, T., Echeverria, C., Nikolic, K., & Santibanez, J. F. (2022). No Title. 14(1), 209. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35057104/>
- Sadykova, L. R., Ntekim, A. I., Muyangwa-Semenova, M., Rutland, C. S., Jeyapalan, J. N., Blatt, N., & Rizvanov, A. A. (2020). Epidemiology and Risk Factors of Osteosarcoma. *Cancer Investigation*, 38(5), 259–269. <https://doi.org/10.1080/07357907.2020.1768401>
- Samsa, W. E., Mamidi, M. K., Bashur, L. A., Elliott, R., Miron, A., Chen, Y., Lee, B., Greenfield, E. M., Chan, R., Danielpour, D., & Zhou, G. (2020). The crucial p53-dependent oncogenic role of JAB1 in osteosarcoma in vivo. *Oncogene*, 39(23). <https://doi.org/10.1038/s41388-020-1320-6>
- Sangeetha, S., Ranjitha, S., Murugan, K., & Kumar, G. R. (2013). Breast cancer specific histone deacetylase inhibitors and lead discovery using molecular docking and descriptor study. *Trends in Bioinformatics*. <https://doi.org/10.3923/tb.2013.25.44>
- Schuler, M., & Green, D. R. (2001). Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochemical Society Transactions*, 29(6). <https://doi.org/10.1042/0300-5127:0290684>
- Seba, V., Silva, G., Dos Santos, M. B., Baek, S. J., França, S. de C., Fachin, A. L., Regasini, L. O., & Marins, M. (2018). Chalcone derivatives 4'-amino-1-naphthyl-chalcone (D14) and 4'-amino-4-methyl-1-naphthyl-chalcone (D15) suppress migration and invasion of osteosarcoma cells mediated by p53 regulating emt-related genes. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms19092838>

- Sebastiano, V., Dalvai, M., Gentile, L., Schubart, K., Sutter, J., Wu, G.-M., Tapia, N., Esch, D., Ju, J.-Y., Hubner, K., Bravo, M. J. A., Scholer, H. R., Cavaleri, F., & Matthias, P. (2010). Oct1 regulates trophoblast development during early mouse embryogenesis. *Development*. <https://doi.org/10.1242/dev.047027>
- Seca, A. M. L., & Pinto, D. C. G. A. (2018). Plant secondary metabolites as anticancer agents: Successes in clinical trials and therapeutic application. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/ijms19010263>
- Selvam, C., Prabu, S. L., Jordan, B. C., Purushothaman, Y., Umamaheswari, A., Hosseini Zare, M. S., & Thilagavathi, R. (2019). Molecular mechanisms of curcumin and its analogs in colon cancer prevention and treatment. In *Life Sciences* (Vol. 239). <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117032>
- Sethy, C., Goutam, K., Das, B., Dash, S. R., & Kundu, C. N. (2021). Nectin-4 promotes lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in breast cancer by regulating CXCR4-LYVE-1 axis. *Vascular Pharmacology*, 140, 106865. <https://doi.org/10.1016/J.VPH.2021.106865>
- Seto, E., & Yoshida, M. (2014). Erasers of histone acetylation: The histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018713>
- Shankar, S., & Srivastava, R. K. (2007). Involvement of Bcl-2 family members, phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT and mitochondrial p53 in curcumin (diferulolylmethane)- induced apoptosis in prostate cancer. *International Journal of Oncology*, 30(4). <https://doi.org/10.3892/ijo.30.4.905>
- Shin, M. H., He, Y., Marrogi, E., Piperdi, S., Ren, L., Khanna, C., Gorlick, R., Liu, C., & Huang, J. (2016). A RUNX2-Mediated Epigenetic Regulation of the Survival of p53 Defective Cancer Cells. *PLoS Genetics*, 12(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005884>
- Shirsath, S. R., Sable, S. S., Gaikwad, S. G., Sonawane, S. H., Saini, D. R., & Gogate, P. R. (2017). Intensification of extraction of curcumin from *Curcuma amada* using ultrasound assisted approach: Effect of different operating parameters. *Ultrasonics Sonochemistry*, 38. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.03.040>
- Shivdasanl, R. A., Mayer, E. L., & Orkin, S. H. (1995). Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/373432a0>
- Shvedunova, M., & Akhtar, A. (2022). No Title. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35042977>
- Silva, G., Lima, F. T., Seba, V., Mendes Lourenço, A. L., Lucas, T. G., De Andrade, B. V., Torrezan, G. S., Polaquini, C. R., Garcia, M. E., Couto, L. B., Bestetti, R. B., De Castro França, S., Fachin, A. L., Regasini, L. O., & Marins, M. (2018). Curcumin analog CH-5 suppresses the proliferation, migration, and invasion of the human gastric cancer cell line HGC-27. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules23020279>
- Silva, G., Marins, M., Chaichanasak, N., Yoon, Y., Fachin, A. L., Pinhanelli, V. C., Regasini, L. O., Dos Santos, M. B., Ayusso, G. M., De Carvalho Marques, B., Wu, W. W., Phue, J. N., Shen, R. F., & Baek, S. J. (2018). Trans-chalcone increases p53 activity via DNAJB1/HSP40 induction and CRM1 inhibition. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202263>
- Silva, G., Marins, M., Fachin, A. L., Lee, S. H., & Baek, S. J. (2016). Anti-cancer activity of trans-chalcone in osteosarcoma: Involvement of Sp1 and p53. *Molecular Carcinogenesis*, 55(10), 1438–1448. <https://doi.org/10.1002/mc.22386>
- Singh, B. N., Zhang, G., Hwa, Y. L., Li, J., Dowdy, S. C., & Jiang, S. W. (2010). Nonhistone protein acetylation as cancer therapy targets. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 10(6), 935–954. <https://doi.org/10.1586/era.10.62>

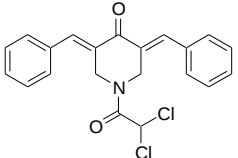
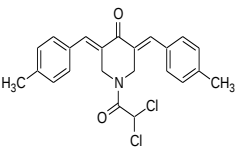
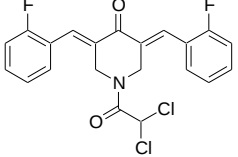
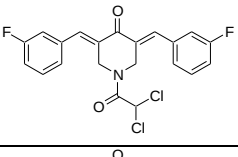
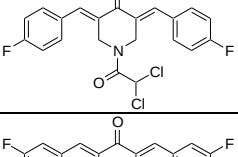
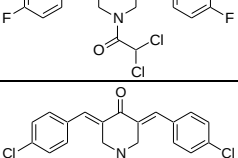
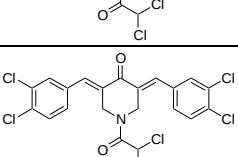
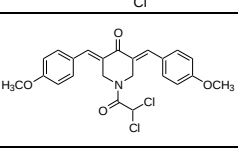
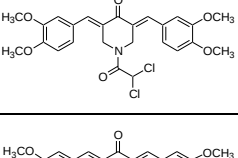
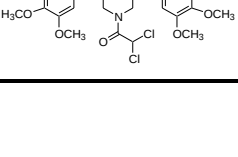
- Singh, V., Singh, R., Kujur, P. K., & Singh, R. P. (2020). Combination of Resveratrol and Quercetin Causes Cell Growth Inhibition, DNA Damage, Cell Cycle Arrest, and Apoptosis in Oral Cancer Cells. *Assay and Drug Development Technologies*, 18(5). <https://doi.org/10.1089/adt.2020.972>
- Solomon, S. S., Majumdar, G., Martinez-Hernandez, A., & Raghow, R. (2008). A critical role of Sp1 transcription factor in regulating gene expression in response to insulin and other hormones. In *Life Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2008.06.024>
- Squire, J. A., Martin, J. W., Zielenska, M., Stein, G. S., & Van Wijnen, A. J. (2011). The role of RUNX2 in osteosarcoma oncogenesis. In *Sarcoma* (Vol. 2011). <https://doi.org/10.1155/2011/282745>
- Stanfield, B. A., Purves, T., Palmer, S., Sullenger, B., Welty-Wolf, K., Haines, K., Agarwal, S., & Kasotakis, G. (2021). IL-10 and class 1 histone deacetylases act synergistically and independently on the secretion of proinflammatory mediators in alveolar macrophages. *PLoS ONE*, 16(1 January). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245169>
- Steele, N. L., Plumb, J. A., Vidal, L., Tjørnelund, J., Knoblauch, P., Rasmussen, A., Chean, E. O., Buhl-Jensen, P., Brown, R., Evans, T. R. J., & DeBono, J. S. (2008). A phase 1 pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the histone deacetylase inhibitor belinostat in patients with advanced solid tumors. *Clinical Cancer Research*, 14(3). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1786>
- Su, M., Gong, X., & Liu, F. (2021). An update on the emerging approaches for histone deacetylase (HDAC) inhibitor drug discovery and future perspectives. In *Expert Opinion on Drug Discovery* (Vol. 16, Issue 7). <https://doi.org/10.1080/17460441.2021.1877656>
- Sudhakar, A. (2009). History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of Cancer Science & Therapy*, 01(02). <https://doi.org/10.4172/1948-5956.100000e2>
- Sung, H., Ferlay, J., ... R. S.-C. a cancer journal, & 2021, undefined. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Wiley Online Library*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Suraweera, A., O'Byrne, K. J., & Richard, D. J. (2018). Combination therapy with histone deacetylase inhibitors (HDACi) for the treatment of cancer: Achieving the full therapeutic potential of HDACi. In *Frontiers in Oncology*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00092>
- Suzuki, T., Kimura, A., Nagai, R., & Horikoshi, M. (2000). Regulation of interaction of the acetyltransferase region of p300 and the DNA-binding domain of Sp1 on and through DNA binding. *Genes to Cells*, 5(1). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2000.00302.x>
- Tamkun, J. W., Deuring, R., Scott, M. P., Kissinger, M., Pattatucci, A. M., Kaufman, T. C., & Kennison, J. A. (1992). brahma: A regulator of Drosophila homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2 SWI2. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90191-E](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90191-E)
- Tang, N., Song, W. X., Luo, J., Haydon, R. C., & He, T. C. (2008). Osteosarcoma development and stem cell differentiation. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 466(9). <https://doi.org/10.1007/s11999-008-0335-z>
- Taori, K., Paul, V. J., & Luesch, H. (2008). Structure and activity of largazole, a potent antiproliferative agent from the Floridian marine cyanobacterium *Symploca* sp. *Journal of the American Chemical Society*. <https://doi.org/10.1021/ja7110064>
- Taunton, J., Hassig, C. A., & Schreiber, S. L. (1996). A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.272.5260.408>
- Tran, V., & Slavin, J. (2021). Bone Tumour Pathology. *Sarcoma*, 69–92. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-9414-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-981-15-9414-4_6)

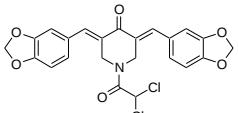
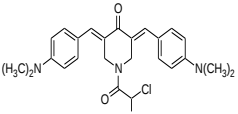
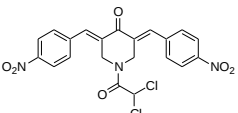
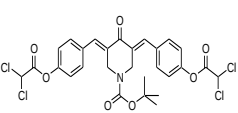
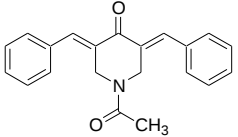
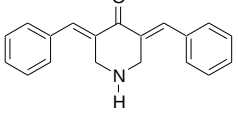
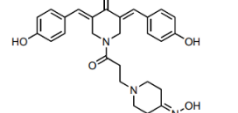
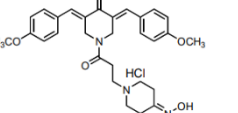
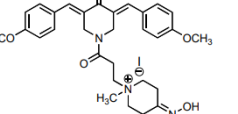
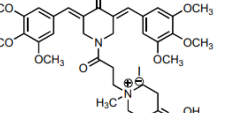
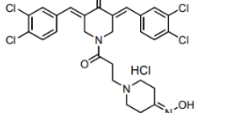
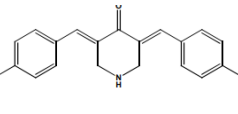
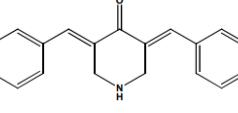
- Tsimberidou, A. M., Fountzilas, E., Nikanjam, M., & Kurzrock, R. (2020). Review of precision cancer medicine: Evolution of the treatment paradigm. In *Cancer Treatment Reviews* (Vol. 86). <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2020.102019>
- Turkman, N., Liu, D., & Pirola, I. (2022). Design, synthesis, biochemical evaluation, radiolabeling and in vivo imaging with high affinity class-IIa histone deacetylase inhibitor for molecular imaging and targeted therapy. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 228, 114011. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2021.114011>
- UEDA, H., NAKAJIMA, H., HORI, Y., FUJITA, T., NISHIMURA, M., GOTO, T., & OKUHARA, M. (2012). FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by chromobacterium violaceum No. 968. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical and biological properties, and antitumor activity. *The Journal of Antibiotics*. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.47.301>
- Van Vliet, J., Crofts, L. A., Quinlan, K. G. R., Czolij, R., Perkins, A. C., & Crossley, M. (2006). Human KLF17 is a new member of the Sp/KLF family of transcription factors. *Genomics*. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2005.12.011>
- Vellettri, T., Xie, N., Wang, Y., Huang, Y., Yang, Q., Chen, X., Chen, Q., Shou, P., Gan, Y., Cao, G., Melino, G., & Shi, Y. (2016). P53 functional abnormality in mesenchymal stem cells promotes osteosarcoma development. In *Cell Death and Disease* (Vol. 7). <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.367>
- Verza, F. A., Das, U., Fachin, A. L. L., Dimmock, J. R., & Marins, M. (2020). Roles of histone deacetylases and inhibitors in anticancer therapy. *Cancers*, 12(6), 1–24. <https://doi.org/10.3390/cancers12061664>
- von Burstin, J., Eser, S., Paul, M. C., Seidler, B., Brandl, M., Messer, M., von Werder, A., Schmidt, A., Mages, J., Pagel, P., Schnieke, A., Schmid, R. M., Schneider, G., & Saur, D. (2009). E-Cadherin Regulates Metastasis of Pancreatic Cancer In Vivo and Is Suppressed by a SNAIL/HDAC1/HDAC2 Repressor Complex. *Gastroenterology*, 137(1). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.04.004>
- Wang, B., Zou, Q., Sun, M., Chen, J., Wang, T., Bai, Y., Chen, Z., Chen, B., & Zhou, M. (2014). Reversion of trichostatin A resistance via inhibition of the Wnt signaling pathway in human pancreatic cancer cells. *Oncology Reports*, 32(5). <https://doi.org/10.3892/or.2014.3476>
- Wang, D., Niu, X., Wang, Z., Song, C. L., Huang, Z., Chen, K. N., Duan, J., Bai, H., Xu, J., Zhao, J., Wang, Y., Zhuo, M., Sunney Xie, X., Kang, X., Tian, Y., Cai, L., Han, J. F., An, T., Sun, Y., ... Wang, J. (2019). Multiregion sequencing reveals the genetic heterogeneity and evolutionary history of osteosarcoma and matched pulmonary metastases. *Cancer Research*, 79(1). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-1086>
- Wang, S. H., Lin, P. Y., Chiu, Y. C., Huang, J. S., Kuo, Y. T., Wu, J. C., & Chen, C. C. (2015). Curcumin-mediated HDAC inhibition suppresses the DNA damage response and contributes to increased DNA damage sensitivity. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134110>
- Wei, H., Qu, L., Dai, S., Li, Y., Wang, H., Feng, Y., Chen, X., Jiang, L., Guo, M., Li, J., Chen, Z., Chen, L., Zhang, Y., & Chen, Y. (2021). Structural insight into the molecular mechanism of p53-mediated mitochondrial apoptosis. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22655-6>
- Werbeck, N. D., Shukla, V. K., Kunze, M. B. A., Yalinca, H., Pritchard, R. B., Siemons, L., Mondal, S., Greenwood, S. O. R., Kirkpatrick, J., Marson, C. M., & Hansen, D. F. (2020). A distal regulatory region of a class I human histone deacetylase. *Nature Communications* 2020 11:1, 11(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17610-w>

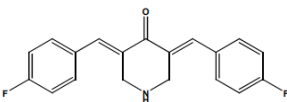
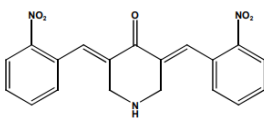
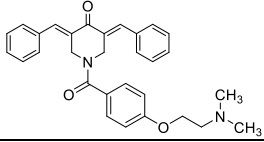
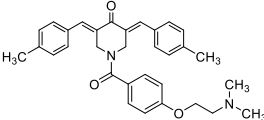
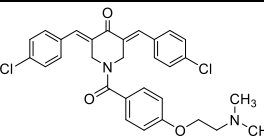
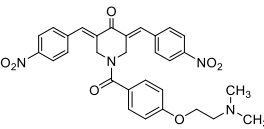
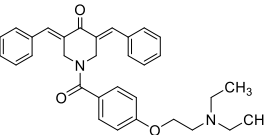
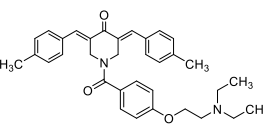
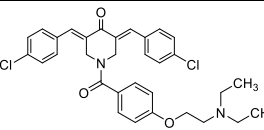
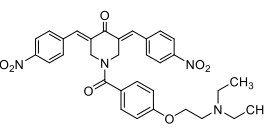
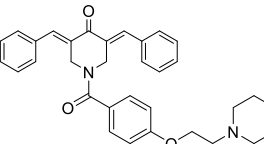
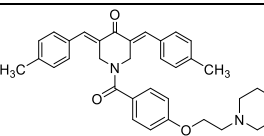
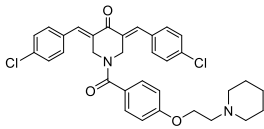
- Witt, O., Deubzer, H. E., Milde, T., & Oehme, I. (2009). HDAC family: What are the cancer relevant targets? In *Cancer Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.08.016>
- Wong, R. P. C., Tsang, W. P., Chau, P. Y., Co, N. N., Tsang, T. Y., & Kwok, T. T. (2007). p53-R273H gains new function in induction of drug resistance through down-regulation of procaspase-3. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(3). <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0336>
- Wu, Y. W., Hsu, K. C., Lee, H. Y., Huang, T. C., Lin, T. E., Chen, Y. L., Sung, T. Y., Liou, J. P., Hwang-Verslues, W. W., Pan, S. L., & HuangFu, W. C. (2018). A novel dual HDAC6 and tubulin inhibitor, MPT0B451, displays anti-tumor ability in human cancer cells in vitro and in vivo. *Frontiers in Pharmacology*, 9(MAR). <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00205>
- Xia, Z., Kon, N., Gu, A. P., Tavana, O., & Gu, W. (2022). Deciphering the acetylation code of p53 in transcription regulation and tumor suppression. In *Oncogene* (Vol. 41, Issue 22). <https://doi.org/10.1038/s41388-022-02331-9>
- Xu, H., Wu, M., Ma, X., Huang, W., & Xu, Y. (2021). Function and Mechanism of Novel Histone Posttranslational Modifications in Health and Disease. In *BioMed Research International* (Vol. 2021). <https://doi.org/10.1155/2021/6635225>
- Xu, Q., Liu, C., Zang, J., Gao, S., Chou, C. J., & Zhang, Y. (2020). Discovery of a Novel Hybrid of Vorinostat and Riluzole as a Potent Antitumor Agent. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00454>
- Xu, W. S., Parmigiani, R. B., & Marks, P. A. (2007). Histone deacetylase inhibitors: Molecular mechanisms of action. In *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210620>
- Yang, W. Bin, Hsu, C. C., Hsu, T. I., Liou, J. P., Chang, K. Y., Chen, P. Y., Liu, J. J., Yang, S. T., Wang, J. Y., Yeh, S. H., Chen, R. M., Chang, W. C., & Chuang, J. Y. (2020). Increased activation of HDAC1/2/6 and Sp1 underlies therapeutic resistance and tumor growth in glioblastoma. *Neuro-Oncology*, 22(10). <https://doi.org/10.1093/neuonc/noaa103>
- Yang, C., Tian, Y., Zhao, F., Chen, Z., Su, P., Li, Y., & Qian, A. (2020). Bone microenvironment and osteosarcoma metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms21196985>
- Yang, J., & Zhang, Y. (2021). New insight into the role of MDMX in MDM2-mediated p53 degradation and anti-cancer drug development. *Oncoscience*, 8. <https://doi.org/10.18632/oncoscience.542>
- Yang, R., Dong, H., Jia, S., & Yang, Z. (2022). Resveratrol as a modulatory of apoptosis and autophagy in cancer therapy. *Clinical and Translational Oncology*, 1–12. <https://doi.org/10.1007/S12094-021-02770-Y/FIGURES/2>
- Yang, W. M., Inouye, C., Zeng, Y., Bearss, D., & Seto, E. (1996). Transcriptional repression by YY1 is mediated by interaction with a mammalian homolog of the yeast global regulator RPD3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Yang, W. M., Yao, Y. L., Sun, J. M., Davie, J. R., & Seto, E. (1997). Isolation and characterization of cDNAs corresponding to an additional member of the human histone deacetylase gene family. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.44.28001>
- Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M., & Beppu, T. (1990). Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *Journal of Biological Chemistry*, 265(28), 17174–17179. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)44885-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)44885-X)

- You, H., Li, Q., Kong, D., Liu, X., Kong, F., Zheng, K., & Tang, R. (2022). *The interaction of canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling with protein lysine acetylation*. 27(1), 7. <https://doi.org/10.1186/S11658-021-00305-5>
- Yu, K., Zhang, Q., Liu, Z., Du, Y., Gao, X., Zhao, Q., Cheng, H., Li, X., & Liu, Z. X. (2020). Deep learning based prediction of reversible HAT/HDAC-specific lysine acetylation. *Briefings in Bioinformatics*, 21(5), 1798–1805. <https://doi.org/10.1093/BIB/BBZ107>
- Yu, Y., Liu, B., Chen, S., Wang, J., Chen, F., Liu, T., Jiang, N., Chen, W., Weng, S., Cai, X., & Xiang, D. (2022). Trichostatin A inhibits dendritic cell maturation through down-regulating NF- $\kappa$ B (p65) pathway. *Molecular Biology Reports*. <https://doi.org/10.1007/S11033-021-07065-7>
- Yun, H. S., Lee, J., Kim, J. Y., Sim, Y. J., Lee, C. W., Park, J. K., Kim, J. S., Ahn, J., Song, J. Y., Baek, J. H., & Hwang, S. G. (2022). A novel function of HRP-3 in regulating cell cycle progression via the HDAC-E2F1-Cyclin E pathway in lung cancer. *Cancer Science*, 113(1), 145–155. <https://doi.org/10.1111/CAS.15183>
- Zhao, S., Venkatasubbarao, K., Li, S., & Freeman, J. W. (2003). Requirement of a specific Sp1 site for histone deacetylase-mediated repression of transforming growth factor  $\beta$  type II receptor expression in human pancreatic cancer cells. *Cancer Research*, 63(10).
- Zheng, Y., Wang, G., Chen, R., Hua, Y., & Cai, Z. (2018). Mesenchymal stem cells in the osteosarcoma microenvironment: Their biological properties, influence on tumor growth, and therapeutic implications. In *Stem Cell Research and Therapy* (Vol. 9, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0780-x>
- Zhou, M., Yuan, M., Zhang, M., Lei, C., Aras, O., Zhang, X., & An, F. (2021). Combining histone deacetylase inhibitors (HDACis) with other therapies for cancer therapy. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 226. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113825>
- Zhu, X., Leboeuf, M., Liu, F., Grachtchouk, M., Seykora, J. T., Morrissey, E. E., Dlugosz, A. A., & Millar, S. E. (2022). HDAC1/2 Control Proliferation and Survival in Adult Epidermis and Pre-Basal Cell Carcinoma through p16 and p53. *The Journal of Investigative Dermatology*, 142(1), 77-87.e10. <https://doi.org/10.1016/J.JID.2021.05.026>
- Zoi, V., Galani, V., Lianos, G. D., Voulgaris, S., Kyritsis, A. P., & Alexiou, G. A. (2021). The role of curcumin in cancer treatment. In *Biomedicines* (Vol. 9, Issue 9). <https://doi.org/10.3390/biomedicines9091086>

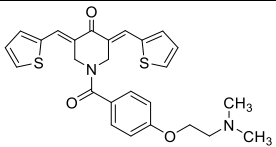
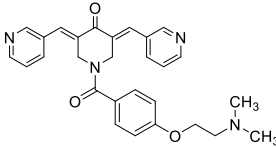
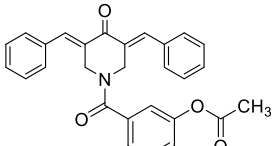
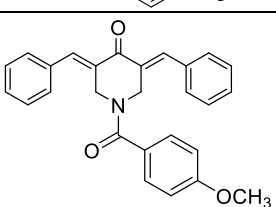
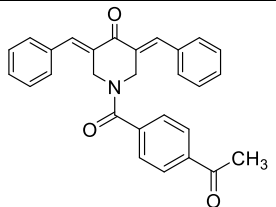
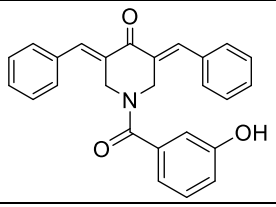
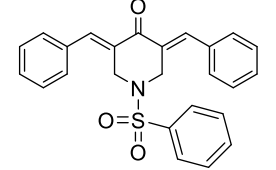
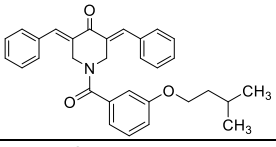
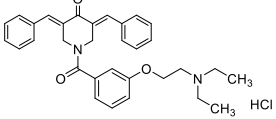
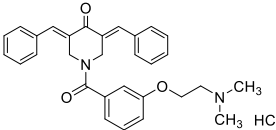
## ANEXO 1

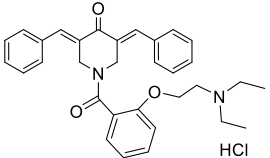
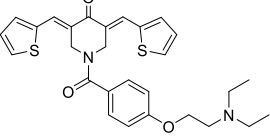
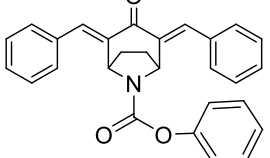
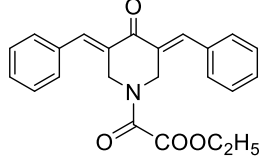
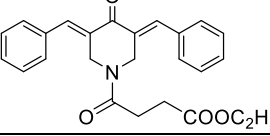
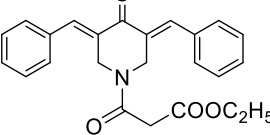
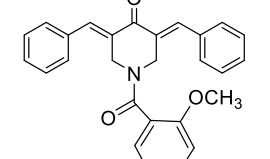
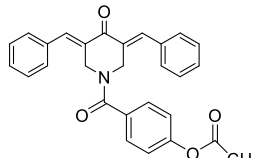
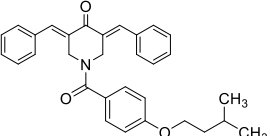
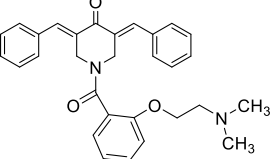
| #NC  | STRUCTURE                                                                           | MOL.WT | SOLUBILITY |         |       |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------|------------|---------|-------|
|      |                                                                                     |        | DMSO       | ETHANOL | WATER |
| 2603 |    | 386.27 | √          | ×       | ×     |
| 2604 |    | 414.32 | √          | ×       | ×     |
| 2605 |    | 422.25 | √          | ×       | ×     |
| 2606 |   | 422.25 | √          | ×       | ×     |
| 2607 |  | 422.25 | √          | ×       | ×     |
| 2608 |  | 458.23 | √          | ×       | ×     |
| 2609 |  | 455.16 | √          | ×       | ×     |
| 2610 |  | 524.05 | √          | ×       | ×     |
| 2611 |  | 446.32 | √          | ×       | ×     |
| 2612 |  | 506.37 | √          | ×       | ×     |
| 2613 |  | 566.43 | √          | ×       | ×     |

|      |                                                                                     |          |   |   |   |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------|---|---|---|
| 2614 |    | 474.29   | √ | × | × |
| 2615 |    | 472.41   | √ | × | × |
| 2616 |    | 476.27   | √ | × | × |
| 2617 |    | 629.31   | √ | × | × |
| 2624 |    | 317.38   | √ | × | × |
| 1831 |   | 275.34   | √ | × | × |
| 2581 |  | 475.5363 | √ | × | × |
| 2579 |  | 540.0504 | √ | × | × |
| 2588 |  | 645.5284 | √ | × | × |
| 2589 |  | 765.6323 | √ | × | × |
| 2576 |  | 617.7786 | √ | × | × |
| 1834 |  | 335.1521 | √ | √ | × |
| 1831 |  | 275.3444 | √ | √ | × |

|      |                                                                                     |          |   |   |   |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------|---|---|---|
| 1833 |    | 311.3253 | √ | √ | × |
| 2062 |    | 365.3395 | √ | √ | × |
| 2067 |    | 503.05   | √ | × | × |
| 2089 |    | 540.10   | √ | × | × |
| 2090 |    | 580.94   | √ | × | × |
| 2091 |   | 602.04   | √ | × | × |
| 2066 |  | 540.10   | √ | × | × |
| 2069 |  | 559.15   | √ | × | × |
| 2068 |  | 599.99   | √ | × | × |
| 2070 |  | 621.10   | √ | × | × |
| 2085 |  | 552.11   | √ | × | × |
| 2086 |  | 580.17   | √ | × | × |
| 2087 |  | 621.00   | √ | × | × |



|      |                                                                                     |        |   |   |   |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------|---|---|---|
| 2528 |    | 514.63 | √ | × | × |
| 2529 |    | 531.56 | √ | × | × |
| 2424 |    | 446.49 | √ | × | × |
| 2064 |    | 409.49 | √ | × | × |
| 2065 |   | 430.50 | √ | × | × |
| 2427 |  | 395.45 | √ | × | × |
| 2378 |  | 415.51 | √ | × | × |
| 2330 |  | 474.58 | √ | × | × |
| 2101 |  | 531.10 | √ | × | × |
| 2102 |  | 503.05 | √ | × | × |

|      |                                                                                     |        |   |   |   |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------|---|---|---|
| 2103 |    | 531.10 | √ | × | × |
| 2105 |    | 561.15 | √ | × | × |
| 2376 |    | 425.99 | √ | × | × |
| 2135 |    | 375.43 | √ | × | × |
| 2136 |   | 403.48 | √ | × | × |
| 2137 |  | 389.46 | √ | × | × |
| 2144 |  | 409.48 | √ | × | × |
| 2369 |  | 441.99 | √ | × | × |
| 2094 |  | 465.60 | √ | × | × |
| 2329 |  | 521.03 | √ | × | × |

|      |  |        |   |   |   |
|------|--|--------|---|---|---|
| 2138 |  | 409.49 | √ | × | × |
| 2162 |  | 373.88 | √ | × | × |
| 2331 |  | 404.45 | √ | × | × |
| 2377 |  | 401.47 | √ | × | × |
| 2096 |  | 642.76 | √ | × | × |
| 2368 |  | 399.95 | √ | × | × |
| 2288 |  | 234.29 | √ | × | × |
| 2134 |  | 485.72 | √ | × | × |

## ANEXO 2

### 1. Cultivo Celular:

**Meio de Cultura:** As células são cultivadas em um meio de cultura apropriado que fornece os nutrientes, sais, aminoácidos e vitaminas necessários para o seu crescimento.

**Estufa de Cultivo:** As culturas celulares são mantidas em incubadoras ou estufas com controle rigoroso de temperatura, umidade e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). A temperatura padrão é 37°C para células humanas.

**Meio Estéril:** Todas as técnicas devem ser realizadas em um ambiente estéril para evitar contaminação.

### 2. Passagem Celular:

**Confluência:** Quando as células atingem uma certa densidade (confluência – cerca de 80%) no recipiente de cultura, elas precisam ser passadas para um novo recipiente para evitar superconfluência e parada no crescimento.

**Dissociação:** As células são tratadas com enzimas como tripsina para se desprenderem do recipiente de cultura.

**Diluição e Replante:** As células são diluídas em meio fresco e replantadas em novos recipientes de cultura.

### 3. Ciclo de Descongelamento/Expansão:

**Células Criopreservadas:** As linhagens celulares são frequentemente criopreservadas para garantir sua longevidade. Elas são armazenadas em nitrogênio líquido em temperaturas muito baixas.

#### Protocolo de Descongelamento:

**Preparação do Meio de Cultura:** Prepare o meio de cultura completo e aqueça-o a 37°C. O meio deve conter todos os nutrientes necessários para o crescimento celular, geralmente suplementado com soro fetal bovino (FBS) ou substitutos do soro.

**Retirada do Vial Criopreservado:** Retire o vial contendo as células criopreservadas do nitrogênio líquido e imediatamente coloque-o em um banho-maria a 37°C para descongelar rapidamente.

**Descongelamento Rápido:** Gire suavemente o vial no banho-maria para garantir que o conteúdo descongele uniformemente. Assim que o conteúdo estiver completamente descongelado, transfira-o rapidamente para um tubo cônico de 15 mL contendo meio de cultura pré-aquecido.

**Centrifugação:** Centrifugue as células a baixa velocidade para remover o meio de congelamento e ressuspender as células em meio fresco.

**Expansão:** Após o descongelamento bem-sucedido, as células são expandidas em culturas sucessivas conforme necessário para experimentos.

#### **Protocolo de Expansão:**

**Semeadura das Células:** Baseando-se na densidade celular desejada, semeie as células em novos frascos de cultura contendo meio fresco. Assegure-se de que o meio contém todos os suplementos necessários para o crescimento celular.

**Incubação:** Coloque os frascos de cultura na incubadora a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> e umidade adequada. As células devem ser monitoradas regularmente para verificar seu crescimento e saúde.

**Troca de Meio:** Substitua o meio de cultura regularmente (a cada 2 dias) para fornecer nutrientes frescos às células e remover produtos residuais do metabolismo celular.

**Passagens Subsequentes:** Quando as células atingirem uma confluência de aproximadamente 70-80%, elas devem ser passadas para novos frascos para evitar a superconfluência, o que pode prejudicar o crescimento celular. Siga os procedimentos de passagem, incluindo a lavagem com solução tamponada Hanks e a digestão com tripsina, conforme apropriado para o tipo de célula.

**Armazenamento de Backup:** Uma vez que as células foram expandidas com sucesso, prepare vários vials de células para criopreservação e armazene-os no nitrogênio líquido como backup para futuros experimentos.

#### **4. Documentação e Registros:**

**Registro Detalhado:** Todas as passagens, datas, concentrações celulares, meios de cultura e condições ambientais devem ser cuidadosamente registrados.

**Backup:** É essencial manter amostras congeladas como backup em caso de problemas com a cultura em crescimento.

#### **5. Preparo da solução tamponada de Hanks:**

A solução tamponada de Hanks, também conhecida como solução salina balanceada de Hanks (HBSS, do inglês Hank's Balanced Salt Solution), é uma solução tampão usada em laboratórios para várias aplicações, incluindo cultivo celular, técnicas de biologia molecular e procedimentos de diagnóstico. Ela mantém o pH e a osmolaridade adequados para as células em cultura. Aqui está uma receita básica para preparar a solução tamponada de Hanks:

#### **Ingredientes:**

Água destilada ou deionizada  
Cloreto de sódio (NaCl)  
Fosfato de sódio dibásico anidro (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)

Cloreto de potássio (KCl)  
Fosfato de potássio monobásico anidro (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)  
Bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>)  
Glucose (opcional, dependendo da aplicação)

**Procedimento:**

Em um recipiente grande, adicione 800 mL de água destilada ou deionizada.

Adicione os seguintes sais à água enquanto agita para dissolvê-los completamente:

8 g de NaCl (cloreto de sódio)  
0,4 g de KCl (cloreto de potássio)  
0,03 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (fosfato de potássio monobásico)  
0,06 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (fosfato de sódio dibásico anidro)

Se necessário, adicione glucose (aproximadamente 1 g) para aplicações que requerem energia para as células.

Ajuste o pH e a Osmolaridade:

Use ácido clorídrico (HCl) ou hidróxido de sódio (NaOH) para ajustar o pH da solução para cerca de 7,2 a 7,4. O pH deve ser verificado com um medidor de pH calibrado.

Complete o Volume e Estabilize a Solução:

Complete o volume para 1 litro com água destilada ou deionizada.

Se necessário, adicione NaHCO<sub>3</sub> (bicarbonato de sódio) em pequenas quantidades para ajudar a manter o pH da solução durante procedimentos mais longos.

Esterilize e Armazene:

Filtrar a solução através de um filtro de membrana de 0,22 µm para esterilização.

Armazene a solução tamponada de Hanks em frascos estéreis e protegidos da luz a temperatura ambiente ou na geladeira, dependendo da necessidade de uso imediato ou armazenamento a longo prazo.

Antes de usar a solução tamponada de Hanks, é importante verificar a sua esterilidade, especialmente se for usada em culturas celulares ou em outros contextos onde a contaminação deve ser evitada.

**6. Preparo da solução de tripsina:**

A tripsina é uma enzima proteolítica frequentemente utilizada em laboratórios de biologia celular para dissociar células aderentes de placas de cultura, permitindo sua passagem e subsequente cultivo ou análise. Para preparar uma solução de tripsina, siga estas etapas:

**Ingredientes:**

Tripsina: A quantidade dependerá da concentração da solução desejada e do volume necessário.

EDTA (Ácido Etilenodiaminotetracético): Usado para inibir a ação da tripsina e proteger as células durante o processo de dissociação.

Solução Salina Balanceada de Hanks (HBSS) ou PBS (solução salina tamponada com fosfato): Usada como veículo para a tripsina.

#### Procedimento:

Dissolva a quantidade apropriada de tripsina em uma quantidade pequena de HBSS ou PBS para criar uma solução concentrada. A concentração típica de tripsina varia entre 0,025% a 0,5%.

Adicione EDTA à solução de tripsina para alcançar uma concentração final de 0,1% a 0,5%. O EDTA inibe a tripsina e protege as células durante a dissociação.

#### Misture e Dissolva:

Agite ou misture suavemente para garantir que a tripsina e o EDTA estejam completamente dissolvidos na solução salina.

#### Estéril e Armazene:

Filtre a solução de tripsina-EDTA usando um filtro de membrana estéril de 0,22 µm para garantir a esterilidade.

Armazene a solução de tripsina estéril em frascos herméticos e protegidos da luz a temperaturas adequadas para sua estabilidade. Geralmente, a solução de tripsina é armazenada a -20°C.

Uso: Quando necessário, a solução de tripsina é adicionada às células aderentes em uma placa de cultura. Após um curto período de incubação, a tripsina dissociará as células, permitindo que sejam recolhidas e centrifugadas. Após a remoção do sobrenadante, as células podem ser ressuspensas em meio fresco para cultivo ou em tampão para análises posteriores. É crucial monitorar de perto o processo, pois o tempo de exposição à tripsina deve ser controlado para evitar danos às células.