



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**HÉVERTON MENDES ARAÚJO**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO E POLARIZANTE DE DERIVADO  
SINTÉTICO 1,2,4-OXADIAZOL EM CÉLULAS DE MELANOMA E MDMO  
MURINOS**

**FORTALEZA – CEARÁ**

**2023**

HÉVERTON MENDES ARAÚJO

AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO E POLARIZANTE DE DERIVADO  
SINTÉTICO 1,2,4-OXADIAZOL EM CÉLULAS DE MELANOMA E MDMO  
MURINOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

**Área de concentração:** Biologia para Saúde.

**Orientador:** Prof. Dr. Roberto Nicolete

**FORTALEZA – CEARÁ**

**2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

A689a Araújo, Héverton Mendes.

Avaliação do efeito citotóxico e polarizante de derivado sintético 1,2,4-oxadiazol em células de melanoma e mdmo murinos / Héverton Mendes Araújo. – 2023.  
109 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2023.  
Orientação: Prof. Dr. Roberto Nicolete.

1. 1,2,4 oxadiazol. 2. melanoma murino. 3. TAMs. 4. antitumoral. 5. imunomodulador. I. Título.  
CDD 615

---

HÉVERTON MENDES ARAÚJO

AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO E POLARIZANTE DE DERIVADO  
SINTÉTICO 1,2,4-OXADIAZOL EM CÉLUAS DE MELANOMA E MDMO  
MURINOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Farmacêuticas  
da Universidade Federal do Ceará,  
como requisito para obtenção do grau de  
Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Roberto Nicolete  
Fundação Oswaldo Cruz – Ceará

---

Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dra. Juliana Navarro Ueda Yaochite  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. Jaime Ribeiro Filho  
Fundação Oswaldo Cruz – Ceará

---

Dr. Raphael de Oliveira Rodrigues  
Universidade Federal do Ceará

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, saúde, capacidade e oportunidades que me levaram até este momento.

A minha esposa Dáfani, pelo amor, pelo companheirismo de uma vida, pela compreensão, pela presença nos momentos mais difíceis, por lutar, sonhar e realizar junto.

A minha mãe Flávia, pelo amor e dedicação infinitos, pelo exemplo de força, garra, perseverança e por me mostrar que as dificuldades do dia-a-dia sempre podem ser superadas.

Ao meu pai Aílton, pelo amor, pelo exemplo de hombridade, por nunca ter medido esforços para que tivesse acesso à educação e saúde de qualidade.

A minha vovó Toinha, madrinha Stella (*in memorian*), padrinho Isaac (*in memorian*) e tia Lisieux (*in memorian*), pela participação tão intensa na minha criação, por tanto amor e carinho, por me proporcionarem uma infância feliz, uma adolescência repleta de possibilidades e uma vida adulta estruturada.

Aos meus irmãos Hudson e Bianca, pelo amor, pela presença, pela parceria em todos os momentos.

Aos meus tios paternos Airton, Amilton, Sueli e primos Charles e Davi e tios maternos Nereide, Dedé, Damião, Airton, Neide, Fernando, João, Fan, Nemésio, Marilac, Luzinha, e todos os primos pela união e exemplo familiar e tantos momentos felizes.

Ao meu orientador, Prof. Roberto Nicolete, por ter me concedido a oportunidade de cursar o doutorado, pela relação educada, respeitosa e amistosa mantida durante esses anos, pela compreensão em relação aos assuntos externos ao doutorado, pelo exemplo de competência e disposição em ensinar aos seus alunos.

Aos amigos do grupo de pesquisa da Fiocruz Yasmin, Gabriel, Marlos, Juliana, João Pedro, Cristian, Vanessa e Erika, pelos bons momentos vividos e pelo suporte nos estudos e experimentos.

Ao Prof. Ramon, Emanuel, Lyana e toda o grupo do Laboratório de Toxicologia Experimental e Analítica (LabTOX) e Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica (LBFBC) por abrirem as portas dos laboratórios e pela grande ajuda na realização dos experimentos.

Aos meus queridos amigos Lucyana, Juliana, Jéssica, Elita e Maxwilliam, colegas de trabalho, por tornarem mais leves os expedientes, por ocuparem com maestria a ausência do meu convívio familiar e pelo suporte nas horas difíceis.

A Gabriela, Marta, Alisson e demais integrantes do Biotério do NPDM pelos ensinamentos e suporte dado durante o manejo dos camundongos.

Ao Felipe Barros pelo direcionamento fundamental e disposição em auxiliar nos experimentos.

A Simone, Juliane e Maira pelo empenho em reabilitar a minha saúde.

Aos coordenadores e colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela sensibilidade em conceder-me afastamento parcial para que pudesse cursar o doutorado.

A fundação Oswaldo Cruz - Ceará e a Universidade Federal do Ceará pelo suporte financeiro e administrativo necessários para a realização deste trabalho.

## RESUMO

Câncer é um termo genericamente utilizado para se referir a um conjunto de doenças que apresentam como características marcantes a proliferação desordenada de células malignas e metástase. Embora o microambiente tumoral (TME) seja formado por diversas células inflamatórias, os macrófagos os mais numerosos representantes deste grupo e, a depender da estimulação, desempenham papel pró-tumoral ou antitumoral. O câncer de pele é o mais frequente dentre todos. Dentro deste grupo destaca-se o melanoma que apesar da baixa incidência, apresenta a maior letalidade. Ainda na década de 70, a dacarbazina foi o primeiro quimioterápico empregado em monoterapia para o melanoma metastático. O pouco sucesso terapêuticos levou ao emprego de imunoterapia associada em busca de melhorar a sobrevida dos pacientes. Desde então a imunoterapia foi se desenvolvendo e hoje a abordagem de macrófagos associados ao tumor (TAMs) vêm ganhando vem apresentando bons resultados. As principais estratégias baseiam-se em limitar o recrutamento de TAMs através do bloqueio da ação das quimiocinas CCL2 e CXCL12, reduzir a quantidade de TAMs M2 induzindo sua morte e repolarizar para o fenótipo M1 os TAMs no TME através do emprego de agonistas CD40, antagonistas CD47, inibidores PI3K $\gamma$  e de HDAC de classe II. A classe dos oxadiazóis se caracteriza pela presença de um heterociclo formado por dois átomos de carbono, dois átomos de nitrogênio e um átomo de oxigênio e mais duas duplas ligações. Um dos isômeros, o anel 1,2,4-oxadiazol, tem sido descrito na literatura como bioisómero de amidas. O objetivo do nosso trabalho foi avaliar o efeito antitumoral e imunomodulador de derivado sintético 1,2,4 oxadiazol, o N-ciclohexil-3-(3-metilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-amina denominado como molécula 2, por meio de ensaios *in vitro*. Para tanto, foram avaliadas a citotoxicidade em linhagem B16-F10 de melanoma e macrófagos derivados de medula óssea (MDMO) ambos oriundos de murino, pelo método MTT, além da identificação de via de morte por apoptose/necrose por citometria de fluxo em B16-F10, investigação de alteração fenotípica nos MDMO após estimulação com a molécula 2, LPS e sobrenadante de cultura de melanoma murino em condições variadas, também por citometria de fluxo, e dosagem de citocinas nos sobrenadantes recolhidos de MDMO por ensaio imunoenzimático (ELISA). A molécula 2 foi capaz de inibir a proliferação tanto de B16-F10 quanto de MDMO,  $IC_{50} = 50,99\mu M$  e  $EC_{50} = 132,7\mu M$  respectivamente. As concentrações 50,99, 76,48 e 101,98 $\mu M$  induziram morte celular por necrose em B16-F10, com porcentagens de marcação para 7-AAD entre 70 e 75% das células. A estimulação por 33,17 e 66,35 $\mu M$  alteraram o fenótipo dos MDMO para o M1 com marcação CD11b acima de 78% das células e induziram a produção de TNF- $\alpha$ . A estimulação com os sobrenadantes A, B, C e D, oriundos de cultura de melanoma alteraram, o fenótipo de MDMO para M1 em diferentes porcentagens. Os sobrenadantes C e D induziram a produção de NO, TNF- $\alpha$  e IL-12. A estimulação conjunta molécula 2 + LPS e molécula 2 + sobrenadante A alteraram o fenótipo dos MDMO para M1 com marcações para CD11b acima de 80% das células e induziram a produção de NO, TNF- $\alpha$  e IL-12 em diferentes concentrações. A molécula 2 endossa o potencial farmacológico da classe dos oxadiazóis. Novos estudos aprofundando as atividades antitumoral e imunomodulatória são necessários para elucidar os mecanismos pelos quais a molécula 2 desempenha suas atividades aqui demonstradas.

**Palavras-chave:** 1,2,4 oxadiazol, melanoma murino, TAMs, antitumoral, imunomodulador

## ABSTRACT

Cancer is a term generally used to refer to a set of diseases characterized by the uncontrolled proliferation of malignant cells and metastasis. The tumor microenvironment (TME) is composed of various inflammatory cells, with macrophages being the most numerous representatives. Depending on the stimulation, macrophages can play a pro-tumoral or anti-tumoral role. Skin cancer is the most frequent among them, with melanoma standing out due to its low incidence but high lethality. In the 1970s, dacarbazine was the first chemotherapy used for metastatic melanoma. Limited therapeutic success led to the use of immunotherapy to improve patient survival. Over time, immunotherapy targeting tumor-associated macrophages (TAMs) has shown promising results. Strategies include limiting TAM recruitment by blocking chemokines CCL2 and CXCL12, reducing M2 TAMs quantity, inducing their death, and repolarizing TAMs to the M1 phenotype using CD40 agonists, CD47 antagonists, PI3K $\gamma$  inhibitors, and class II HDAC inhibitors. The oxadiazole class, characterized by a heterocycle of two carbon atoms, two nitrogen atoms, one oxygen atom, and two double bonds, includes the isomer 1,2,4-oxadiazole, described as a bioisostere of amides. Our study aimed to evaluate the antitumor and immunomodulatory effects of the synthetic derivative 1,2,4-oxadiazole, N-cyclohexyl-3-(3-methylphenyl)-1,2,4-oxadiazole-5-amine, named molecule 2. In vitro assays assessed cytotoxicity in B16-F10 melanoma and bone marrow-derived macrophages (BMDMs), both murine, using the MTT method. Flow cytometry determined apoptosis/necrosis pathways in B16-F10, phenotypic changes in BMDMs after molecule 2, LPS, and murine melanoma supernatant stimulation, and cytokine levels in BMDM supernatants by ELISA. Molecule 2 inhibited proliferation in both B16-F10 (IC<sub>50</sub> = 50.99 $\mu$ M) and BMDMs (EC<sub>50</sub> = 132.7 $\mu$ M). Concentrations of 50.99, 76.48, and 101.98 $\mu$ M induced necrotic cell death in B16-F10 (7-AAD labeling between 70-75%). Stimulation with 33.17 and 66.35 $\mu$ M shifted BMDM phenotype to M1 (CD11b > 78%) and induced TNF- $\alpha$  production. Supernatants A, B, C, and D altered BMDM phenotype to M1 in varying percentages. Supernatants C and D induced NO, TNF- $\alpha$ , and IL-12 production. Co-stimulation with molecule 2 + LPS and molecule 2 + supernatant A shifted BMDM phenotype to M1 (CD11b > 80%) and induced NO, TNF- $\alpha$ , and IL-12 production at different concentrations. Molecule 2 underscores the pharmacological potential of oxadiazoles, necessitating further studies to elucidate its demonstrated activities in antitumor and immunomodulation.

**Keywords:** 1,2,4 oxadiazole, murine melanoma, TAMs, antitumoral, immunomodulator.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Características adquiridas durante a carcinogênese .....	23
<b>Figura 2:</b> Incidência e mortalidade mundial do câncer .....	25
<b>Figura 3:</b> Incidência e mortalidade do câncer no Brasil.....	25
<b>Figura 4:</b> Semelhanças e diferenças entre processo inflamatório infeccioso e processo inflamatório relacionado ao câncer .....	27
<b>Figura 5:</b> Receptores presentes nos macrófagos.....	34
<b>Figura 6:</b> Estratégias imunoterapêuticas com alvo em TAMs .....	40
<b>Figura 7:</b> Representação dos quatro isômeros do anel oxadiazol.....	42
<b>Figura 8:</b> Estruturas do ácido quiquáslico, phidanidina A e phidianidina .....	45
<b>Figura 9:</b> Representação da obtenção de células imaturas da medula óssea de camundongos .....	53
<b>Figura 10:</b> Representação esquemática do ensaio do MTT para avaliação de citotoxicidade celular .....	55
<b>Figura 11:</b> Representação esquemática do ensaio de via de morte celular por apoptose/necrose em melanoma murino .....	57
<b>Figura 12:</b> Gráficos <i>dotplot</i> mostrando as regiões definidas como Gates 1 e 2 .....	58
<b>Figura 13:</b> Representação esquemática do ensaio de avaliação do fenótipo dos MDMO após estimulação com a molécula 2, LPS e Sobrenadantes oriundos de melanoma murino .....	61
<b>Figura 14:</b> Representação esquemática do ensaio de dosagem de nitrito em sobrenadantes de MDMO .....	62
<b>Figura 15:</b> Representação esquemática do ensaio de dosagem de TNF- $\alpha$ e IL-12 em sobrenadantes de MDMO.....	63
<b>Figura 16:</b> Porcentagens de inibição de crescimento e valor de IC50 de linhagem B16-F10 após 72h de exposição à molécula 2 .....	68
<b>Figura 17:</b> Porcentagens de células marcadas com AxPE/7-AAD em ensaio de via de morte celular realizado em linhagem B16-F10 após 48h de exposição à molécula 2 ....	70
<b>Figura 18:</b> Células coletadas da medula óssea de camundongos durante processo de diferenciação de MDMO em diferentes dias.....	71
<b>Figura 19:</b> Identificação de macrófagos após processo de diferenciação .....	72
<b>Figura 20:</b> Porcentagens de inibição de crescimento e valor de EC50 de MDMO após 72h de exposição à molécula 2 .....	73

<b>Figura 21:</b> Perfil fenotípico de MDMO após 48h de estimulação com LPS e molécula 2 .....	75
<b>Figura 22:</b> Valores detectados de nitrito, TNF- $\alpha$ e IL-12 no sobrenadante de MDMO após 48h de estimulação com LPS e molécula 2 .....	76
<b>Figura 23:</b> Perfil fenotípico de MDMO após 48h de estimulação com sobrenadantes de melanoma murino .....	78
<b>Figura 24:</b> Valores detectados de nitrito, TNF- $\alpha$ e IL-12 no sobrenadante de MDMO após 48h de estimulação com LPS e molécula 2.....	79
<b>Figura 25:</b> Perfil fenotípico de MDMO após 48h de estimulação pelos conjuntos molécula 2 + Sobrenadante A e molécula 2 + LPS .....	82
<b>Figura 26:</b> Valores detectados de nitrito, TNF- $\alpha$ e IL-12 no sobrenadante de MDMO após 48h de estimulação pelos conjuntos molécula 2 + LPS e molécula 2 + sobrenadante A	83

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Derivados sintéticos 1,2,4-oxadiazol abordados no estudo .....	51
<b>Tabela 2:</b> Porcentagens de inibição de crescimento após 72h de exposição aos derivados sintéticos 1,2,4-oxadiazol em concentração fixa de 100 $\mu\text{M}$ . .....	65
<b>Tabela 3:</b> Valores de IC50 e EC50 expressos em $\mu\text{M}$ após 72h de exposição aos derivados sintéticos 1,2,4-oxadiazol.....	66
<b>Tabela 4:</b> Valores do IS.....	67
<b>Tabela 5:</b> Porcentagens de inibição, valores de IC50 e EC50 e IS após 72h de exposição melanoma murino e MDMO à molécula 2.....	73

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1:</b> Obtenção do anel 1,2,4-oxadiazol a partir da cicloadição 1,3-dipolar entre iminas e oximas .....	44
<b>Esquema 2:</b> Obtenção do anel 1,2,4-oxadiazol a partir da cicloadição 1,3-dipolar entre nitrila e óxido de nitrilas.....	44
<b>Esquema 3:</b> Obtenção do anel 1,2,4-oxadiazol a partir da condensação de N-acilmidoximas e O-acilmidoximas .....	44
<b>Esquema 4:</b> Síntese dos compostos N-ciclohexil-1,2,4-oxadiazóis.....	49
<b>Esquema 5:</b> Síntese dos compostos alcinos-1,2,4-oxadiazóis.....	49
<b>Esquema 6:</b> Síntese dos glicoglicero-triazol-1,2,4-oxadiazol .....	50

## LISTA DE FLUXOGRAMAS

<b>Fluxograma 1:</b> Estratégia metodológica empregada no estudo .....	48
--	----

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

7-AAD	7-aminoactinomicina
ANOVA	Análise de Variância
AX-PE	Anexin-V Conjugada com Ficoeritrina
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
CEUA	Comit de tica no Uso de Animais
CSF-M	Fator Estimulante de Colnia de Macrófagos
DCC	Solução de arilamidoximas e diciclohexilcarbodiimida
DMEM	Meio de Cultura <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetil Sulfóxido
EC <sub>50</sub>	Concentrao Efetiva Mínima
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
EPM	Erro Padrão Médio
EROs	Espécies Reativas de Oxignio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FSC	<i>Foward Scatter</i>
h	Horas
HPV	Papilomavírus Humano
HRP	Peroxidase de Rbano
HVB	Vírus da Hepatite B
IC <sub>50</sub>	Concentrao Inibitória Mínima
LSCB	Laboratório de Síntese de Compostos Bioativos
LPS	Lipopolissacarídeo
min	Minutos
M1	Macrófagos ativados pela via clássica
M2	Macrófagos ativados pela via alternativa
MDMO	Macrófagos Derivados de Medula ssea
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol -2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NED	Dicloridrato de N-1-naftiletlenodiamina

NPDM	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos
PBS	Tampão fosfato-salino
PE	Ficoeritrina
PI	Iodeto de propídeo
RPMI	Meio de Cultura <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SBF	Soro Bovino Fetal
SSC	<i>Side Scatter</i>
TAMs	Macrófagos Associados ao Tumor
TME	Microambiente Tumoral
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
UI	Unidades Internacionais
UV	Ultravioleta

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
$\leq$	Menor ou igual
<	Menor
>	Maior
®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
$\mu$ l	Microlitros
$\mu$ M	Micromolar
mM	Milimolar
mg	Miligrama
ng	Nanograma
pg	Picograma
ml	Mililitro
pH	Potencial Ácido
rpm	Rotações por minutos
Å	Angstrom
$\beta$	Beta
$\alpha$	Alfa
mg	Miligrama
$\Delta$	Delta
$\Psi$	Psi
$\pi$	Pi
$Mg^{2+}$	Magnésio
$Ca^{2+}$	Cálcio
$NO_2^-$	Nitrito
NO	Óxido Nítrico
nm	Nanômetros
min	Minutos

$\text{CO}_2$  Gás Carbônico

$g$  Força da Gravidade

# Sumário

1.	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....	20
2.	REFERENCIAL TEÓRICO .....	22
2.1	ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER.....	22
2.2	EPIDEMIOLOGIA .....	24
2.3	INFLAMAÇÃO E CÂNCER .....	25
2.4	TME .....	28
2.4.1	Fibroblastos.....	29
2.4.2	Estroma.....	29
2.4.3	Células endoteliais.....	29
2.4.4	Células imunológicas.....	30
2.5	MACRÓFAGOS.....	32
2.5.1	Origem e morfologia .....	32
2.5.2	Plasticidade fenotípica.....	34
2.6	TAMS E A PROGRESSÃO TUMORAL .....	36
2.6.1	Estratégias de imunoterapias direcionadas aos TAMs.....	38
2.6.1.1	Limitar o recrutamento de monócitos .....	38
2.6.1.2	Redução do número de TAMs no TME .....	38
2.6.1.3	Repolarização dos TAMs.....	39
2.7	MELANOMA.....	40
2.8	DERIVADOS 1,2,4-OXADIAZOIS.....	42
3.	OBJETIVOS .....	47
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	47
4.	MATERIAL E MÉTODOS .....	48
4.2	CÉLULAS .....	52
4.2.1	Obtenção e cultivo de células de linhagem .....	52
4.2.2	Obtenção e cultivo de MDMO .....	52
4.3	ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE DOS DERIVADOS 1,2,4-OXADIAZOL EM CÉLULAS DE LINHAGEM E MDMO .....	54
4.4	ANÁLISES POR CITOMETRIA DE FLUXO .....	56
4.4.1	Identificação de via de morte celular por apoptose/necrose em melanoma murino.....	56
4.4.2	Estratégia de seleção e identificação das populações de MDMO.....	57
4.4.2.1	Investigação de alterações fenotípicas em MDMO após exposição à molécula 2 e LPS ...	59
4.4.2.2	Investigação de alterações fenotípicas em MDMO após estimulação com sobrenadante de melanoma murino .....	60

4.4.2.3	Investigação de alterações fenotípicas em MDMO após estimulação pelo conjunto molécula 2 + sobrenadante A e molécula 2 + LPS.....	60
4.5	DOSAGEM DE NITRITO NO SOBRENADANTE CELULAR.....	62
4.6	DOSAGEM DE CITOCINAS.....	62
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	64
5.	RESULTADOS.....	65
5.1	DERIVADOS SINTÉTICOS 1,2,4-OXADIAZOL FORAM CAPAZES DE DIMINUIR A VIABILIDADE EM CÉLULAS DE LINHAGEM.....	65
5.2	A MOLÉCULA 2 FOI CAPAZ DE DIMINUIR A VIABILIDADE DA LINHAGEM CELULAR DE MELANOMA MURINO.....	68
5.3	A MOLÉCULA 2 CAUSOU MORTE POR NECROSE EM MELANOMA MURINO.....	69
5.4	MACRÓFAGOS FORAM OBTIDOS DE CÉLULAS IMATURAS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS.....	71
5.5	MDMO SÃO MENOS SENSÍVEIS QUE MELANOMA MURINO AO EFEITO CITOTÓXICO DA MOLÉCULA 2.....	72
5.6	A MOLÉCULA 2 POLARIZOU OS MDMO PARA O FENÓTIPO M1 E INDUZIU A PRODUÇÃO DE TNF-A.....	73
5.7	SOBRENADANTES ORIUNDOS DE MELANOMA MURINO POLARIZARAM MDMO PARA O FENÓTIPO M1 E INDUZIRAM PRODUÇÃO DE NO, TNF-A E IL-12.....	76
5.8	A ESTIMULAÇÃO PELOS CONJUNTOS MOLÉCULA 2 + SOBRENADANTE A E MOLÉCULA 2 + LPS POLARIZARAM MDMO PARA O FENÓTIPO M1 E INDUZIRAM PRODUÇÃO DE NO, TNF-A E IL-12.....	79
6.	DISCUSSÃO.....	84
7.	CONCLUSÃO.....	96
8.	REFERÊNCIAS.....	97
9.	ANEXO I - ARTIGO RELACIONADO À TESE PUBLICADO COMO 1º AUTOR.....	107
10.	ANEXO II - ARTIGOS RELACIONADOS À TESE PUBLICADO COMO COAUTOR.....	108

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A batalha contra o câncer continua a ser um desafio global, apesar dos notáveis avanços científicos alcançados em outras áreas da saúde, como evidenciado pelo rápido desenvolvimento de vacinas para combater a COVID-19. Enquanto enfrentamos eficazmente novas doenças, o câncer permanece uma fronteira desafiadora, principalmente devido à sua complexidade e à diversidade de formas que essa doença pode assumir.

Uma das razões pelas quais o câncer é tão desafiador é a sua natureza heterogênea. Existem muitos tipos diferentes de câncer, cada um com características únicas, o que torna difícil desenvolver uma abordagem única e universal para o tratamento. Além disso, as células cancerígenas têm a habilidade de evoluir e adaptar-se, muitas vezes desenvolvendo resistência aos tratamentos convencionais ao longo do tempo. Outro fator complicador é a detecção precoce, que é crucial para o sucesso do tratamento. Em muitos casos, o câncer só é diagnosticado quando já atingiu estágios avançados, o que torna o tratamento mais difícil e limita as opções disponíveis (WARD *et al.*, 2021).

A principal estratégia atual para o tratamento do câncer é a utilização de quimioterápicos, que visam eliminar as células malignas ao provocar danos em seus componentes vitais. No entanto, esse arsenal terapêutico, embora muitas vezes eficaz, acarreta consigo uma série de efeitos adversos graves. A ação não específica dessas substâncias não apenas atinge as células cancerígenas, mas também os tecidos saudáveis (YADAV *et al.*, 2017).

Os estudos modernos no tratamento de tumores estão impulsionando a necessidade de buscar novos compostos antitumorais. A ênfase é dada a moléculas com máximo efeito tóxico direcionado ao tumor e mínimos efeitos adversos prejudiciais. Ainda em linha com a busca por alternativas menos invasivas e mais eficientes está a estimulação do sistema imunológico para torná-lo mais competente no enfrentamento às células cancerígenas. A descoberta de moléculas capazes de modular a resposta do sistema imunológico e processos a ele relacionados abrem um leque de possibilidades seja como tratamento adjuvante ou até mesmo principal. Baseado nestes preceitos, uma molécula que combine as duas propriedades teria maior chance de se tornar um tratamento eficiente (HEGDE; CHEN, 2020).

Uma análise abrangente da literatura aponta para um notável aumento no desenvolvimento de medicamentos que têm como base estrutural os heterociclos. Pesquisadores na área da química medicinal têm obtido sucesso ao planejar moléculas para uma determinada atividade biológica através das ferramentas computacionais e técnicas de simulação. Essa abordagem tem se revelado uma estratégia promissora para a criação de novos compostos bioativos. Um grupo que vem se destacando nesse cenário é o dos oxadiazóis, conforme apontam estudos recentes conduzidos por BENASSI et al. (2020). Essa classe de compostos tem demonstrado um notável potencial para aplicações terapêuticas e, por conseguinte, tem recebido atenção especial.

A estrutura do anel 1,2,4-oxadiazol é considerada bastante versátil e tem sido amplamente estudada por suas aplicações terapêuticas. A capacidade de abrigar grupos de natureza química diversa desperta grande interesse nas pesquisas para o desenvolvimento de moléculas bioativas. A literatura é vasta no que diz respeito às múltiplas atividades biológicas que derivados sintéticos de 1,2,4-oxadiazol podem carregar com muitos resultados promissores, dentre de sua gama destaca-se o efeito anticâncer. O potencial demonstrado tanto em modelos *in vitro* e *in vivo* frente a distintas linhagens pavimentou o caminho para o desenvolvimento de nova geração de moléculas melhoradas para a mesma finalidade (BENASSI; DORIA; PIROTA, 2020).

Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa que abordaram derivados sintéticos do anel 1,2,4-oxadiazol demonstraram ação citotóxica frente a linhagens tumorais de próstata, colón, sistema nervoso central, estômago e pulmão (DE OLIVEIRA, et al., 2018; DE OLIVEIRA et al., 2021). Isto nos levou a aprofundar os estudos sobre esta ação antitumoral e envolver também o sistema imunológico, elencando os macrófagos como as principais células do sistema imunológico estudadas no atual trabalho.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Aspectos gerais do câncer

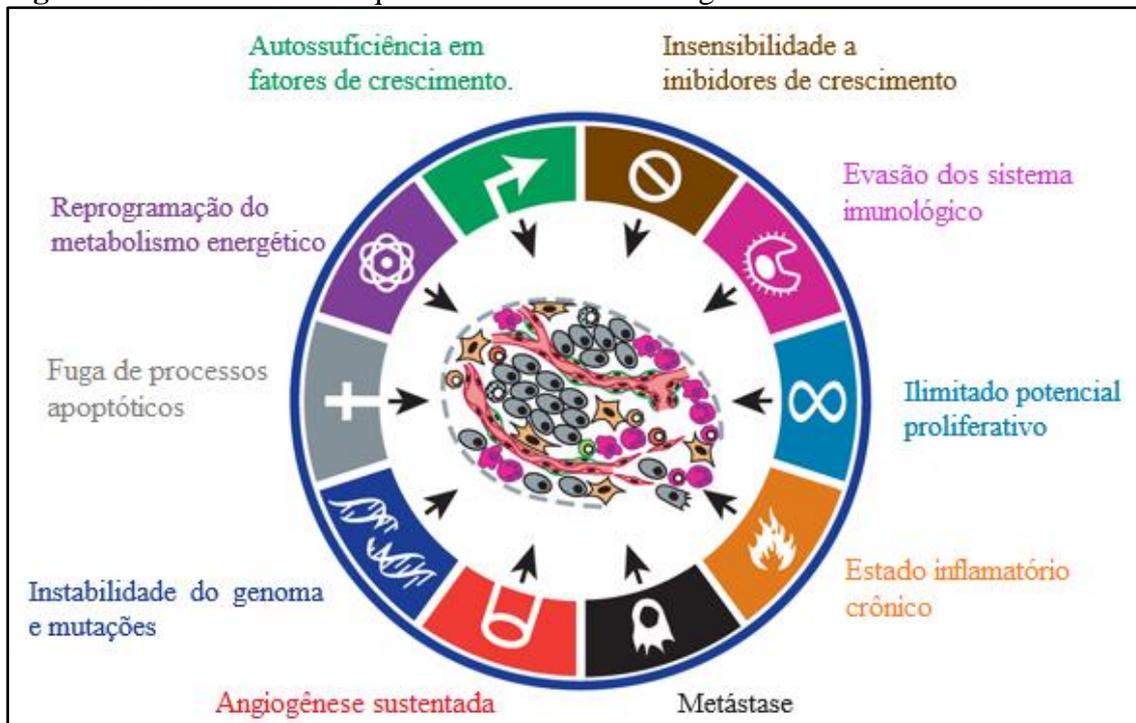
A descoberta de um osteosarcoma em osso com idade estimada em 1,7 milhão de anos oriundo de um indivíduo da família *Hominidae* sugere que o câncer é uma doença que afeta os ancestrais humanos a milhares de gerações. Em estudos realizados em restos mortais datados de 230 a 3.000 anos antes de Cristo, achados de câncer dos tipos melanoma múltiplo, próstata e mama foram importantes elementos para se chegar ao entendimento da carcinogênese, uma vez que os fatores de predisposição ambientais e comportamentais eram diferentes dos tempos atuais (PETERS; GONZALEZ, 2018).

Câncer é um termo genericamente utilizado para se referir a um conjunto de doenças que podem acometer qualquer tecido do corpo humano e apresentam como características primordiais a multiplicação desordenada de células malignas e capacidade invasiva a outros órgãos. De acordo com o modelo prevalente para a carcinogênese referido como teoria da mutação somática, o câncer é resultado de alterações sucessivas sofridas pelo DNA, o único componente celular capaz de acumulá-las e transmiti-las adiante. Quando estas alterações, denominadas mutações, ocorrem em oncogenes ou em genes supressores de tumor, como por exemplo as que afetam os genes *APC*, *TP53*, *KRAS*, *NRAS*, *HRAS*, *EGFR* e *BRAF*, as células em questão adquirem vantagens proliferativas e maior sobrevivência em relação as outras células normais (LUZZATTO; PANDOLFI, 2015; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2022; PORTA-PARDO; VALENCIA; GODZIK, 2020).

No ano 2000, no estudo intitulado *The hallmarks of Cancer*, Hanahan e Weinberg propuseram que as células malignas adquiriam 6 capacidades durante o processo de carcinogênese em consequência das mutações e que a maioria dos tipos de câncer as compartilhavam, são elas: autossuficiência em fatores de crescimento, insensibilidade a sinais inibidores de crescimento, evasão de processos apoptóticos, angiogênese sustentada, ilimitado potencial proliferativo, invasão tecidual e metástase. Na atualização do estudo publicada em 2011, os autores abordaram os tumores como sendo um tecido complexo composto não só por células malignas, mas também por diferentes tipos celulares do estroma, parênquima e sistema imunológico que interagem entre si, formando um microambiente tumoral. Junto a isto, acrescentaram a evasão do sistema imune e reprogramação do metabolismo celular como novas capacidades, além de promoção de um estado inflamatório crônico e instabilidade genômica acompanhada de

mutações como estados presentes indispensáveis a formação dos tumores. As características estão apresentadas na Figura 1 (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011).

**Figura 1:** Características adquiridas durante a carcinogênese



**Legenda:** Adaptado de Hanahan e Weinberg (2011).

O número de mutações encontradas em células malignas varia de tecido para tecido. Os cânceres colorretal, de pulmão e melanoma se apresentam, em média, com mais de 100 mutações enquanto os cânceres de endométrio, mama e o glioblastoma possuem, em média de 20 a 50 mutações. Para explicar estes diferentes comportamentos observados, Volgestein et al. (2013) dividiram as mutações em dois tipos, *driver* e passageiras. Mutações *driver* são definidas como as que diretamente ou indiretamente conferem vantagens de crescimento para as células que as carregam, já as mutações passageiras não possuem qualquer relação com vantagens de crescimento. Então, células com maior número de mutações acumuladas provavelmente as carregam desde estágios pré-neoplásicos e são em sua maioria mutações do tipo passageira.

São fatores conhecidamente associados ao desenvolvimento de cânceres as predisposições genéticas passadas entres gerações familiares tais como mutações que acarretam alterações em processos endógenos ou exógenos de sinalização celular, de metabolismo e de renovação tecidual. Infecções por Papilomavírus Humano (HPV) e *Helicobacter pylori*, exposição ao benzeno e arsênico, radiação X e gama são exemplos

de agentes biológicos, químicos e físicos carcinogênicos (RYAN; FAUPEL-BADGER, 2016).

O entendimento dos mecanismos moleculares pelos quais estes fatores de risco originam tumores nos possibilitam formular estratégias de prevenção mais eficazes. O desenvolvimento de vacinas contra o HPV como medida preventiva para os cânceres uterinos partiu da descoberta de que algumas proteínas transcritas do material genético viral são capazes de inibir a função dos genes supressores de tumores que codificam as proteínas p53 e proteína do retinoblastoma (pRb). Outro exemplo de como entender a etiologia da doença levou a uma estratégia de prevenção de sucesso é vista no tratamento do câncer de mama após descoberta do papel do estrógeno no processo. O tamoxifeno é um bloqueador seletivo dos receptores moduladores de estrógeno (SERMs) e foi desenvolvido tanto para o tratamento como prevenção do câncer de mama após a descoberta de que o estrógeno liga-se ao seu receptor e induz a expressão de genes envolvidos na proliferação celular (RYAN; FAUPEL-BADGER, 2016).

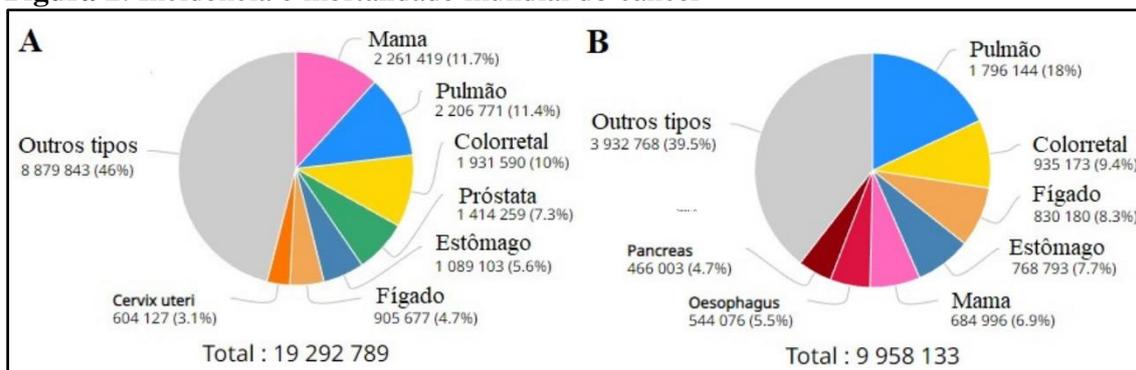
## **2.2 Epidemiologia**

Estudos periódicos realizados por organizações nacionais e internacionais de monitoramento nos mostram uma crescente incidência e mortalidade por câncer em todo o mundo, o que o torna o mais importante problema de saúde pública. O aumento da população global, o envelhecimento e a mudança na prevalência dos fatores de risco contribuem para o agravamento do quadro. Vale destacar também a transição observada em países em desenvolvimento entre os tipos de câncer, com menor incidência de câncer associados a infecção e aumento dos associados a melhores condições socioeconômicas como alimentação inadequada e sedentarismo, semelhante ao que ocorrem em países desenvolvidos (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2020).

Dados do ano de 2020 apontam mais de 19 milhões e 200 mil novos casos de câncer em todo o mundo com aproximadamente 9 milhões e 900 mil mortes. O câncer de mama foi o de maior incidência, seguido por pulmão, colorretal, próstata, estômago e fígado. Em relação a mortalidade, o câncer de pulmão apresentou maior letalidade, seguido por colorretal, fígado, estômago e mama (Figura 2). Considerando apenas o Brasil, a estimativa para cada ano do triênio 2023, 2024 e 2025, indica que ocorrerão 704 mil novos casos de câncer. O mais incidente será o câncer de pele não melanoma com 221 mil casos, seguido por mama, próstata, cólon e reto, pulmão, estômago.

Desconsiderando o câncer de pele não melanoma que representa entre 25 e 30 % de todos os casos em homens e mulheres, os mais incidentes em homens são próstata, cólon e reto, pulmão, estômago e cavidade oral. Nas mulheres são mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e tireoide (Figura 3). Para todo o estado do Ceará no ano de 2023, a estimativa é de que ocorrerão mais de 31 mil novos casos de câncer. (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2023; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2020).

**Figura 2:** Incidência e mortalidade mundial do câncer



**Legenda:** Adaptado de International Agency for Research on Cancer (2020).

**Figura 3:** Incidência e mortalidade do câncer no Brasil

Localização Primária	Casos	%		Localização Primária	Casos	%
Próstata	71.730	30,0%	Homens	Mama feminina	73.610	30,1%
Cólon e reto	21.970	9,2%		Cólon e reto	23.660	9,7%
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	7,5%		Color do útero	17.010	7,0%
Estômago	13.340	5,6%		Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%
Cavidade oral	10.900	4,6%		Glândula tireoide	14.160	5,8%
Esôfago	8.200	3,4%		Estômago	8.140	3,3%
Bexiga	7.870	3,3%		Corpo do útero	7.840	3,2%
Laringe	6.570	2,7%		Ovário	7.310	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7%		Pâncreas	5.690	2,3%
Fígado	6.390	2,7%		Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

**Legenda:** Adaptado de Instituto Nacional do Câncer (2023).

### 2.3 Inflamação e câncer

Os sistemas biológicos buscam sempre manterem-se em homeostase para que suas funções sejam desempenhadas adequadamente, a perturbação desta implica em processos biológicos em busca da volta ao estado inicial, dentre eles a inflamação. A inflamação é uma resposta protetora que entra em cena para defender e restabelecer a homeostase quando ela por si só não é capaz. Trata-se de um processo vital, que engloba a ativação,

recrutamento e ação de células do sistema imunológico direcionados a execução de funções para defesa do organismo contra agentes patogênicos e reparação, regeneração e remodelação, necessárias após episódios de injúrias e perturbações teciduais (MEDZHITOV, 2008).

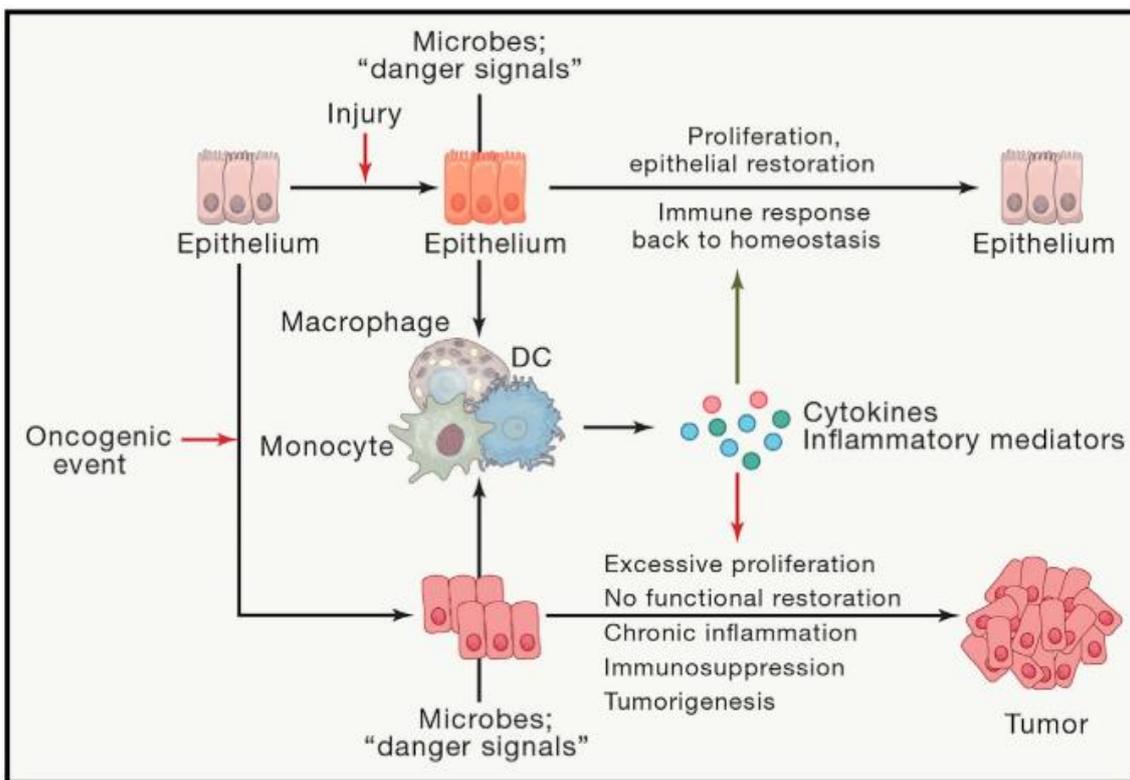
No contexto da biologia do câncer, a importância dos processos inflamatórios se revelou à medida que as pesquisas mudaram sua visão centrada nas células tumorais para uma mais inclusiva, considerando o tumor como um microambiente formado por uma rede interligada também por células do estroma, fibroblastos, células vasculares e células inflamatórias. Sabe-se hoje que a inflamação tem grande influência na composição do microambiente tumoral (TME) e sua presença é determinante para a concepção de um com imunovigilância ativa e sinais inibitórios desfavoráveis ao tumor, ou de um em que há favorecimento a evasão do sistema imunológico e aumento dos sinais estimulatórios para o desenvolvimento do tumor (GRETEN; GRIVENNIKOV, 2019).

A Figura 4 traça um paralelo entre a inflamação relacionada a perda da homeostasia decorrente de uma infecção e a relacionada ao câncer, ambos têm a instalação comum porém desfechos diferentes. A inflamação relacionada a perda da homeostasia funciona como um sensor a danos teciduais causados por agentes infecciosos e entra em cena para prevenir a perda da função tecidual. O epitélio agredido induz o recrutamento e ativação de células imunológicas, destacadamente o macrófago, que por sua vez passa a produzir no local alvo citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) e outros mediadores bioativos como a histamina importantes a continuidade do processo. Ocorre então aumento do fluxo sanguíneo, da permeabilidade vascular, exsudação e infiltração de leucócitos, tudo coordenado para que o resultado seja eliminação da injúria e também e o estímulo a proliferação das células epiteliais para recomposição da barreira física anteriormente perdida (ABDULKHALEQ *et al.*, 2018; GRETEN; GRIVENNIKOV, 2019).

No caso dos tecidos tumorais, fatores como a hipóxia, restos celulares, o fator estimulante de colônia de macrófagos (CSF-1 ou CSF-M), além de citocinas e quimiocinas produzidas pelas células tumorais e demais integrantes do TME, também são capazes de recrutar e ativar macrófagos que por sua vez seguirão com as resposta imunológica. No entanto, uma vez não existindo infecção a ser combatida a resposta mediada pelos macrófagos muitas vezes não é finalizada, novos leucócitos são recrutados para o local e o processo inflamatório tende a se tornar crônico (GRETEN; GRIVENNIKOV, 2019).

Em condições fisiológicas normais, a resolução do dano causador da perda da homeostase e o processo inflamatório todo são encerrados em um curto espaço de tempo. Entretanto respostas inflamatórias prolongadas e exarcebadas podem levar a perda permanente da homeostase e surgimento de um estado inflamatório crônico. Neste caso, o processo inflamatório perde seu propósito e passam a contribuir para surgimento de uma série de doenças como as cardiovasculares, diabetes, artrite reumatoide, Alzheimer, doenças pulmonares, transtornos autoimunes e câncer (KOTAS; MEDZHITOV, 2015).

**Figura 4:** Semelhanças e diferenças entre processo inflamatório infeccioso e processo inflamatório relacionado ao câncer



\Fonte: Greten (2019)

A ligação entre inflamação crônica e câncer é conhecida há muito tempo. Ainda no século XIX, o médico alemão Virchow foi o primeiro a descobrir a presença de células inflamatórias junto de tecidos retirados de tumores malignos. O avanço das pesquisas sobre este tema possibilitou identificar que de fato há uma conexão e ela é coordenada, ao passo que os processos inflamatórios contribuem para carcinogênese, mutações genéticas intrínsecas ao câncer também induzem processos inflamatórios crônicos no TME (CARVALHO, 2012; QU; TANG; HUA, 2018)

Tecidos sádios não contam com espaços sobressalentes capazes de abrigar uma grande quantidade de células malignas. A consequência destes eventos é um aumento dos danos físicos aos tecidos circundantes e lise celular. Substâncias como fibrinogênio, ATP, DNA e RNA, restritas ao interior celular, são despejadas no meio extracelular. Neste contexto são denominadas como padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs). Uma vez fora das células, DAMPs são reconhecidos por receptores distribuídos na superfície e interior dos macrófagos como os *toll-like* e *NOD-like* e desencadeiam resposta inflamatória contribuindo para a cronicidade de uma já instalada (GALDIERO; MARONE; MANTOVANI, 2018).

O crescimento desordenado das células malignas implica também em adaptações no metabolismo energético. O baixo suprimento de oxigênio nas regiões mais internas da massa tumoral leva a troca da glicólise aeróbia pela glicólise anaeróbia como a principal forma de obtenção energética destas células. Como consequência são produzidas grandes quantidades de ácido lático tornando o TME mais ácido. A acidificação do TME esta associada ao favorecimento do crescimento tumoral, a agressividade, a metástase e a evasão do sistema imunológico. A hipóxia nestas regiões ainda leva à produção do fator induzível por hipóxia 1 alfa (HIF-1 $\alpha$ ) e do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fatores que estimulam o crescimento dos vasos sanguíneos permitindo a chegada de nutrientes. Toda esta cadeia de eventos favorece o crescimento tumoral e tornam a sua destruição cada vez mais difícil (GALDIERO; MARONE; MANTOVANI, 2018; JUN *et al.*, 2017).

## **2.4 TME**

O TME refere-se ao ambiente formado em decorrência da presença do tecido maligno e é composto por células do sistema imunológico, fibroblastos, células endoteliais, matriz extracelular (ECM), vasos sanguíneos e moléculas de sinalização. Trata-se de uma zona arquitetada para que ocorram frequentes interações entre todos os seus elementos acarretando em constantes alterações fenotípicas. Como visto anteriormente, os estágios iniciais de instalação da doença invariavelmente desencadeiam processos inflamatórios. Macrófagos e leucócitos recrutados passam a desempenhar funções antitumorais na tentativa de eliminar o agente causador da perda da hemostasia. A progressão tumoral significa não só a sobrevivência das células malignas, mas também sua capacidade de manipular todo o TME em seu favor. A compreensão do papel de cada

componente vai além do surgimento, desenvolvimento e disseminação do tumor e passa a ser determinante para o sucesso das terapias contra o câncer (WU; DAI, 2017).

#### *2.4.1. Fibroblastos*

Os fibroblastos são as células mais comuns no tecido conjuntivo e desempenham um papel fundamental na produção de fibras e proteínas que compõem a ECM. Os presentes no TME e que prestam suporte ao desenvolvimento dos tumores são conhecidos como fibroblastos associados ao tumor (CAFs). São ativados em resposta a fatores de crescimento e citocinas, como TGF $\beta$ , FGF2 e PDGF. Uma vez ativados, sintetizam e secretam componentes da ECM, promovem a liberação de enzimas proteolíticas, como as metaloproteinases (MMPs) e a heparanase, do fator derivado de célula estromal 1 (SDF1), do fator de crescimento hepático (HGF), do VEGF, do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) dentre outros. Em conjunto, estes fatores favorecem o crescimento do tumor, a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) e contribuem para a resistência aos tratamentos (ARNETH, 2019; MAMAN; WITZ, 2018; WU; DAI, 2017).

#### *2.4.2 Estroma*

O estroma presente nos tumores apresenta características distintas em comparação ao tecido normal, principalmente devido à ECM que é produzida e remodelada de maneira alterada sob a influência de todas as células que compõem o TME. Esse processo resulta em um emaranhado complexo de diferentes fibras de colágeno, fibronectina, laminina, vitronectina, tenascina-C e SPARC, que desempenham um papel crucial no crescimento, disseminação do tumor e resistência aos tratamentos. A composição e organização da ECM, juntamente com a arquitetura densa do tecido tumoral, formam uma barreira física que dificulta a penetração de medicamentos. Além disso, as proteínas presentes na ECM têm a capacidade de ligar-se a moléculas de medicamentos quimioterápicos e prejudicar sua distribuição (ARNETH, 2019; MAMAN; WITZ, 2018; WU; DAI, 2017).

#### *2.4.3 Células endoteliais*

As células endoteliais formam a camada mais interna dos vasos sanguíneos. São essenciais para regulação da permeabilidade vascular, angiogênese e coagulação. Outra importante função é a produção de citocinas. Assim como os CAFs, existem células endoteliais que dão suporte ao desenvolvimento dos tumores, as TECs. Estas apresentam

maior capacidade de proliferação e resposta mais intensa aos fatores de crescimento epidérmico (EGF) ao VEGF em relação às células endoteliais normais como. Os vasos sanguíneos formados por esse tipo de endotélio tendem a ter um fluxo sanguíneo caótico e diapedese de leucócitos alterada devido a anomalias estruturais e expressão deficiente de moléculas de adesão. A redução da expressão de E-selecina, ICAM1, ICAM2 e VCAM1 pelas TECs dificulta o recrutamento de linfócitos T CD8+ citotóxicos (CTLs) para o TME. Também foi observado que as TECs podem suprimir a função destes mesmos linfócitos ao expressarem moléculas inibidoras, como o ligante 1 da morte celular programada (PD-L1) (ARNETH, 2019; MAMAN; WITZ, 2018; WU; DAI, 2017).

#### 2.4.4 Células imunológicas

As células do sistema imunológico inato (macrófagos, mastócitos, neutrófilos, células dendríticas, células supressoras derivadas de mielóides (MDSCs) e células *Natural Killer* (NK) e adaptativo (linfócitos T e B) têm presença marcante no TME. As interações entre elas por contato direto ou via mediadores solúveis, o estado ativado ou inibido, a quantidade e a localização são fatores cruciais para progressão tumoral, bem como para resposta ao tratamento.

As células dendríticas (DCs) atuam como apresentadoras de antígenos tumorais e são centrais na imunovigilância. São capazes de identificar e capturar antígenos derivados dos tumores e apresentá-los aos linfócitos T. No entanto, o TME pode exercer influências negativas sobre as DCs inibindo-as. Estudos *in vitro* têm demonstrado que a presença de certas substâncias, como CCL2, CXCL1, CXCL5 e VEGF, inibem a maturação das DCs. Esse mecanismo compromete a capacidade das DCs em apresentar eficientemente os antígenos tumorais. As células malignas também exploram os *checkpoints* imunológicos ao expressarem PD-L1 e inativarem as DCs impedindo-as de estimular a resposta antitumoral (LEI *et al.*, 2020).

Os CTLs têm a função primordial de eliminar células tumorais. Sua ativação é mediada por DCs e macrófagos que apresentam antígenos tumorais e estabelecem ligações entre os ligantes de superfície CD80-CD86 e os receptores CD27 e CD28 presentes no linfócito T CD8+. Os CTLs exercem citotoxicidade por meio da exocitose granulométrica, granzimas e perforinas são liberadas e induzem apoptose nas células tumorais, além da morte mediada por FAS-FASL. Também secretam interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).

Estas células também estão sujeitas a exploração dos *checkpoints* imunológicos por parte dos tumores. Proteínas de morte celular programada 1 (PD-1) estão presentes na superfície e quando acionadas por PD-L1 expressos nas células tumorais, resultam na inativação das CTLs (LEI *et al.*, 2020).

As células NK desempenham um papel semelhante as CTLs. Quando presentes TME induzem a morte das células tumorais principalmente por meio de perforinas e granzimas. Secretam IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , interleucina-6 (IL-6) e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (CSF-GM) todos atuam contrariamente a progressão tumoral. O acionamento de *checkpoints* imunológicos favorecem a evasão tumoral (LEI *et al.*, 2020).

Para que um câncer se desenvolva é necessário que ele frequentemente consiga escapar da vigilância do sistema imunológico. Por essa razão, entre as células recrutadas estão as chamadas células supressoras imunológicas, responsáveis por promoverem um TME com características imunossupressoras. Dentro deste grupo as principais são as células mielóide supressoras (MDSCs) e os linfócitos T regulatórios (Treg) (KUMAR *et al.*, 2016; WANG; FRANCO; HO, 2017).

MDSCs são produzidas na medula óssea e encontradas tanto em órgãos linfoides periféricos próximos quanto na própria massa tumoral. Dentre as suas atividades favoráveis ao crescimento do tumor estão a inibição das células NK e CTLs, recrutamento de linfócitos Treg e favorecimento da polarização dos macrófagos para o fenótipo M2 (KUMAR *et al.*, 2016; WANG; FRANCO; HO, 2017)

Os linfócitos Treg são uma subpopulação de linfócitos CD4<sup>+</sup> que se caracterizam pela alta expressão de CD25<sup>+</sup> e do fator de transcrição supressor FoxP3. Esses linfócitos têm a capacidade de controlar e desativar as respostas celulares em andamento por meio de diversos mecanismos. Assim como MDSCs podem inibir a atividade dos linfócitos CTLs e NK, favorecer a polarização dos macrófagos para o fenótipo M2, além de converter linfócitos CD4<sup>+</sup> em linfócitos Treg, promover a angiogênese por meio da produção VEGF e produzir citocinas imunossupressoras, como o TGF $\beta$ , IL-10 e IL-35 (KUMAR *et al.*, 2016; WANG; FRANCO; HO, 2017).

Os neutrófilos correspondem a mais de 60% dos leucócitos circulantes e fazem parte da primeira linha de defesa nos sítios infecciosos e inflamatórios. Quando inseridos no TME são denominados de neutrófilos associados ao tumor (TANs) e assim como os macrófagos, possuem dois fenótipos diferentes, N1 e N2, com atividades antitumoral e pró-tumoral respectivamente (COSTA *et al.*, 2021; KIM; BAE, 2016).

Os neutrófilos migram até o microambiente tumoral atraídos por CXCL8. Em estágios iniciais do desenvolvimento tumoral estes TANs assumem o fenótipo N1 e produzem altos níveis de TNF- $\alpha$ , NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nocivos as células malignas. A medida que o tumor avança, o TGF- $\beta$  estimula os TANs e os direcionam para o fenótipo N2. Estas células passam então a desempenhar funções pró-tumorais (COSTA *et al.*, 2021; KIM; BAE, 2016).

## **2.5 Macrófagos**

### *2.5.1 Origem e morfologia*

Élie Metchnikoff, em 1884, foi o descobridor e o primeiro a estudar os macrófagos. Nomeou-os desta forma devido à capacidade destas células de “engolir” e “digerir” resíduos celulares e substâncias estranhas, o termo em grego significa grande comedor. Os macrófagos são importantes células efetoras do sistema imune inato e reguladoras do sistema imune adaptativo, participando de tarefas tais como reconhecimento e destruição de patógenos, apresentação de antígenos, reparo de dano tecidual, sinalização celular e processos inflamatórios. Com o passar do tempo, novos estudos foram identificando macrófagos com diferentes origens e funções. O termo empregado pela primeira vez em 1884 restrito àquelas células, atualmente faz referência a um grupo bastante dinâmico e heterogêneo (FRANKEN; SCHIWON; KURTS, 2016; GENTEK; MOLAWI; SIEWEKE, 2014; VAROL; MILDNER; JUNG, 2015).

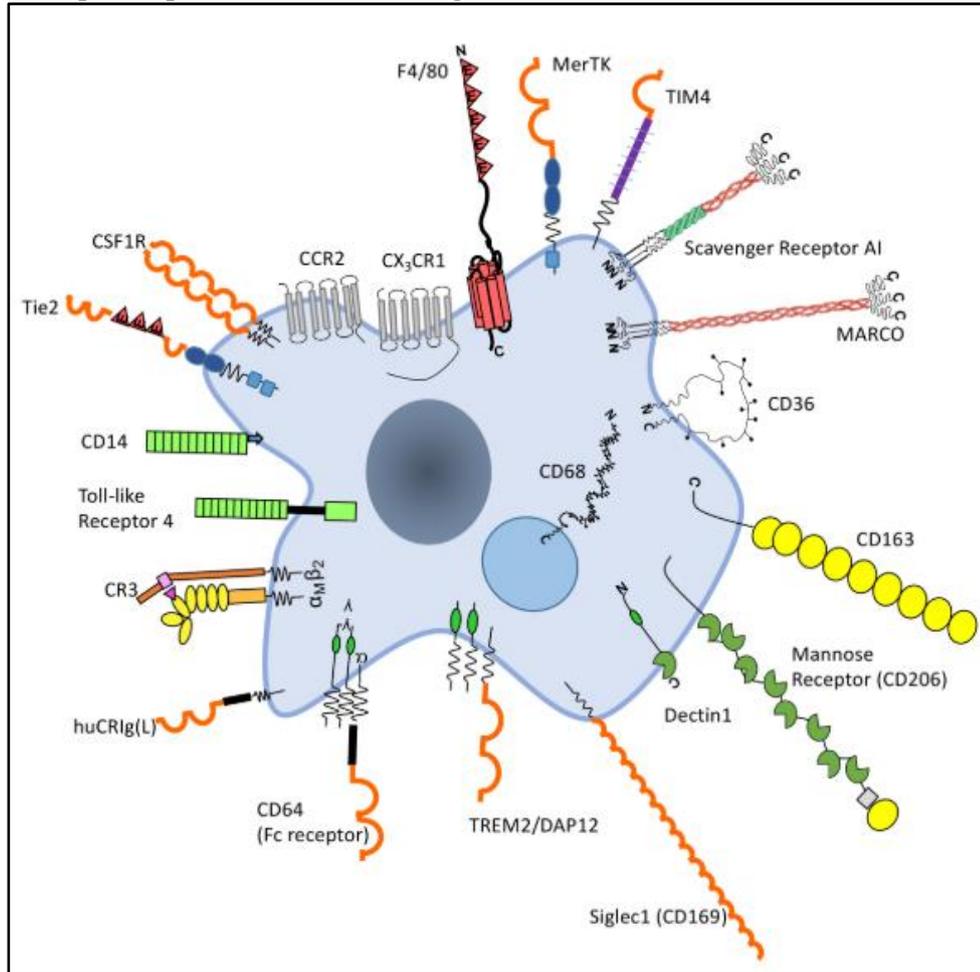
Praticamente todos os tecidos humanos são povoados por algum tipo de macrófago, e eles tem duas origens diferentes. O tipo dos macrófagos residentes teciduais foi formado antes do nascimento, no saco vitelino. Uma vez alojados, mantêm-se de forma autônoma e autorrenovável dentro do tecido, sem necessariamente precisar de células hematopoiéticas. Já em relação à segunda origem, os macrófagos podem se desenvolver a partir de monócitos circulantes originários da medula óssea. Este processo de saída do sangue para os tecidos está ligado a reações inflamatórias, patológicas e homeostáticas. A micróglia no cérebro e as células de Kupffer no fígado são exemplos de macrófagos de origem exclusivamente embrionária, em contrapartida a lâmina própria no intestino e os macrófagos da derme são frequentemente repostos por monócitos infiltrantes (FRANKEN; SCHIWON; KURTS, 2016; GENTEK; MOLAWI; SIEWEKE, 2014; VAROL; MILDNER; JUNG, 2015).

São células com morfologia irregular, núcleo e citoplasma volumosos, capazes de emitir pseudópodes, de formar vacúolos digestivos e possuem grânulos repletos de enzimas capazes de degradar proteínas, membranas de fosfolipídios e ácidos nucléicos. São ricos em receptores presentes tanto na superfície quanto no citoplasma, o que lhes confere uma grande capacidade de reconhecer diversos ligantes endógenos e exógenos, como microrganismos, citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, hormônios, fatores de coagulação e componentes da matriz extracelular, entre outros. Possuem como característica marcante a alta plasticidade que os permite alterar seu fenótipo e função de acordo com as condições ambientais ao qual estão submetidos. Desempenham um papel importante na diferenciação, crescimento, sobrevivência e modelagem de tecidos. Ainda são responsáveis por eliminar e remover células danificadas e patógenos do sistema circulatório (GORDON; PLÜDDEMANN; MUKHOPADHYAY, 2020; ROSTAM *et al.*, 2017; TAYLOR *et al.*, 2005).

A Figura 5 traz uma representação esquemática dos diferentes tipos de receptores encontrados nos macrófagos segundo Gordon et al. 2020. Esses receptores desempenham papéis específicos nas atividades dos macrófagos. Os receptores FcR e CR3 estão envolvidos na fagocitose de partículas opsonizadas por anticorpos ou fragmentos C3b do sistema complemento. Os receptores Dectina-1 estão envolvidos na fagocitose de fungos através do reconhecimento padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Os receptores do tipo *scavenger* estão envolvidos na fagocitose de células apoptóticas. Os receptores CCR2 reconhecem CCL2 um quimiotraente para monócitos. Os receptores CXCR1 reconhecem a interleucina 8 (IL-8). Os receptores CSF1R reconhecem CSF-1 que tem atividade na proliferação de monócitos e macrófagos. Os receptores de Manose MR206/CD206 estão envolvidos no reconhecimento de glicoproteínas com resíduos de manose terminal e têm a função na remoção de fragmentos da circulação.

Os receptores *Toll-like* (TLRs) pertencem a uma família de receptores que desencadeiam a expressão de genes e a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12. Na superfície celular, encontramos os TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6, enquanto os TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 e TLR10 estão localizados dentro das células, nos endossomos. Esses receptores têm um papel fundamental no reconhecimento de DAMPs e PAMPs derivados de bactérias, vírus, protozoários e fungos. São exemplos de PAMPs os lipopolissacarídeos (LPS), flagelina, peptidoglicano, lipoproteínas, DNA e RNA. A ativação dos TLRs induzem resposta inflamatória indispensável para combater as infecções e os tumores (GORDON; PLÜDDEMANN; MUKHOPADHYAY, 2020).

**Figura 5:** Receptores presentes nos macrófagos



Fonte: Gordon et al. (2020).

### 2.5.2 Plasticidade fenotípica

A plasticidade fenotípica dos macrófagos é a habilidade notável destas células em modificar tanto sua forma quanto suas funções em resposta aos estímulos ambientais recebidos, seja em condições fisiológicas ou patológicas. É observado que quando o tipo de patógeno ou as condições do microambiente se modificam, os macrófagos conseguem ajustar rapidamente seu fenótipo. A eficácia da defesa imunológica está intrinsecamente ligada à prontidão e à capacidade dos macrófagos em responder de maneira rápida e adequada aos estímulos recebidos garantindo que as demais células do sistema imunológico estejam sintonizadas com as demandas específicas do momento.

A relevância na resposta imunológica é evidente. Na resposta inata, fagocitam células e partículas, reconhecem sinais de perigo e liberam citocinas pró-inflamatórias. Na resposta adaptativa, participam juntamente com DCs e linfócitos B da apresentação

de antígenos e secretam citocinas importantes para maturação de linfócitos T. Em conjunto com células NK, neutrófilos e CTLs participam ativamente na eliminação de patógenos e células tumorais (MALYSHEV; MALYSHEV, 2015). O conceito atual de plasticidade dos macrófagos postula que fatores pró-inflamatórios, como LPS e IFN- $\gamma$ , programam o fenótipo M1 e intensificam a produção de citocinas pró-inflamatórias. Essas citocinas direcionam ainda mais o fenótipo dos macrófagos em direção ao M1. Como resultado, é formado um mecanismo de retroalimentação positiva pró-inflamatória, permitindo a rápida programação do fenótipo M1 possuidor de propriedades antimicrobianas e antitumorais. Da mesma forma, citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, IL-13 ou TGF- $\beta$ , programam o fenótipo M2, intensificando a produção de citocinas anti-inflamatórias. Essas citocinas direcionam ainda mais o fenótipo dos macrófagos em direção ao tipo M2, formando novamente um mecanismo de retroalimentação positiva anti-inflamatória e pró-tumoral (MALYSHEV; MALYSHEV, 2015; YAO; XU; JIN, 2019).

A ativação dos macrófagos ocorre por meio de duas vias distintas: a via clássica e a via alternativa. Essas vias resultam na formação de macrófagos com diferentes características e funções. Os macrófagos M1 são conhecidos por desempenhar um papel na proteção contra patógenos e células cancerosas devido à sua alta atividade citotóxica e aumento da imunovigilância que promovem. A ativação pela via clássica leva ao fenótipo M1 e é mediada por estímulos como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TLRs e LPS, resultando na produção de IL-1, IL-12, IL-23, TNF- $\alpha$  e CXCL10, bem como na geração EROs, ERNs e óxido nítrico (NO). Além disso, os macrófagos M1 expressam altos níveis de moléculas MHC elevando a apresentação de antígenos. A ativação pela via alternativa leva ao fenótipo M2 e ocorre em resposta a IL-4, IL-10, IL-13, IL-33 e TGF- $\beta$ . Os M2 apresentam alterações em vias metabólicas, como no metabolismo de arginina, que resultam na produção de ornitina e poliamina em vez de citrulina e NO. Possuem influência negativa na apresentação antigênica (MALYSHEV; MALYSHEV, 2015; YAO; XU; JIN, 2019).

Sendo o fenótipo atuante na cicatrização e remodelagem tecidual, os macrófagos M2 são divididos em quatro subtipos: M2a, M2b, M2c e M2d. Os macrófagos M2a, ativados por IL-4 ou IL-13, aumentam a expressão de IL-10, TGF $\beta$ , CCL17, CCL18 e CCL22, indispensáveis a atividade endocítica, crescimento celular e reparação de tecidos. Já os macrófagos M2b, ativados por complexos imunes e IL-1 $\beta$ , liberam citocinas pró e anti-inflamatórias e regulam a amplitude das respostas imunológicas. Os macrófagos M2c, induzidos por glicocorticoides, IL-10 e TGF- $\beta$ , desempenham um papel importante

na fagocitose de células apoptóticas. Por fim, os macrófagos M2d, induzidos por antagonistas dos receptores TLR, liberam IL-10 e o VEGF e promovem a angiogênese. (YAO; XU; JIN, 2019).

A polarização dos macrófagos é caracterizada por quatro fenômenos. 1) Amplificação de resposta por fator igual ou diferente do que o ativou. Por exemplo, a ativação devido ao IFN- $\gamma$  aprimora a resposta dos macrófagos ativados tanto pelo IFN- $\gamma$  (amplificação direta) quanto pelo LPS (amplificação cruzada). 2) Supressão recíproca do fenótipo oposto. A ativação do fenótipo M1 aprimora a produção de citocinas pró-inflamatórias, ao mesmo tempo em que suprime a produção de citocinas anti-inflamatórias e a polarização do fenótipo M2, e vice-versa. 3) Ativação em cascata dos mecanismos de polarização. Esse fenômeno proporciona a formação rápida do fenótipo. 4) Feedback. O feedback positivo proporciona a formação rápida do fenótipo desejado do macrófago. Por exemplo, o fenótipo M1 é produzido quando há necessidade de combater um vírus, bactéria ou célula tumoral. O feedback negativo impede a formação excessiva do fenótipo M1, o que poderia resultar em inflamação excessiva seguida do desenvolvimento de doenças inflamatórias. (MALYSHEV; MALYSHEV, 2015).

A ocorrência desses fenômenos é desencadeada por várias vias de sinalização. O equilíbrio entre os dois fenótipos é dependente do tempo de exposição, momento da ativação, fosforilação específica de serina/tirosina, tipo de ligante, multivalência e/ou intensidade dos estímulos no TME. Os estímulos provenientes do TME podem, ao mesmo tempo, ativar uma ou mais vias reprogramando os TAMs. O fenótipo M2 está associado a ativação de PI3K/AKT, JAK/STAT6 ou STAT3 e as vias dependentes de TGF- $\beta$ /SMAD. As vias JNK, P38, NF- $\kappa$ B p65, JAK/STAT1 e NOTCH estão associadas ao fenótipo M1 (KERNEUR; CANO; OLIVE, 2022).

## **2.6 TAMs e a progressão tumoral**

A formação e evolução dos tumores são influenciadas de maneira mais significativa pelo estágio de inflamação presente do que simplesmente pela sua presença. A fase inicial de muitos tumores está associada a uma inflamação aguda citotóxica mediada por macrófagos M1 responsáveis pela produção de citocinas do padrão Th1. Por outro lado, a progressão dos tumores é dependente dos macrófagos M2 produtores de citocinas do padrão Th2 mediadores de ambiente inflamatório crônico em constante remodelação. A população de macrófagos presente no TME que presta suporte a massa

tumoral é denominada de macrófagos associados ao tumor (TAMs). A presença elevada de TAMs está frequentemente associada a prognósticos desfavoráveis na maioria dos tipos de câncer (PAN *et al.*, 2020; ZHANG; LU; PIENTA, 2010).

Grande parte dos TAMs são originários de monócitos circulantes, pequena parte se origina da migração das populações residentes teciduais. Fatores derivados dos tumores (FDTs) desempenham papel de recrutar esses monócitos circulantes para o TME. CCL2 foi identificado como o principal responsável pelo recrutamento, também participam CCL3, CCL4, CCL5, CXCL12 e CSF-M. Os monócitos então passam por um processo de transformação para macrófagos, e tendem a polarizar-se em direção ao fenótipo M2 em pouco tempo. Isso acontece devido baixa quantidade de fatores polarizantes para M1, em contraste com a presença significativa de citocinas polarizantes para M2 como IL-4 e IL-13 secretadas por TAMs preexistentes juntamente com a ação de TGF- $\beta$  e IL-10 produzidos por linfócitos Treg (CANÈ *et al.*, 2019).

Os primeiros macrófagos infiltrantes que chegam ao TME com a missão de eliminar as células transformadas estão polarizados para M1. A resposta antitumoral destas células é mediada pela produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12, produção de EROS e ERNS, aumenta da apresentação antigênica e maior atividade fagocítica. Uma vez que novos macrófagos infiltrantes sejam estimulados por estas citocinas, são polarizados também para o fenótipo M1. Se as respostas celulares e inflamatórias não conseguirem erradicar as células malignas, abra-se brecha para um processo inflamatório crônico e patológico, favorável ao desenvolvimento do tumor. Mediadores solúveis presentes no TME como HIF-1 $\alpha$ , VEGF, TGF $\beta$  e citocinas IL-4, IL-10, IL-13 reprograma os M1 para o fenótipo M2 (CHATTERJEE *et al.*, 2020; MUNIR *et al.*, 2021; SICA *et al.*, 2015).

TAMs M2 possuem funções indispensáveis para sustentar o crescimento do câncer. A produção de VEGF e MMP9 induzem a angiogênese e linfangiogênese. IL-1 $\beta$ , IL-8, e TGF- $\beta$  contribuem para transição epitelial-mesenquimal. Catepsinas, MMP2, MMP7 e MMP9 e serina protease degradam a matriz extracelular favorecem a invasividade e metástase. Expressam quantidades elevadas de moléculas PD-L1, PD-L2, CD80 e CD86, que interagem com receptores presentes em CTLs, linfócitos B e células NK resultando na inibição da ativação dessas células. TGF- $\beta$  e IL-10 promovem a formação de linfócitos Treg a partir de linfócitos T CD4+, ao mesmo tempo que aumentam a expressão do Foxp3 e a expressão de CTLA4 (LIN; XU; LAN, 2019).

### *2.6.1 Estratégias de imunoterapias direcionadas aos TAMs*

Vários estudos têm associado a presença de TAMs no TME com resistência terapêutica, enquanto outros têm procurado lançar ideias para que sejam vistos não apenas como marcadores de prognóstico, mas também potenciais alvos terapêuticos. Considerando suas funções opostas pró-tumoral e antitumoral, os TAMs representam um alvo importante a ser explorado. As estratégias atuais direcionadas aos TAMs estão apresentadas na Figura 6 e podem ser divididas principalmente em dois tipos: a inibição dos TAMs pró-tumorais, que envolve a inibição do recrutamento e a eliminação, e a ativação dos TAMs anti-tumorais, que se refere à repolarização dos macrófagos M2 em M1 (PAN et al., 2020; ZHANG et al., 2020).

#### *2.6.1.1. Limitar o recrutamento de monócitos*

A quimiocina CCL2 liberada por monócitos, células tumorais e células estromais é responsável por atrair monócitos circulantes via ligação ao receptor CCR2. O bloqueio do eixo CCL2-CCR2 impede a chegada de monócitos aos tumores, diminuindo a presença de TAMs com características M2. Ainda impedem que as células efectoras antitumorais sejam inibidas. CXCL12 é uma quimiocina produzida por fibroblastos capaz de atrair monócitos e induzi-los a macrófagos com propriedades imunossupressoras via receptor CXCR4. O bloqueio destes receptores em macrófagos reduz significativamente a quimiotaxia e dos TAMs (LI et al., 2022; LIN; XU; LAN, 2019; ZHANG et al., 2020).

#### *2.6.1.2 Redução do número de TAMs no TME*

Além de inibir o recrutamento, uma estratégia poderosa que visa reduzir a quantidade de TAMs é induzir a apoptose destas células. O CSF-M é indispensável para a maturação, diferenciação e sobrevivência dos macrófagos. O bloqueio da via de sinalização CSF-M/CSF-MR resulta na morte em massa por apoptose. Estudos demonstraram que a elevada expressão de CSF-M ou CSF-MR está associada a um prognóstico desfavorável no linfoma de Hodgkin e carcinoma hepatocelular. A sinalização CSF-M/CSF-MR também para a mudança do fenótipo M1 para o M2 (LI et al., 2022; LIN; XU; LAN, 2019; ZHANG et al., 2020).

Alguns compostos são capazes de induzir a apoptose dos TAMs, é o caso da Trabectedina e de bifosfonatos. Trabectedina é um medicamento antineoplásico para tratar sarcomas de tecidos moles avançados e câncer de ovário. Seu mecanismo de ação

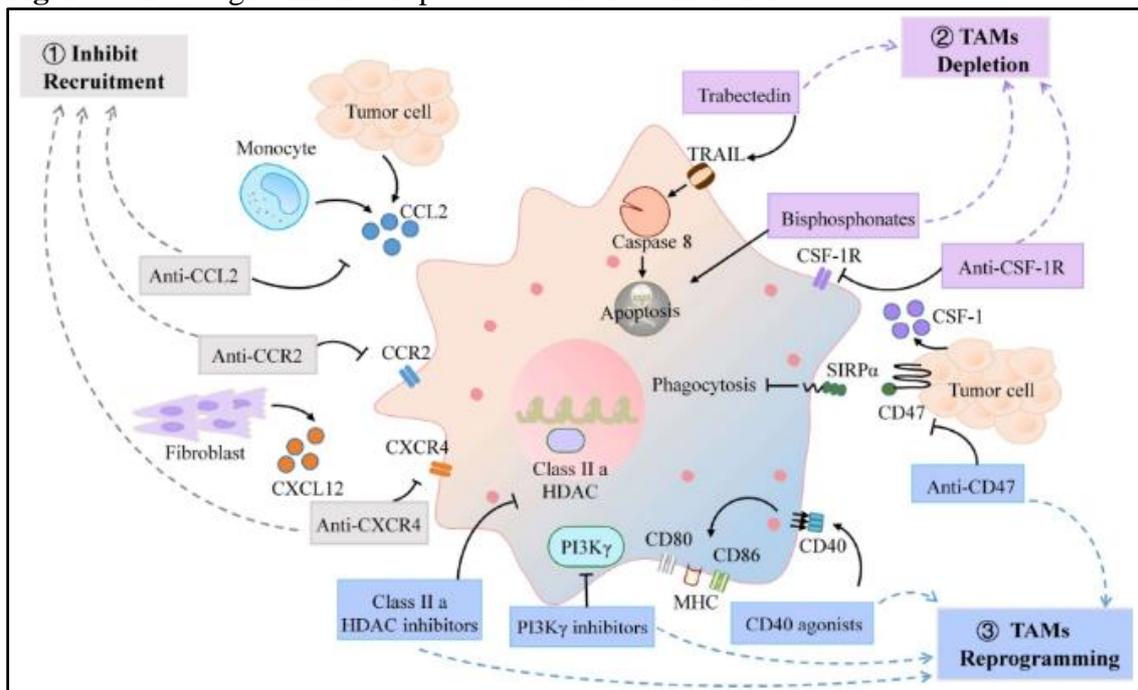
consiste em induzir morte por ligar-se ao DNA resultando na interrupção do ciclo celular e na quebra da dupla fita. O ácido zoledrônico e o clodronato são exemplos de compostos bifosfonatos, ambos agentes anti-reabsortivos que atuam induzindo a morte dos osteoclastos prevenindo metástases ósseas. Os macrófagos pertencem à mesma linhagem celular dos osteoclastos e também são afetados pelos bisfosfonatos (LI et al., 2022; LIN; XU; LAN, 2019; ZHANG et al., 2020).

### 2.6.1.3 Repolarização dos TAMs

A plasticidade dos macrófagos vem sendo explorada no sentido de alterar o fenótipo dos TAMs de M2 pró-tumoral para M1 antitumoral. Os macrófagos, expressam SIRP $\alpha$  em sua superfície, um receptor para CD47. O CD47 é um sinal de "não me coma" frequentemente expresso em diferentes tipos de células tumorais como forma de escapar da fagocitose. O bloqueio do eixo CD47/SIRP $\alpha$  restaura a função fagocítica dos macrófagos e é um sinal de *feedback* positivo para o fenótipo M1. O CD40, um membro da família dos receptores do TNF expresso em macrófagos, quando ativado estimula a liberação de citocinas pró-inflamatórias e aumenta a expressão de moléculas coestimulatórias, como CD80 e CD86 potencializando os efeitos antitumorais dos TAMs (LI et al., 2022; LIN; XU; LAN, 2019; ZHANG et al., 2020)

A ativação de PI3K $\gamma$  inibi a via NF- $\kappa$ B e causa imunossupressão. Estão seus inibidores restauram a vigilância imunológica e o estado pró-inflamatório. O emprego de inibidores das HDACs da classe IIa é uma estratégia emergente para repolarizar TAMs M2. As HDACs têm a capacidade de remover grupos acetila de proteínas histonas e não histonas, que contêm resíduos de lisina, e, assim, participam da regulação epigenética da expressão gênica. Estudos indicam que inibidores seletivos de HDACs da classe IIa induzem o recrutamento e a diferenciação de macrófagos M1. Os TLRs regulam a reprogramação das TAMs. Agonistas dos TLRs 3, 7, 8 e 9 transformam TAMs M2 em TAMs M1. O Lefitolimod é um exemplo de agonista do TLR9 que modula efetivamente o TME e induz respostas antitumorais por repolarizarem os TAMs (LI et al., 2022; LIN; XU; LAN, 2019; ZHANG et al., 2020).

**Figura 6:** Estratégias imunoterapêuticas com alvo em TAMs



**Fonte:** Zhang et al. (2020)

## 2.7 Melanoma

Os cânceres com maior incidência dentre todos são os que acometem a pele. São classificados de acordo com a célula que lhe deu origem, os principais são o carcinoma basocelular, carcinoma espinocelular e o melanoma. O melanoma é a manifestação mais severa do câncer de pele e impacta predominantemente pessoas de origem caucasiana independentemente do sexo. Origina-se da ocorrência de mutações genéticas nos melanócitos, as células produtoras do pigmento melanina. Podem atingir melanócitos não só da pele mas de outras regiões do corpo como olhos, ouvidos internos e leptomeninges (DOMINGUES et al., 2018).

A estimativa de casos de melanoma para o triênio 2020-2022 no Brasil é de um total de 8.450 casos, 4.200 em homens e 4.250 em mulheres. Apesar de ser o menos frequente dentre os três principais tipos de câncer de pele, o melanoma é mais letal, representou cerca de 5% do total dos casos e foi responsável por 31% do total de mortes por câncer de pele no Brasil no ano de 2017 (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2023).

O melanoma é considerado uma doença multifatorial surgindo da interação entre fatores ambientais e suscetibilidade genética. O fator ambiental mais danoso e mais importante é a exposição aos raios ultravioletas (UV) emitidos pelo sol por causar

mutações diretas no DNA das células. Foi identificado que a exposição à radiação UV de forma artificial por meio de câmaras de bronzeamento é também um fator de risco importante (LINARES; ZAKARIA; NIZRAN, 2015; RASTRELLI et al., 2014).

Número de nevos, susceptibilidade genética e histórico familiar são fatores de risco para o surgimento do melanoma. Cerca de 25% dos melanomas têm origem em nevos. Polimorfismos no gene MC1R estão ligados à susceptibilidade ao melanoma. Famílias com histórico da síndrome FAMMM, em que seus indivíduos carregam mutações nas proteínas CDKN2A e CDK4, do xeroderma pigmentoso e da síndrome de Li-Fraumeni também risco aumentado de desenvolver melanoma (TEIXIDO et al., 2021).

Os melanomas podem ser divididos em três principais subtipos com base no grau de Carga de Dano Solar (CSD). O grupo predominante compreende os melanomas associados a uma baixa CSD ou melanomas de espalhamento superficial acometem o tronco e membros. A alteração genética mais comum nesses melanomas é a mutação BRAFV600E. Além disso, mutações no promotor do gene TERT e mutações CDKN2A também são identificadas na maioria dos casos. Em tumores mais avançados, é comum observar as mutações nos genes PTEN e TP53 (TEIXIDO et al., 2021).

O lentigo maligno e os melanomas desmoplásicos são considerados melanomas associados a uma alta CSD. Esses tipos de melanoma surgem em áreas da pele intensamente danificadas pelo sol, como o rosto ou as mãos, e tendem a afetar pessoas mais idosas. Frequentemente apresentam uma alta carga de mutações e podem abrigar mutações nos genes NRAS, BRAF não-V600E ou NF1. Também é comum encontrar mutações no promotor TERT e mutações CDKN2A e no gene KIT. Curiosamente, o número de mutações aumenta à medida que o grau de CSD aumenta e os melanomas desmoplásicos apresentam a maior carga de mutações (TEIXIDO et al., 2021).

A categoria de melanomas com exposição baixa ou nenhuma a UV/CSD engloba melanomas de Spitz, melanomas acrais, melanomas mucosos, melanomas originados de nevos congênitos e azuis melanomas uveais. Esses melanomas raramente apresentam mutações nos genes BRAF, NRAS ou NF1. Alguns melanomas acrais e mucosos podem apresentar mutações no gene KIT, além de ampliações e reorganizações estruturais mais comumente nos genes CCND1 e SF3B1. Estudos genômicos subsequentes destacaram que os melanomas acrais e mucosos são biologicamente distintos de seus homólogos cutâneos em áreas expostas ao sol. Melanomas de Spitz demonstram uma via de sinalização oncogênica específica que envolve fusões de genes de tirosina quinase ou

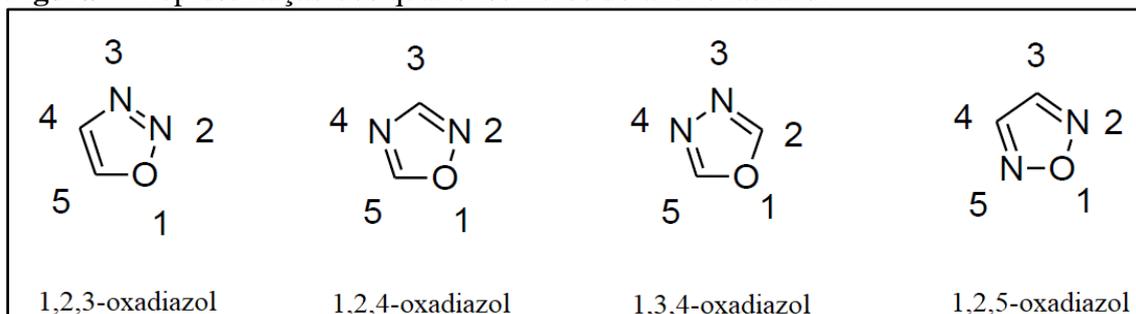
serina-treonina quinase, enquanto melanomas em nevos azuis e melanomas uveais são caracterizados por mutações nos genes GNA11 ou GNAQ (TEIXIDO et al., 2021).

A dacarbazina foi a primeira monoterapia para o melanoma metastático aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 1975. Como forma de superar taxas de resposta resolutiva entre 5-20% e as recidivas piores enfrentadas pelos pacientes novos, tratamentos surgiram associando a dacarbazina com agentes imunoterápicos. A imunoterapia caracteriza-se pelo emprego de medicamentos que atuem na imunidade do paciente fortalecendo-a contra o tumor e atualmente é a abordagem terapêutica mais eficaz contra melanomas avançados. São imunoterápicos atualmente empregados o IFN- $\alpha$ 2 tem ação antiangiogênica, imunoregulatória e antiproliferativa, o Ipilimumab, um anticorpo inibidor de CTLA-4 atua inibindo a ativação dos linfócitos Treg, o nivolumab, um anticorpo inibidor de PD-1, bloqueia a ligação com o PD-L1 e mantém as CTLs ativadas e o dabrafenid atua como inibidor de oncogene BRAF. (LEE; MUKHI; LIU, 2012; WADA-OHNO; ITO; FURUE, 2019).

## 2.8 Derivados 1,2,4-oxadiazóis

Oxadiazol é uma classe de compostos químicos caracterizada pela presença de um heterociclo formado por dois átomos de carbono, dois átomos de nitrogênio e um átomo de oxigênio e mais duas duplas ligações. Estruturalmente são comparáveis aos furanos, mas a troca de dois átomos de carbono na cadeia dos furanos por dois de nitrogênio provoca uma redução na aromaticidade ao ponto de o anel apresentar um caráter de um sistema de dieno conjugado. O heterociclo tem fórmula molecular  $C_2H_2N_2O$ , massa 70,05 g/mol e a variação da posição dos átomos origina 4 isômeros: 1,2,3-oxadiazol, 1,2,4-oxadiazol, 1,3,4-oxadiazol e 1,2,5-oxadiazol como mostrado na Figura 7 (VAIDYA; PATHAK; SHAH, 2021).

**Figura 7:** Representação dos quatro isômeros do anel oxadiazol



Fonte: Adaptado de Vaidya et al. (2021)

Os oxadiazóis são versáteis grupos introduzidos em moléculas para atuarem como ponte ligando grupos planos e/ou grupos aromáticos, melhorar o posicionamento de substituintes e orientação espacial, participar de ligações químicas de natureza fraca ou forte dentre outros. Possuem conformação favorável para interações não covalentes com enzimas e receptores e também podem atuar como sendo parte do grupo ou principal grupo farmacofórico de medicamentos como nos casos do Raltegravir, Zibotetan e Furamizol (RUAN et al., 2022).

O anel 1,2,4-oxadiazol tem sido descrito na literatura como um bioisómero de amidas e ésteres com estabilidade metabólica e hidrolítica. Esta propriedade pode solucionar alguns problemas relacionados a moléculas bioativas instáveis como no caso de certos peptídeos inibidores enzimáticos, neurotransmissores e hormônios que são rapidamente hidrolisados ou degradados pelo efeito de peptidases. Para estes casos, a substituição das amidas pelo anel 1,2,4-oxadiazol traria mais estabilidade a molécula (MAFTEI et al., 2013).

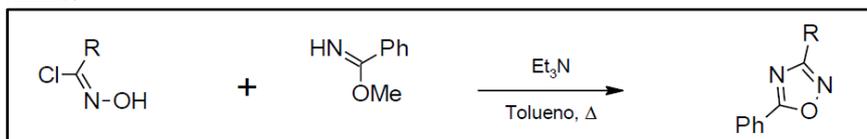
Durante a década de 1960, a medida que se explorava a capacidade dos heterocíclis de sofrerem rearranjos moleculares, houve um crescente interesse na utilização sua utilização tanto na química medicinal quanto na química de materiais. A química de materiais é o ramo da química que se dedica a síntese, caracterização e aplicação de compostos. O foco é a criação e desenvolvimento de substâncias ou complexos que melhorem tecnologias já existentes ou que propiciem o surgimento de novas. Polímeros, cristais líquidos, sais orgânicos funcionais, sensores, materiais luminescentes e materiais com propriedades micelares são alguns exemplos de aplicações que utilizam 1,2,4-oxadiazóis que sofreram modificações na geometria e polarização molecular para alcançar um determinado fim (DE FREITAS et al., 2012; PACE et al., 2015; PACE; PIERRO, 2009).

O anel 1,2,4-oxadiazol impactou a pesquisa na área da química medicinal após o lançamento do primeiro medicamento pertencente a classe dos oxadiazóis, a Oxalamina, um supressor da tosse. Daí em diante vieram novos lançamentos como Prenoxdiazina, Fasiplon, Pleconaril, Proxazol, Ataluren e Butalamina. O sucesso terapêutico causou um vislumbre para novas aplicações e contribuiu para um aumento expressivo no número de publicações envolvendo a síntese e aplicações. (DE FREITAS *et al.*, 2012; DEB *et al.*, 2021).

A síntese de compostos derivados 1,2,4-oxadiazol é bastante difundida na literatura, as metodologias empregadas utilizam uma variedade de materiais e condições

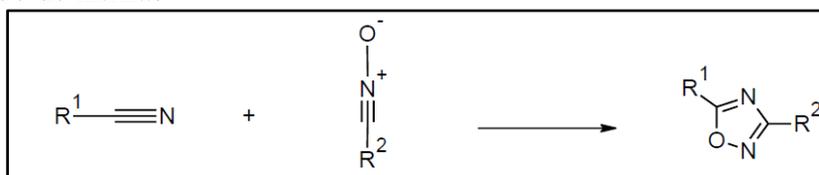
reacionais. A primeira rota sintética foi estabelecida em 1884 por Tieman e Kruger. Atualmente, as mais comuns e utilizadas estão apresentadas nos Esquemas 1, 2 e 3, e partem de compostos de nitrila já preparados, como é o caso da síntese por cicloadição 1-3-dipolar de nitrilas e N-óxidos de nitrila e ciclização de amidoximas (ATMARAM; ROOPAN, 2022).

**Esquema 1:** Obtenção do anel 1,2,4-oxadiazol a partir da cicloadição 1,3-dipolar entre iminas e oximas



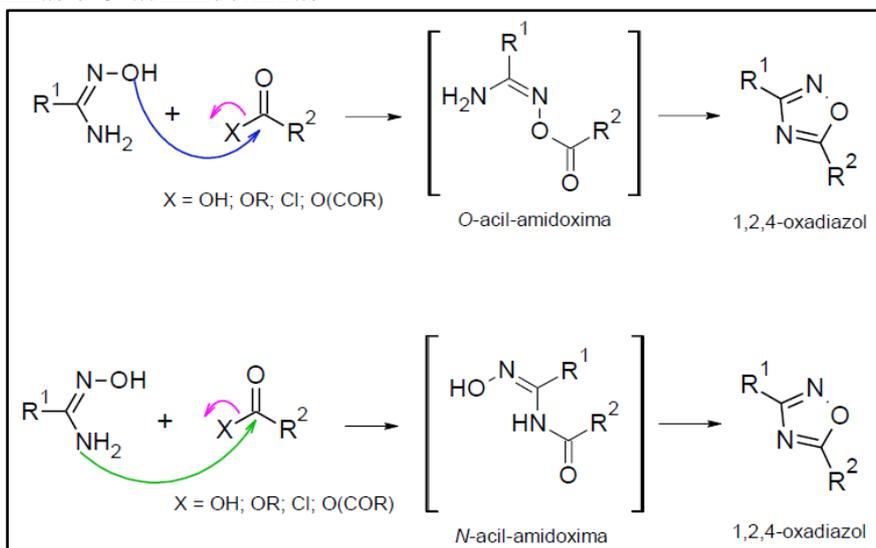
Fonte: Oliveira (2020) e PACE et al. (2009)

**Esquema 2:** Obtenção do anel 1,2,4-oxadiazol a partir da cicloadição 1,3-dipolar entre nitrila e óxido de nitrilas



Fonte: Oliveira (2020) e PACE et al. (2009)

**Esquema 3:** Obtenção do anel 1,2,4-oxadiazol a partir da condensação de N-acilmidoximas e O-acilmidoximas



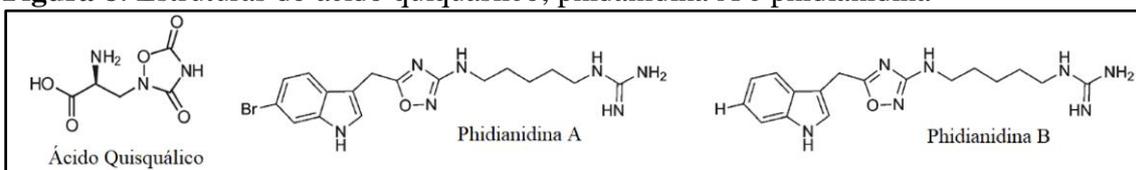
Fonte: Oliveira (2020) e PACE et al. (2009)

Objetivando otimizar a síntese em relação ao melhor aproveitamento dos insumos, maior rendimento dos produtos, menor tempo de reação, obtenção de diferentes oxadiazóis com substituições e de tornar o processo menos danoso ao meio ambiente, a

irradiação por micro-ondas vem sendo aplicada como alternativa às metodologias convencionais (ATMARAM; ROOPAN, 2022). As micro-ondas geralmente facilitam a ciclocondensação deixando o método como uma alternativa otimizada capaz de produzir compostos derivados 1,2,4-oxadiazol mesmo sem uma temperatura controlada ou agitação homogênea (ATMARAM; ROOPAN, 2022; PACE; PIERRO, 2009).

Em paralelo com as pesquisas na área de materiais, vasta também é a quantidade na área de química medicinal. Os primeiros compostos 1,2,4-oxadiazóis identificados em produtos naturais foram a forma oxidada do ácido quisquálico, isolado de sementes de plantas das espécies *Quisqualis indica* e *Quisqualis fructus*, e as phidianidinas A e B, isoladas de moluscos da espécie *Phidiana militaris* (Figura 8) (CARBONE *et al.*, 2011). Uma abordagem consagrada empregada no desenvolvimento de novos fármacos é buscar inspiração em substâncias oriundas de produtos naturais, estas moléculas carregam grande diversidade estrutural, propriedades físico-químicas únicas e em muitos casos, atividades farmacológicas. Para a indústria farmacêutica há economia de recursos financeiros, de tempo e maior potencial de sucesso ao realizar alterações pontuais para atingir propriedades farmacológicas desejadas em uma molécula já conhecida do que seguir o caminho convencional de síntese de moléculas inéditas (HUANG; ZHANG, 2022).

**Figura 8:** Estruturas do ácido quiquáslico, phidanidina A e phidianidina



**Fonte:** CARBONE *et al.* (2011).

Com grande potencial terapêutico, moléculas derivadas do anel 1,2,4-oxadiazol já demonstraram vasta gama de atividades biológicas, incluindo antitumoral (MOHAN G *et al.*, 2021), anti-inflamatória (GOBEC *et al.*, 2015; VIJAYA BHARGAVI *et al.*, 2018), analgésica (VIJAYA BHARGAVI *et al.*, 2018), anti-helmíntica (RUAN *et al.*, 2020), anti-Alzheimer (WANG *et al.*, 2021), antibacteriana (IBRAHIM *et al.*, 2021), antifúngica (LIU *et al.*, 2022), antiparasitário (ROCHA *et al.*, 2022) anticonvulsivante (MOHAMMADI-KHANAPOSHTANI *et al.*, 2019), ansiolítico e antipsicótico (STANKIEWICZ *et al.*, 2022), anti-tuberculose (DEB *et al.*, 2021), antiviral (KIM *et al.*, 2018), anti-dengue e anti-zika (NAM *et al.*, 2022).

Adentrando a atividade antitumoral, a literatura mostra que os compostos derivados do anel 1,2,4-oxadiazol são capazes de causar a morte em um grande grupo de linhagens tumorais como as de mama (MCF-7, MDA-MB-231, HBL100, T47D, PyMT-B01 e 4TI), próstata (PC3) cólon (SW111, HT29, WiDr e HCT116), pele (Du145, B16-F10 e SKMEL103, pulmão (A549, SW1573, Lewis, NCIH460 e NCIH226), leucemias (MV411, MOLM13, THP-1, OCI-AML3, NB4, HL, CMK, CCRF-CEM, HL69, SR e outros, por diferentes mecanismos de ação, tais como apoptose, necrose, inibição da telomerase, inibição da polimerização da tubulina, parada do ciclo celular e alteração do potencial de membrana mitocondrial (ARAÚJO *et al.*, 2022).

Considerando a atividade moduladora do sistema imunológico, são atribuídos aos compostos derivados do anel 1,2,4-oxadiazol a redução e aumento de infiltrados leucocitários em edemas, aumento e redução da produção óxido nítrico (NO), redução de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , redução da ativação da via NF- $\kappa$ B e atividades anti-inflamatória por inibição das enzimas ciclooxigenases (COX) (ARAÚJO *et al.*, 2023).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito antitumoral e imunomodulador de derivado sintético 1,2,4-oxadiazol, o N-ciclohexil-3-(3-metilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-amina, denominado como molécula 2, em células de melanoma e MDMO murinos.

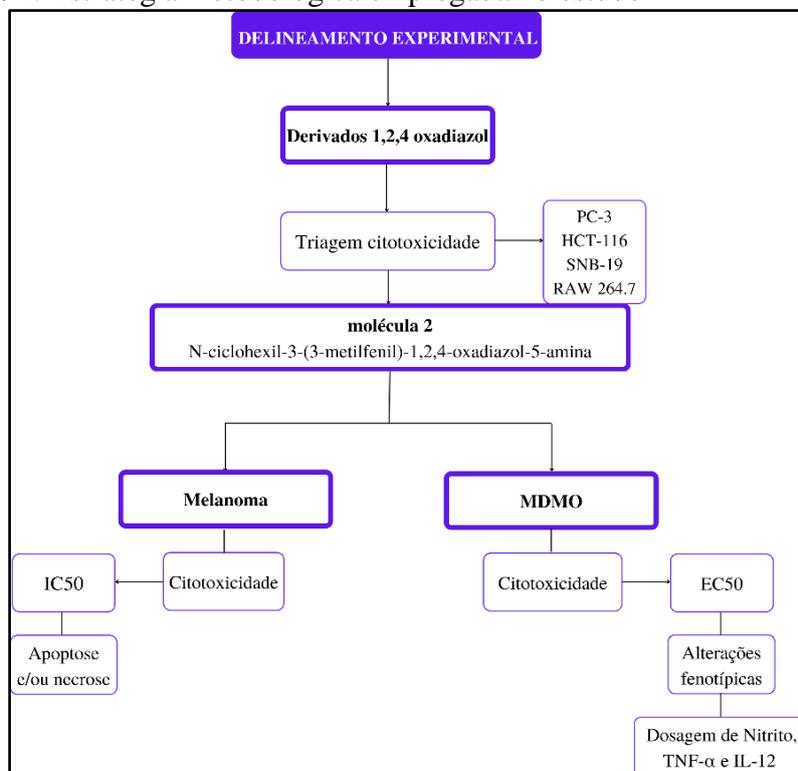
#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a citotoxicidade dos compostos VN 147, VN 148, VN 155, VN 157, VN 158, VN 162, VN 164, VN181, VN 185, VN 187 e molécula 2 nas linhagens celulares HCT-116, PC-3, SNB-19 e RAW264.7 e selecionar o mais promissor;
- Avaliar a citotoxicidade da molécula selecionada em células de linhagem de melanoma e MDMO murino para determinar a IC<sub>50</sub>;
- Identificar a via de morte celular em melanoma murino após exposição a molécula selecionada;
- Investigar o efeito da exposição à molécula selecionada sobre o fenótipo dos MDMO murino com base na expressão dos marcadores F4/80, CD11b e CD206;
- Investigar o efeito da estimulação com LPS e sobrenadantes oriundos de melanoma murino, em diferentes condições, sobre o fenótipo dos MDMO murino;
- Dosar a quantidade de nitrito, TNF- $\alpha$  e IL-12 nos sobrenadantes de MDMO murino expostos a molécula selecionada e estimulados com LPS e sobrenadantes oriundos de melanoma para avaliar a correlação com o fenótipo identificado.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

O Fluxograma 1 apresenta a estratégia metodológica do deste estudo. Um conjunto de dez moléculas sintéticas derivadas de 1,2,4-oxadiazol obtidas pelo método de irradiação por micro-ondas, designadas pelos códigos molécula 2, VN 147, VN 148, VN155, VN158, VN181, VN 185 e VN 187, foram avaliadas quanto a sua toxicidade em células de linhagem, para que pudéssemos eleger a mais promissora. Após escolha do N-ciclohexil-3-(3-metilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-amina, referida como molécula 2 durante todo o texto a fim de padronizar a nomenclatura usada também por Rocha et al. 2022, foram realizados testes *in vitro* para avaliação da citotoxicidade em melanoma murino (linhagem B16-F10) e MDMO murino. Calculados os valores das concentrações inibitórias ou efetivas médias para 50% da quantidade inicial de células (IC<sub>50</sub> ou EC<sub>50</sub>), definimos as concentrações a serem utilizadas nos ensaios de identificação da via de morte por apoptose e/ou necrose para o melanoma murino, bem como nos ensaios de investigação de alterações no fenótipo dos MDMO. Por fim, dosamos a quantidade de nitrito, TNF- $\alpha$  e IL-12 nos sobrenadantes recolhidos dos MDMO.

**Fluxograma 1:** Estratégia metodológica empregada no estudo



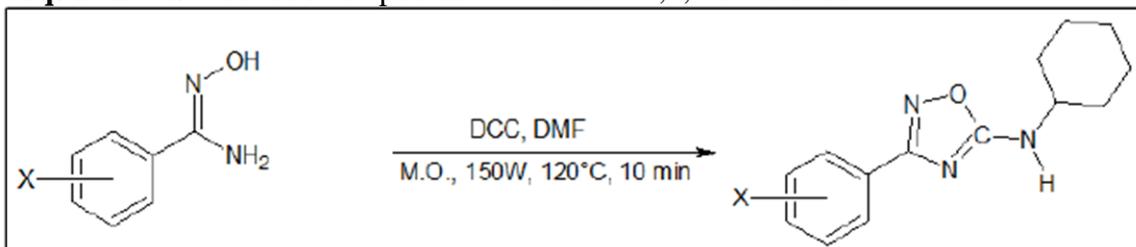
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

## 4.1 Moléculas

Todas as moléculas utilizadas estão apresentadas na Tabela 1. Foram sintetizadas, nomeadas conforme nomenclatura da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) e tiveram os códigos designados em colaboração com o Laboratório de Síntese de Compostos Bioativos da Universidade Federal Rural de Pernambuco (LSCB-UFRPE). Escolhemos fazer referência as moléculas pelos seus códigos para abreviar seus nomes oficiais e para mantermos a mesma nomenclatura utilizada em estudos já publicados pelo nosso grupo de pesquisa.

Segundo Oliveira et al. (2021), para a síntese dos compostos N-ciclohexil-1,2,4-oxadiazol mostrada no Esquema 4, uma solução contendo 1 mmol de arilamidoximas foi dissolvida em Dimetilformamida (DMF), seguido da adição de 1,5 mmol de dicitlohexilcarbodiimida (DCC). Os reagentes foram submetidos a 10 min de irradiação focalizada de micro-ondas, a 150 W de potência e 120 °C. Do produto foram purificados, identificados e isolados os compostos molécula 2, VN 155 e VN 158.

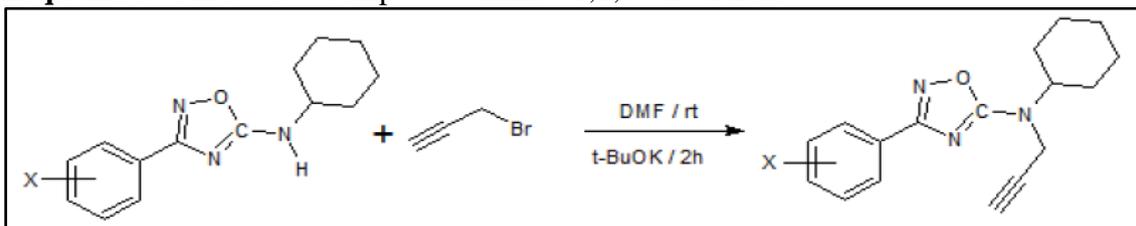
**Esquema 4:** Síntese dos compostos N-ciclohexil-1,2,4-oxadiazóis



**Fonte:** Oliveira et al. (2021)

Para a síntese dos compostos alcinos-1,2,4-oxadiazol mostrada no Esquema 5, o produto da reação apresentada no Esquema 4 foi dissolvido em DMF, seguido da adição de 2 equivalente mol de brometo propargílico e 1 equivalente mol de base t- butóxido de potássio (t-BuOK). Os reagentes foram submetidos a agitação em temperatura ambiente por 2 horas. Do produto foram purificados, identificados e isolados os compostos molécula VN 147, VN 148, VN 162 e VN 164.

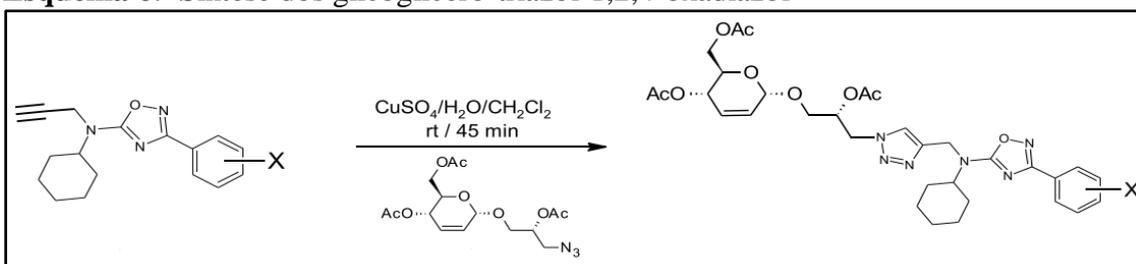
**Esquema 5:** Síntese dos compostos alcinos-1,2,4-oxadiazóis



**Fonte:** Oliveira et al. (2021)

Para a síntese dos compostos glicoglicero-triazol-1,2,4-oxadiazol mostrada no Esquema 6, ao produto da reação apresentada no esquema 5 foram adicionados 1,5 mL de água destilada, 0,09 mmol de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  e 0,135 mmol de ascorbato de sódio. A solução foi misturada com 1,5mL de azido-glicero-carboidrato dissolvido em diclorometano e mantida sob agitação em temperatura ambiente e atmosfera inerte por 45 minutos. Do produto foram purificados, identificados e isolados os compostos VN 181, VN 185 e VN 187.

**Esquema 6:** Síntese dos glicoglicero-triazol-1,2,4-oxadiazol



**Fonte:** Oliveira et al. (2021)

As sínteses resultaram em sólidos de aspecto amorfo e com solubilidade bastante reduzida em água. Para que pudessem ser empregadas nos testes a seguir, foram inicialmente diluídas em dimetil sulfóxido (DMSO) estéril com concentração ajustada para 100mM e a partir desta, foram realizadas diluições de acordo com cada metodologia proposta.

**Tabela 1:** Derivados sintéticos 1,2,4-oxadiazol abordados no estudo

Nome IUPAC	Código atribuído	Estrutura molecular
N-Ciclohexil-3-(3-metil-fenil)-1,2,4-oxadiazol-5-amina	Molécula 2	
N-ciclohexil-3-fenil-N-(prop-2-in-1-il)-1,2,4-oxadiazol-5-amina	VN 147	
N-ciclohexil-3-(3-metilfenil)-N-(prop-2-in-1-il)-1,2,4-oxadiazol-5-amina	VN 148	
N-Ciclohexil-3-(4-metilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-amina	VN 155	
N-Ciclohexil-3-(4-fluorofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-amina	VN 158	
N-ciclohexil-3-(4-fluorofenil)-N-(prop-2-in-1-il)-1,2,4-oxadiazol-5-amina	VN 162	
N-ciclohexil-3-(4-nitrofenil)-N-(prop-2-in-1-il)-1,2,4-oxadiazol-5-amina	VN 164	
N-ciclohexil-N-[1-(1'-O-(4,6-Di-O-acetil-2,3-didesoxi-α-Deritro-hex-2-enopiranosil)-(2'-acetil-3'-desoxi-sn-gliceril-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]-3-(4-metoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-5-amina	VN 181	
N-ciclohexil-N-[1-(1'-O-(4,6-Di-O-acetil-2,3-didesoxi-α-Deritro-hex-2-enopiranosil)-(2'-acetil-3'-desoxi-sn-gliceril-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]-3-(3-nitrofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-amina	VN 185	
N-ciclohexil-N-[1-(1'-O-(4,6-Di-O-acetil-2,3-didesoxi-α-Deritro-hex-2-enopiranosil)-(2'-acetil-3'-desoxi-sn-gliceril-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]-3-(4-nitrofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-amina	VN 187	

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

## 4.2 Células

### 4.2.1 Obtenção e cultivo de células de linhagem

As células de linhagem imortalizadas humanas de Próstata (PC-3), Cólon (HCT-116) e Sistema Nervoso Central (SNB-19) e a linhagem tumoral de melanoma murino (B16-F10) foram cedidas pelo Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) da Universidade Federal do Ceará (UFC) e cultivadas em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (Gibco, Carlsbad, CA) suplementados com 10% de volume de soro fetal bovino (SBF) (LGC Biotecnologia Ltda.) e 1% de volume de solução contendo os antibióticos penicilina (200 UI/mL) e estreptomicina (130 mg/L) (LGC Biotecnologia Ltda.). A linhagem de macrófagos murino RAW 264.7 foi cedida pelo Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica da UFC (LBFBC-UFC) e cultivada em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) high glicose (Gibco, Carlsbad, CA) suplementado com 10% de volume SBF (LGC Biotecnologia Ltda.) e 1% de volume dos antibióticos penicilina (200 UI/mL) e estreptomicina (130 mg/L) (LGC Biotecnologia Ltda.). Células e meio de cultura foram transferidos para garrafas plásticas estéreis próprias para cultivo da marca Kasvi e mantidas em estufas com temperatura de  $37 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$  e atmosfera com 5% de  $\text{CO}_2$  (GONÇALVES; SOBRAL, 2020).

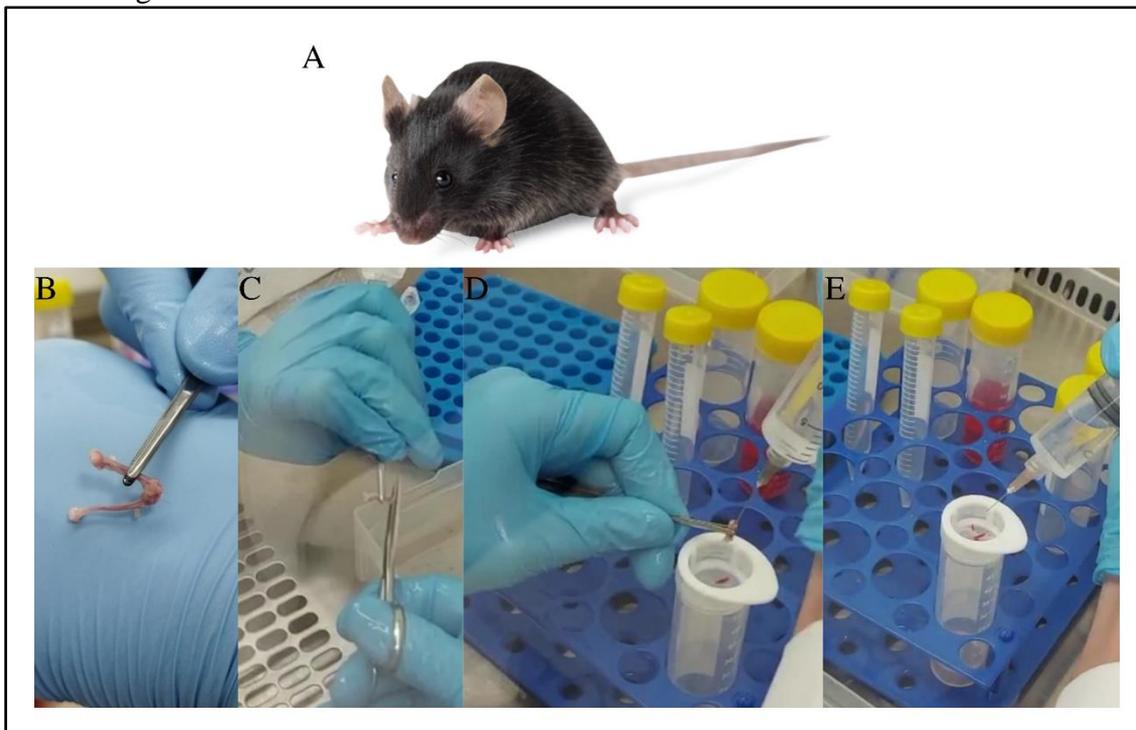
### 4.2.2 Obtenção e cultivo de MDMO

Foram utilizados camundongos isogênicos fêmeas com idade entre 6 e 8 semanas da linhagem C57BL/6 pesando entre 19 e 22g oriundos do Biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da UFC (Figura 9). Todos os animais foram mantidos nas próprias dependências do Biotério, sob condições ambientais controladas com ciclo claro/escuro de 12/12h, temperatura ambiente em torno de  $23^{\circ}\text{C}$ , com ração e água *ad libitum*. A aplicação dos protocolos e procedimentos experimentais foram previamente submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do NPDM (CEUA-NPDM), nº 9676290319.

Os camundongos foram eutanasiados por administração de dose letal de associação dos anestésicos Cetamina e Xilazina calculadas conforme a massa de cada um. Foram retirados os fêmures e tíbias e transportados em solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril gelado até o laboratório de cultivo celular na Fiocruz Ceará para a coleta da medula óssea. Dentro da capela de fluxo laminar as epífises dos ossos foram

cortadas e o conteúdo extraído através de injeção de PBS estéril dentro da cavidade medular com auxílio de seringa 10 mL e agulha tamanho 23G. Em seguida, o material extraído foi passado através de tamis próprio para células, com 70µm de tamanho de malha, para evitar material não desejado nos tubos Falcon (Figura 9).

**Figura 9:** Representação da obtenção de células imaturas da medula óssea de camundongos



**Legenda:** (A) Camundongo C57BL/6. (B) Fêmur e tíbia. (C) Corte das epífises. (D) Injeção de PBS. (E) Medula óssea extraída.

As células imaturas recolhidas foram direcionadas as etapas de maturação e diferenciação em MDMO. Para isso, o *pellet* celular foi centrifugado, o sobrenadante descartado, as células ressuspendidas em meio de diferenciação de macrófagos constituído por DMEM high glicose (Gibco, Carlsbad, CA) suplementado com 10% de volume de SBF (LGC Biotecnologia Ltda.) e 1% de volume de solução contendo os antibióticos penicilina (200 UI/mL) e estreptomicina (130 mg/L) (LGC Biotecnologia Ltda.) e mais 10ng/mL de fator estimulante de colônia de macrófagos (CSF-M) (Sigma-Aldrich Brasil Ltda.). Foram então destinadas ao cultivo em 10mL no mesmo meio de diferenciação em placas de *petri* estéreis pouco aderentes da marca Kasvi, mantidas em estufa com temperatura de  $37 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$  e atmosfera com 5% de  $\text{CO}_2$ . Quatro dias após a etapa anterior foram adicionados mais 5mL do meio de diferenciação de macrófagos, volume correspondente a 50% do utilizado inicialmente para o cultivo. Mais três dias

adiante, a diferenciação celular completou-se, com rendimento entre  $2,5 \times 10^6$  e  $3,5 \times 10^6$  MDMO maduros, sendo previamente confirmada por citometria de fluxo conforme descrito no tópico 5.4.2 para que então fossem destinadas a realização dos ensaios (TODA *et al.*, 2021; TROUPLIN *et al.*, 2013; ZHANG; GONCALVES; MOSSER, 2008).

### **4.3 Ensaios de citotoxicidade dos derivados 1,2,4-oxadiazol em células de linhagem e MDMO**

A viabilidade celular foi avaliada pela redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) a (E,Z)-5-(4,5dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazan (Formazan). Este processo ocorre no interior de células viáveis cujas enzimas desidrogenases mitocondriais e citoplasmáticas estão preservadas e são capazes de reduzir o sal MTT de coloração amarela a sal de Formazan de coloração roxa. A quantidade de sal de Formazan é proporcional a quantidade de células viáveis. Trata-se de um método colorimétrico cuja leitura é realizada em espectrofotômetro (MOSMANN, 1983; MUUL *et al.*, 2011).

Quando as garrafas de cultura de linhagem atingiram 90% de confluência, as células em crescimento foram lavadas com PBS estéril, soltas da superfície de crescimento com a adição de tripsina 1x (0,05g/L), recolhidas em tubo Falcon e centrifugadas por 5 minutos a 200 x g. Em relação aos MDMO, após confirmação microscópica da diferenciação, as células também passaram por lavagem com PBS estéril e foram soltas da superfície de crescimento com o auxílio de um *cell scraper*, recolhidas em tubo Falcon e centrifugadas por 5 minutos a 200 x g. Os sobrenadantes foram desprezados, o *pellet* celular foi ressuscitado em meio completo e uma alíquota de 10 $\mu$ L foi retirada para fazer a contagem em câmara de Neubauer com o emprego do corante azul de Tripán 0,4%. Foram contados os quatro quadrantes externos e a média representou a quantidade de células por mL, esta etapa foi comum a todos os tipos celulares (MOLINARO, CAPUTO, AMENDOEIRA, 2010).

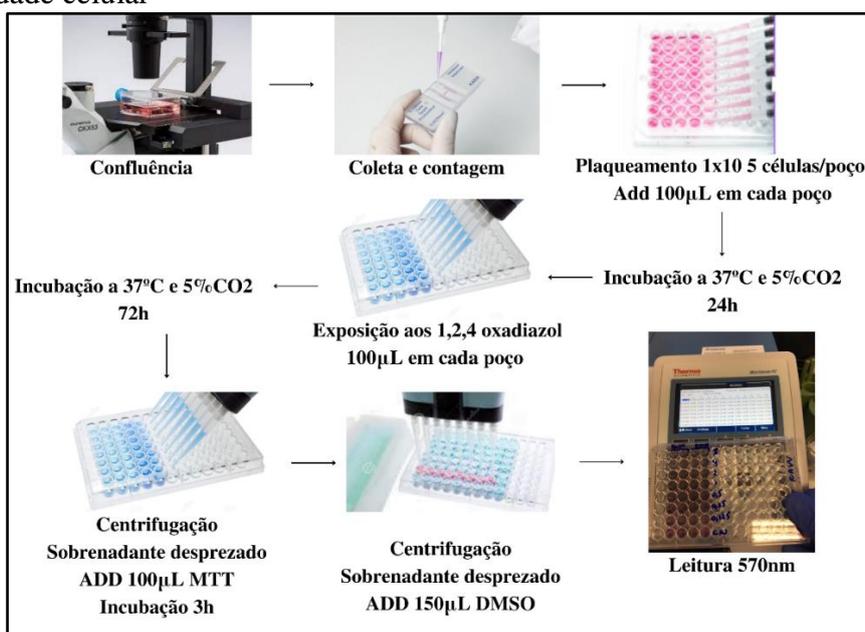
Esse corante empregado é permeável a membrana plasmática e nos permite distinguir células viáveis e não viáveis de acordo com a coloração observada. Células viáveis conseguem devolver para o meio extracelular o corante presente no seu interior e se apresentam como não coradas quando observadas em microscópio óptico, por outro lado, as células não viáveis se mantêm coradas em azul. Esta observação prévia é

importante para avaliarmos a qualidade das células que serão plaqueadas no teste que visa avaliar a citotoxicidade causada pelos derivados sintéticos 1,2,4-oxadiazol.

A densidade utilizada para os ensaios do MTT foi de  $1 \times 10^5$  células/poço. Foram distribuídos 100µL desta concentração de células em cada poço da placa de 96 poços de fundo chato, exceto nos poços destinados a medida do branco, e incubadas por 24h em estufa com temperatura de  $37 \pm 0,3^\circ\text{C}$  e atmosfera com 5% de  $\text{CO}_2$ . Foram adicionados 100µl das soluções contendo as diferentes concentrações das moléculas empregadas em nosso estudo, concentração fixa de 100µM e concentrações variadas de 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125µM a depender do ensaio. O controle negativo correspondeu a adição apenas de meio completo. O DMSO foi avaliado em concentração volume/volume (v/v) correspondente a maior concentração da molécula a ser testada, ficando sempre em concentrações iguais ou inferiores a 0,4%. Os poços destinados a medida do branco ficaram vazios.

As placas foram incubadas por 72h nas mesmas condições de cultivo celular descritas anteriormente. Passado este período de incubação, foram centrifugadas, o sobrenadante dos poços foi retirado, foram adicionados 100µl de solução de MTT 2,5mg/mL e levadas para nova incubação por 3h. Finalizado o tempo, as placas foram centrifugadas, o sobrenadante retirado, foram adicionados 150µl de DMSO e submetidas a 20 minutos de agitação para dissolver os cristais de sal de Formazan formados. Por fim, a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 570nm.

**Figura 10:** Representação esquemática do ensaio do MTT para avaliação de citotoxicidade celular



**Fonte:** Elaborado pelo autor. Imagens retiradas do Google.

## 4.4 Análises por citometria de fluxo

### 4.4.1 Identificação de via de morte celular por apoptose/necrose em melanoma murino

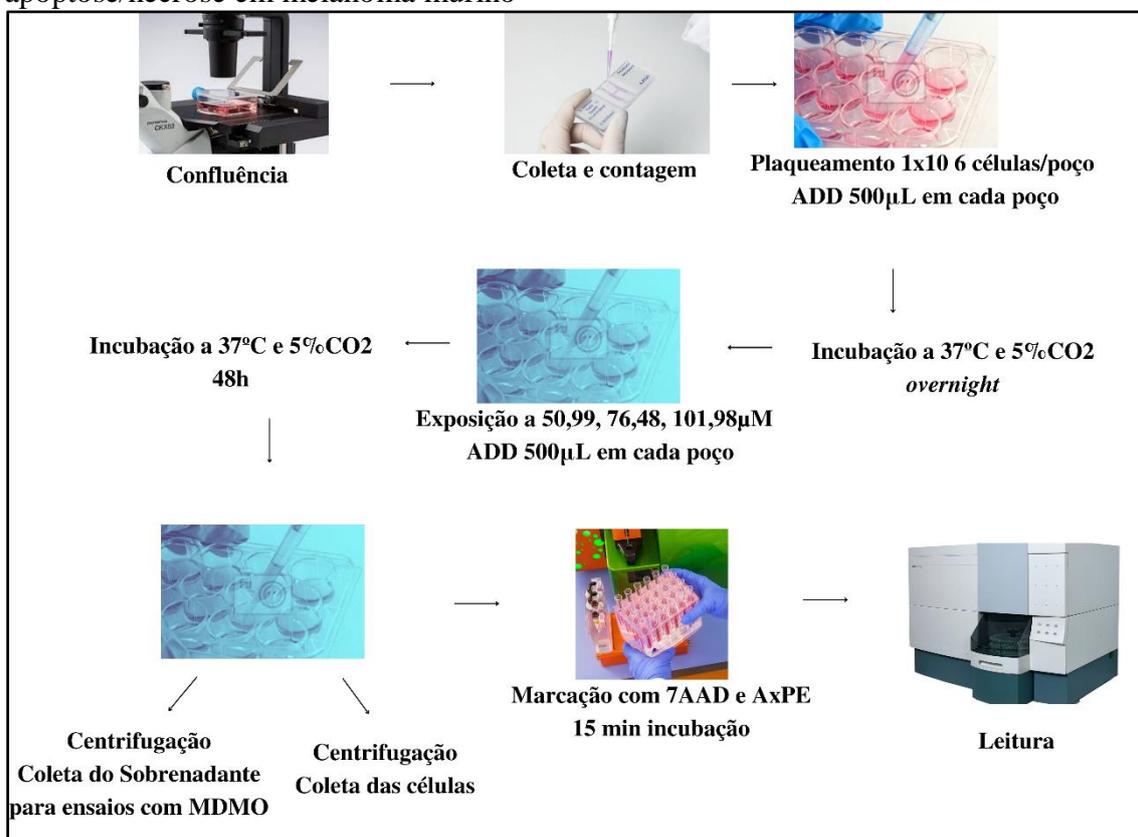
O ensaio para identificação da via de morte celular foi realizado utilizando citometria de fluxo e os marcadores 7-aminoactinomicina (7-AAD) e a Anexina V-conjugada com o fluorocromo Ficoeritrina (PE) (AxPE). A anexina V é uma proteína que se liga ao fosfolípido fosfatidilserina, em células vivas sua localização fica restrita ao lado interno da bicamada lipídica da membrana plasmática. Processos apoptóticos são acompanhados de alterações estruturais na membrana e provocam a translocação da fosfatidilserina para o lado externo, o uso de AxPE objetiva identificar este tipo de processo de morte. O 7-AAD é empregado em conjunto com a AxPE para ajudar a distinguir células em processos de apoptose recente, tardia ou necrose, uma vez que se trata de composto incapaz de adentrar células viáveis cuja estrutura membranar está intacta. Este marcador se liga ao DNA celular indicando avançados desarranjos estruturais celulares e consequente ruptura da membrana plasmática, características encontradas em processos apoptóticos classificados como tardios e principalmente em processos necróticos. (MACIEL *et al.*, 2014; MUPPIDI; PORTER; SIEGEL, 2004; STEENSMA; TIMM; WITZIG, 2003).

As células de linhagem B16-F10 foram plaqueadas em placas de fundo chato de 12 poços. 500µL de solução com densidade de  $1 \times 10^6$  células por poço foram adicionados e levados para incubação *overnight* em estufa com temperatura de  $37 \pm 0,3^\circ\text{C}$  e atmosfera com 5% de  $\text{CO}_2$ . Em seguida foram adicionados 500µL de soluções da molécula 2 nas concentrações de 50,99, 76,48, 101,98µM. Estas concentrações foram escolhidas de acordo com o valor de  $\text{IC}_{50}$  obtido nos ensaios de citotoxicidade e representam respectivamente o valor de  $\text{IC}_{50}$ ,  $1,5 \times \text{IC}_{50}$ ,  $2 \times \text{IC}_{50}$ . Para o controle negativo foi adicionado 500µL de meio RPMI completo. O veículo DMSO foi testado em concentração volume/volume correspondente a maior concentração da molécula 2 ficando sempre em concentrações iguais ou inferiores a 0,102%. O volume final para todos os poços foi de 1mL.

As placas foram incubadas por 48h mantendo-se as mesmas condições anteriores. Após incubação, os sobrenadantes do controle negativo, abordado daqui em diante como Sobrenadante A, e dos grupos expostos a molécula 2 nas concentrações 50,99, 76,48, 101,98µM, abordados daqui em diante como Sobrenadantes B, C e D respectivamente, foram recolhidos e armazenados para posterior utilização nos ensaios com MDMO.

As células foram lavadas com PBS estéril, tripsina 1x (0,05g/L) foi adicionada para desprendê-las e possibilitar a transferência para tubos *ependorf* para que fossem centrifugados por 5 min a 200 x g. Finalizada a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e foram feitas mais duas lavagens com PBS estéril. A marcação das células foi então realizada pela adição de 400µl de tampão de ligação, 5µl de solução 7-AAD e 5µL de AxPE. Após 15 minutos de incubação ao abrigo da luz e em temperatura ambiente, as células foram novamente centrifugadas, o sobrenadante foi descartado, foram adicionados 400µl de tampão de ligação e a leitura realizada por citometria de fluxo no citômetro BD FACSCalibur (Figura 11) (MUPPIDI; PORTER; SIEGEL, 2004).

**Figura 11:** Representação esquemática do ensaio de via de morte celular por apoptose/necrose em melanoma murino



**Fonte:** Elaborada pelo autor. Imagens retiradas do Google.

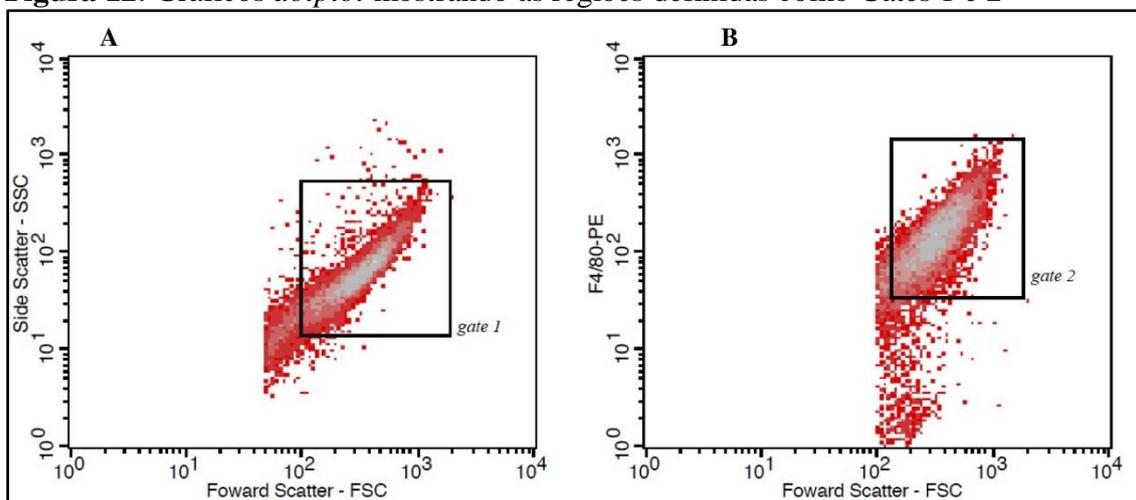
#### 4.4.2 Estratégia de seleção e identificação das populações de MDMO

Em todos os ensaios realizados em MDMO e analisados por citometria de fluxo foram utilizados os marcadores anti-F4/80-PE, anti-CD11b-FITC e anti-CD206-Alexa Fluor® 647 da marca Biolegend para identificá-los. A figura 12 mostra os gráficos do tipo *dotplot*. A população de células foi inicialmente selecionada conforme o tamanho e

complexidade citoplasmática indicados pelos detectores de dispersão frontal de luz *Forward Scatter* (FSC) e dispersão lateral de luz *Side Scatter* (SSC) respectivamente (*gate 1*). Para evitar a inclusão de restos celulares ou marcações não desejadas (*debris*) foram escolhidas as células que se apresentaram no gráfico com maiores tamanho e complexidade. A confirmação de que esta população selecionada no *gate 1* se tratava de macrófagos maduros confirmando a diferenciação celular, foi realizada por meio da construção de novo gráfico *dotplot* FSC vs anti-F4/80-PE, desta vez relacionando o tamanho das células com a positividade para o marcador anti-F4/80 (*gate 2*).

As estratégias anteriores precederam todas as análises para avaliação do fenótipo assumido pelos MDMO após serem postos em contato com a molécula 2, LPS e os Sobrenadantes A, B, C e D. Definidos os *gates 1* e 2, novos gráficos do tipo *dotplot* foram construídos e serão apresentados a seguir, relacionando os marcadores CD11b-FITC vs CD206--Alexa Fluor® 647 para identificarmos o fenótipo dos MDMO. Foram considerados macrófagos maduros em estado de repouso (M0) a população com F4/80+/CD11b-/CD206-, macrófagos com fenótipo M1 a população F4/80+/CD11b+/CD206- e macrófagos com fenótipo M2 a população F4/80+/CD11b-/CD206+.

**Figura 12:** Gráficos *dotplot* mostrando as regiões definidas como Gates 1 e 2



**Legenda:** (A) No *Gate 1* foi selecionada a população de células de acordo com o tamanho e complexidade (FSC vs. SSC). (B) O *Gate 2* representa as células F4/80+ e maior tamanho. Esta estratégia precedeu todas as demais análises por citometria de fluxo para os MDMO.

#### 4.4.2.1 Investigação de alterações fenotípicas em MDMO após exposição à molécula 2 e LPS

Os MDMO foram expostos à molécula 2 nas concentrações 33,17 $\mu$ M e 64,34 $\mu$ M, respectivamente as concentrações correspondentes a  $\frac{1}{4}$ EC50 e  $\frac{1}{2}$ EC50 calculadas a partir dos ensaios de citotoxicidade descrito no tópico 5.3. Como controle positivo para polarização ao fenótipo M1 foi utilizada solução de LPS extraído de *Escherichia coli* na concentração de 500ng/mL da marca Sigma-Aldrich adquirido comercialmente. Como controle negativo e para mantermos uma população no estado não polarizado M0 utilizamos apenas meio DMEM high glicose (Gibco, Carlsbad, CA) com 10% de SBF (LGC Biotecnologia Ltda.) e 1% de volume da solução contendo os antibióticos penicilina (200 UI/mL) e estreptomicina (130 mg/L) (LGC Biotecnologia Ltda.). Após os estímulos, as células foram submetidas a avaliação do fenótipo por citometria de fluxo empregando os marcadores anti-F4/80-PE, anti-CD11b-FITC e anti-CD206-Alexa Fluor® 647 de forma simultânea.

Com ajuda de um *cell scraper*, as células foram soltas da superfície da placa de cultura e adicionadas de 5mL de meio DMEM high glicose com 10% de SBF e 1% de antibiótico para formar uma suspensão celular e possibilitar a transferência para tubo Falcon para posterior centrifugação e contagem. O plaqueamento foi realizando em placas de 12 poços de fundo chato adicionando-se 500 $\mu$ L de solução de MDMO ficando cada poço com  $1 \times 10^6$  células. Em seguida as placas foram incubadas *overnight* em estufa com temperatura de  $37 \pm 0,3^\circ\text{C}$  e atmosfera com 5% de  $\text{CO}_2$ . As células foram então estimuladas com as soluções acima citadas através da adição de 500  $\mu$ L e incubação por 48h. Passado este tempo, os sobrenadantes foram coletados e armazenados para posterior dosagem de nitrito, TNF- $\alpha$  e IL-12. As células foram soltas da superfície de dos poços com a utilização do *cell scraper*, foi adicionado 1mL de PBS estéril para formar uma suspensão celular e possibilitar a transferência para tubos *ependorf*. Os tubos foram centrifugados por 5 min a 200 x g, o sobrenadante foi desprezado e foram feitas mais duas lavagens com o PBS estéril. A marcação das células foi então realizada pela adição de 10 $\mu$ L de solução com marcador anti-F4/80-PE, 5 $\mu$ L de solução com marcador anti-CD11b-FITC e 5 $\mu$ L de solução com anti-CD206-Alexa Fluor® 647 para cada 100 $\mu$ L de suspensão celular. Após 15 minutos de incubação ao abrigo da luz e em temperatura ambiente, as células foram novamente centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e

foram adicionados 100µl de PBS estéril para realização da leitura por citometria de fluxo no citômetro BD FACSCalibur (Figura 13) (YING et al., 2013).

#### 4.4.2.2 *Investigação de alterações fenotípicas em MDMO após estimulação com sobrenadante de melanoma murino*

Os MDMO foram estimulados com os sobrenadantes recolhidos do ensaio de via de morte celular realizado com a linhagem B16-F10 descrito no tópico 4.4.1, para simularmos o contato com produtos solúveis produzidos por estas células bem como com restos celulares decorrentes da exposição à molécula 2. Foram utilizados o Sobrenadante A, coletado dos grupos controle negativo onde foi empregado apenas o meio de cultura completo, e os Sobrenadantes B, C e D coletados dos três grupos expostos à molécula 2 nas concentrações 50,99µM, 76,48µM, 101,98µM respectivamente. Como controle negativo para este ensaio de estimulação dos MDMO utilizamos apenas meio DMEM high glicose (Gibco, Carlsbad, CA) com 10% de SBF (LGC Biotecnologia Ltda.) e 1% de volume da solução contendo os antibióticos penicilina (200 UI/mL) e estreptomicina (130 mg/L) (LGC Biotecnologia Ltda.)

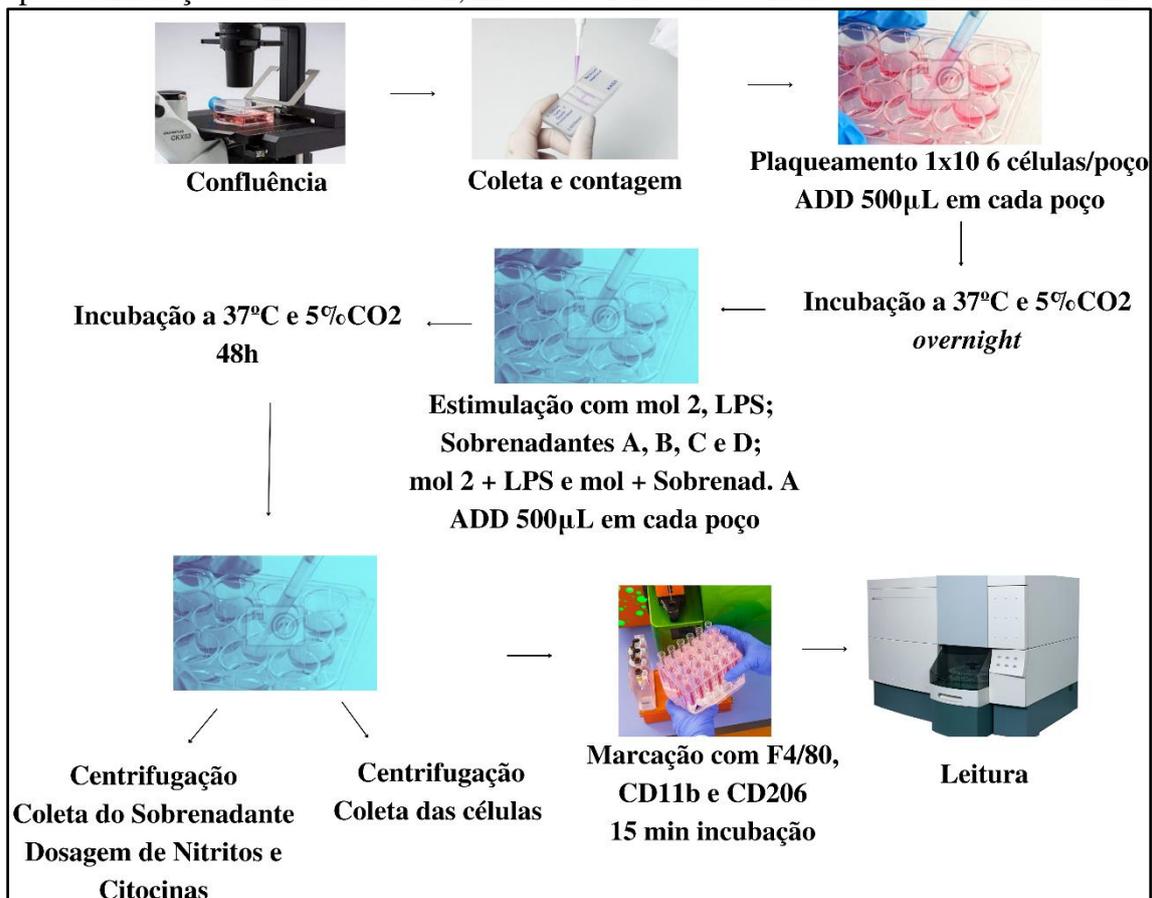
As etapas são semelhantes as do ensaio anterior descritas no tópico 4.4.2.1. As células foram plaqueadas em placas de 12 poços de fundo chato com densidade celular de  $1 \times 10^6$  células/poço e incubadas *overnight* em estufa com temperatura de  $37 \pm 0,3^\circ\text{C}$  e atmosfera com 5% de  $\text{CO}_2$ . Foram então estimuladas com os quatro grupos de sobrenadantes citados no parágrafo anterior e incubadas por 48h. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados para posterior dosagem de nitrito, TNF- $\alpha$  e IL-12. As células foram coletadas, transferidas para tubos *ependorf* e submetidas as etapas de centrifugação, lavagens com PBS estéril e marcação com anti-F4/80-PE, anti-CD11b-FITC e anti-CD206-Alexa Fluor® 647. Após 15 minutos de incubação ao abrigo da luz e em temperatura ambiente, as células foram novamente centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 100µL de PBS estéril para realização da leitura por citometria de fluxo no citômetro BD FACSCalibur (Figura 13) (YING et al., 2013).

#### 4.4.2.3 *Investigação de alterações fenotípicas em MDMO após estimulação pelo conjunto molécula 2 + sobrenadante A e molécula 2 + LPS.*

Os MDMO foram ainda estimulados pelos conjuntos molécula 2 + Sobrenadante A e molécula 2 + LPS com o objetivo de compará-los com os resultados obtidos nos

ensaios que empregaram as substâncias de forma isolada e assim verificar a existência de interações potencializadoras ou inibitórias. Foram preparadas soluções de modo que as concentrações da molécula 2 fossem 33,17 $\mu$ M ( $\frac{1}{4}$  EC<sub>50</sub>) e 64,34 $\mu$ M ( $\frac{1}{2}$  EC<sub>50</sub>) no Sobrenadante A em relação ao volume final dos poços. Também foram preparadas soluções da molécula 2 em meio de cultura de modo que suas concentrações ficassem também em 33,17 $\mu$ M e 64,34 $\mu$ M e do LPS em 500ng/mL em relação ao volume final dos poços. Como controle negativo utilizamos apenas meio DMEM high glicose com 10% de SBF e 1% de antibiótico. Destas soluções contendo os conjuntos de estimulação, foram adicionados 500 $\mu$ L após incubação *overnight*. As etapas seguintes são semelhantes as do tópico 5.4.2.1. e todas as células foram submetidas a avaliação do fenótipo por citometria de fluxo empregando os marcadores anti-F4/80-PE, anti-CD11b-FITC e anti-CD206-Alexa Fluor® 647 de forma simultânea (Figura 13).

**Figura 13:** Representação esquemática do ensaio de avaliação do fenótipo dos MDMO após estimulação com a molécula 2, LPS e Sobrenadantes oriundos de melanoma murino

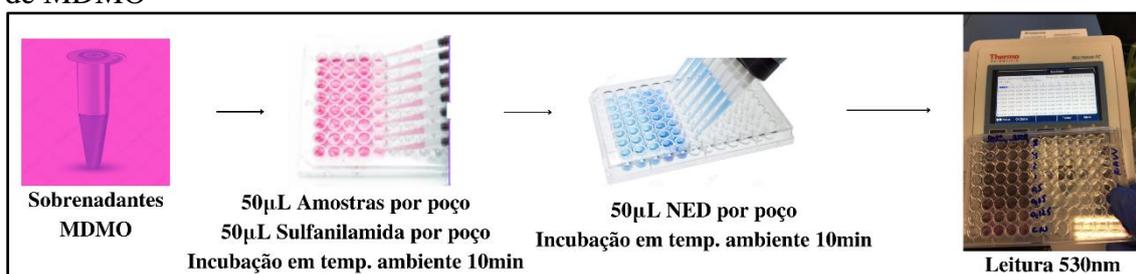


**Fonte:** Elaborado pelo autor. Imagens retiradas do Google.

#### 4.5 Dosagem de nitrito no sobrenadante celular

A quantificação de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) foi realizada pelo método colorimétrico de GRIESS (Promega Corporation, WI, USA) nos sobrenadante dos MDMO recolhidos dos ensaios descritos nos tópicos 5.4.2.1, 5.4.2.2 e 5.4.2.3. Por se tratar de uma molécula mais estável e menos volátil que NO, a quantificação de  $\text{NO}_2^-$  é uma maneira comum de se investigar indiretamente a formação do NO (ZAHEDI ASL; GHASEMI; AZIZI, 2008). O ensaio foi realizado conforme instruções do fabricante, a sensibilidade do kit foi de  $2,5\mu\text{M}$ . A curva padrão foi confeccionada utilizando uma solução padrão de  $100\mu\text{M}$  de  $\text{NaNO}_2$  inclusa no kit, seguida de diluições seriadas (50; 25; 12,5; 6,25; 3,125, 1,56 e  $0\mu\text{M}$ ). As soluções de sulfanilamida em meio ácido e solução de dicloridrato de N-(1-naftiletilenodiamina) (NED), também inclusas no kit, foram deixadas em temperatura ambiente por 30 min antes do início da pipetagem.  $50\mu\text{l}$  dos padrões e amostras foram adicionados em poços de placa de fundo chato de 96 poços seguidos da adição de  $50\mu\text{l}$  da solução de sulfanilamida e incubação por 10 min, temperatura ambiente e proteção da luz. Na etapa seguinte,  $50\mu\text{l}$  da solução NED foram adicionados em cada poço e novamente incubados por 10 min, temperatura ambiente e proteção da luz. Finalizada esta etapa, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a  $530\text{nm}$ . Os valores das absorvâncias dos padrões e amostras foram subtraídos do valor do branco e plotados em curva padrão, os resultados foram expressos em micromolar de  $\text{NO}_2^-$  (Figura 14) (GATELY; CHIZZONITE; PRESKY, 2001; MICHELE HOGAN; VOGEL, 2017).

**Figura 14:** Representação esquemática do ensaio de dosagem de nitrito em sobrenadantes de MDMO



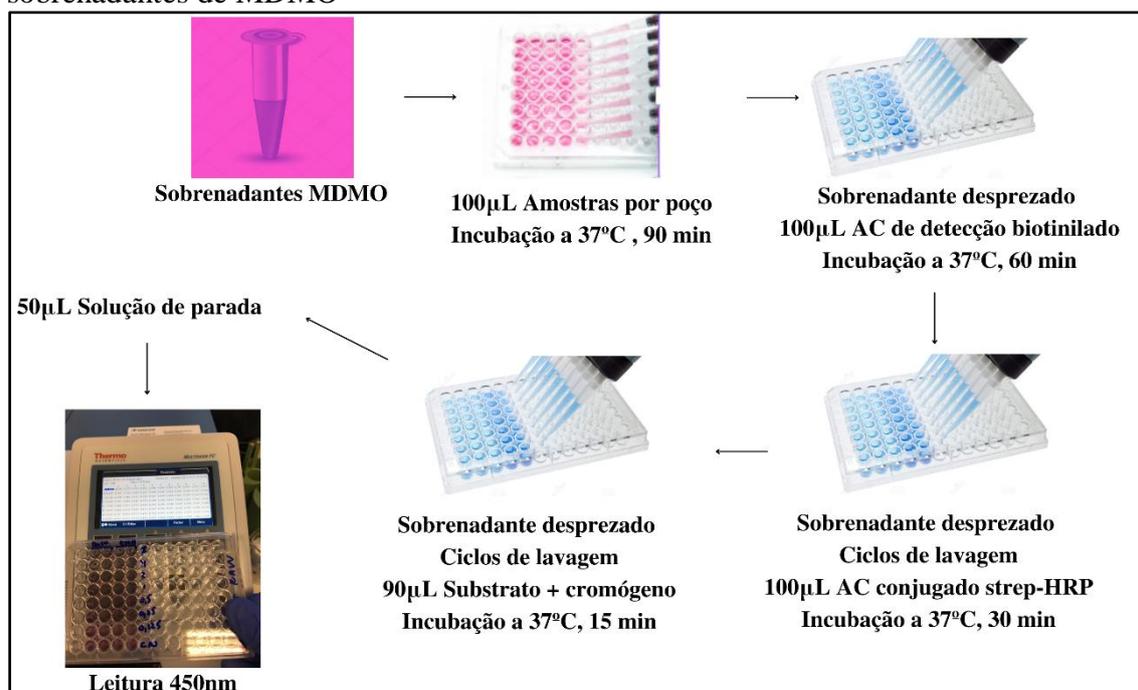
Fonte: Elaborado pelo autor. Imagens retiradas do Google.

#### 4.6 Dosagem de citocinas

A quantificação das citocinas  $\text{TNF-}\alpha$  e IL-12 foi realizada nos sobrenadante dos MDMO recolhidos nos ensaios descritos nos tópicos 5.4.2.1, 5.4.2.2 e 5.4.2.3, por ELISA utilizando kits da marca MyBioSource conforme instruções do fabricante. O ensaio foi

realizado conforme instruções do fabricante, a sensibilidade do kit foi de 9,38pg/mL e o intervalo de detecção entre 15,63 – 1000pg/mL. A curva padrão foi confeccionada utilizando uma solução padrão de 1000pg/mL seguida de diluições seriadas (500; 250; 125; 62,5; 31,25, 15,6 e 0pg/mL). Todos os reagentes e amostras foram deixados em temperatura ambiente por 30 minutos antes do início do ensaio. Na primeira etapa, 100µl dos padrões e das amostras foram adicionados aos poços já sensibilizados de fábrica com os anticorpos direcionados às citocinas de interesse e incubados por 90 min a 37°C. Em seguida, o sobrenadante foi aspirado e 100µl do anticorpo de detecção biotilado foram adicionados com posterior incubação por 60 min a 37°C. Os sobrenadantes foram aspirados e descartados, os poços foram lavados com solução tampão de lavagem e foram adicionados 100µl de solução do conjugado streptavidina-HRP seguida de 30 min de incubação a 37°C. Os sobrenadantes foram aspirados e descartados, houve nova etapa de lavagem e adição de 90µl da solução do substrato + cromógeno seguida por incubação por 15 min a 37°C. Por fim, foram adicionados 50µl de solução de parada da reação e a leitura realizada em espectrofotômetro em 450nm. Os valores das absorbâncias dos padrões e amostras foram subtraídos do valor do branco e plotados em curva padrão, os resultados foram expressos em picogramas de citocinas por mililitro de sobrenadante (Figura 15).

**Figura 15:** Representação esquemática do ensaio de dosagem de TNF- $\alpha$  e IL-12 em sobrenadantes de MDMO



**Fonte:** Elaborado pelo autor. Imagens retiradas do Google.

#### **4.7 Análise estatística**

Os dados numéricos foram expressos como médias de valores  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Para comparação dos grupos experimentais foram utilizados os testes estatísticos *one-way* ANOVA e *two-way* ANOVA seguido de pós-teste de Dunnet ou pós-teste de Bonferroni, considerando  $*p < 0,05$  como critério de significância para os ensaios de citotoxicidade e  $*p < 0,001$  como critério de significância para os ensaios de citometria, dosagem de nitrito, TNF- $\alpha$  e IL-12. Para a realização dos testes, foram utilizados os programas *Microsoft Office Excel*® 2016 e *GraphPad Prism*® versão 8.0.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Derivados sintéticos 1,2,4-oxadiazol foram capazes de diminuir a viabilidade em células de linhagem

Iniciamos nosso estudo com a proposta de avaliar o efeito citotóxico causado pelo grupo de moléculas apresentadas na Tabela 1 em quatro linhagens, HCT-116, PC-3, SNB-19 e RAW264.7, através de ensaios *in vitro* pelo método colorimétrico do MTT. Esta etapa foi considerada como uma triagem para as moléculas. No presente estudo seria inviável seguir os ensaios propostos avaliando todas as moléculas, portanto foi escolhida a mais promissora delas de acordo com critérios elencados no decorrer do estudo.

As porcentagens de inibição para a concentração de 100µM estão apresentadas na Tabela 2. Todos os compostos apresentaram atividade antiproliferativa em pelo menos uma das linhagens celulares. Em alguns casos, não foi possível determinar a porcentagem de inibição de crescimento devido ausência de reprodutibilidade dos ensaios. Porcentagens de inibição de crescimento acima de 90% foram observadas após exposição à molécula VN 158 na linhagem RAW 264.7, VN 162 nas linhagens HCT-116 e RAW 264.7 e molécula 2 nas linhagens HCT-116 e PC-3.

**Tabela 2:** Porcentagens de inibição de crescimento após 72h de exposição aos derivados sintéticos 1,2,4-oxadiazol em concentração fixa de 100 µM.

	<b>HCT-116</b>	<b>PC-3</b>	<b>SNB-19</b>	<b>RAW 264.7</b>
<b>VN 147</b>	73,75 71,26 - 76,24	42,55 38,98 - 46,16	49,28 47,05 - 51,51	ND
<b>VN 148</b>	50,43 47,17 - 53,69	51,35 47,97 - 54,73	33,86 30,56 - 36,16	ND
<b>VN155</b>	55,69 49,54 - 61,84	47,53 43,53 - 51,53	52,96 50,34 - 55,58	ND
<b>VN157</b>	ND	ND	ND	73,57 64,58 - 82,56
<b>VN 158</b>	88,35 85,83 - 90,87	69,07 67,48 - 70,66	55,99 53,37 - 58,61	<b>97,88</b> 97,50 - 98,26
<b>VN 162</b>	<b>98,41</b> 94,26 - 102,56	80,79 73,49 - 88,09	ND	<b>99,53</b> 98,86 - 100,20
<b>VN 164</b>	20,43 16,86 - 24,00	29,40 23,51 - 35,29	ND	ND
<b>VN 181</b>	45,27 39,65 - 50,89	50,20 42,86 - 57,54	41,89 38,59 - 45,09	ND
<b>VN 185</b>	80,75 77,82 - 83,68	72,07 66,02 - 78,16	67,06 65,45 - 68,67	81,21 76,55 - 85,87
<b>VN187</b>	76,44 73,37 - 79,51	73,09 66,48 - 79,70	62,68 61,32 - 64,04	ND
<b>molécula 2</b>	<b>97,04</b>	<b>90,20</b>	65,34	51,36

	96,26 – 97,82	89,00 – 91,40	59,71 – 70,97	42,17 – 60,55
--	---------------	---------------	---------------	---------------

**Legenda:** ND = Não Determinado. Os dados foram expressos como média da porcentagem de inibição  $\pm$  EPM e avaliados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnet \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle. Os dados foram obtidos a partir de 3 experimentos independentes realizados em duplicata.

Os valores da concentração inibitória média para inibir o crescimento de 50% da população celular ( $IC_{50}$ ) e da concentração efetiva média para inibir o crescimento de 50% da população celular ( $EC_{50}$ ) foram determinados também pelo método colorimétrico do MTT. Foram utilizadas seis concentrações variadas decrescentes das moléculas para o cálculo: 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125  $\mu$ M. Foram excluídas do cálculo as moléculas da Tabela 1 cujas porcentagens de inibição não foram determinadas. De forma geral, a linhagem SNB-19 se mostrou a mais resistente frente às moléculas e concentrações testadas, apresentando os maiores valores para a  $IC_{50}$  quando comparado as outras linhagens. Valores de  $IC_{50}$  inferiores a 50  $\mu$ M (destacados em amarelo) foram observados em HCT-116 e PC-3 após exposição às moléculas VN 158, VN 162, VN 185 e molécula 2. Ainda sobre a molécula 2, foi observado um valor de  $EC_{50}$  de 122,9  $\mu$ M (destacado em azul) na linhagem RAW264.7, indicando uma menor sensibilidade a ela quando comparada com as outras moléculas testadas. Todos os valores de  $IC_{50}$  e  $EC_{50}$  estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3:** Valores de  $IC_{50}$  e  $EC_{50}$  expressos em  $\mu$ M após 72h de exposição aos derivados sintéticos 1,2,4-oxadiazol

	HCT-116	PC-3	SNB-19	RAW 264.7
<b>VN 147</b>	56,43 50,5 – 63,39	107,6 82,03 – 161,1	94,48 80,16 – 117,6	ND
<b>VN 148</b>	107,8 83,52 – 157,2	89,37 68,26 – 133,1	274,3 135,0 – 1751,0	ND
<b>VN155</b>	70,62 50,69 – 116,5	84,89 61,75 – 136,4	95,18 74,33 – 138,3	ND
<b>VN157</b>	ND	ND	ND	33,19 22,96 – 52,27
<b>VN 158</b>	43,93 34,89 – 55,42	51,62 44,24 – 61,09	83,72 53,79 – 125,3	53,8 43,02 – 64,56
<b>VN 162</b>	35,67 30,61 – 41,27	49,04 41,81 – 57,68	ND	44,97 37,95 – 52,49
<b>VN 164</b>	ND	ND	ND	ND
<b>VN 181</b>	109,04 70,73 – 241,8	74,37 55,27 – 113,0	124,8 100,4 – 170,9	ND
<b>VN 185</b>	35,27 27,08 – 46,81	50,64 42,64 – 60,89	68,01 59,65 – 78,77	57,25 43,55 – 73,15
<b>VN187</b>	53,78 41,07 – 74,94	58,12 48,78 – 70,28	79,5 69,45 – 95,06	ND
<b>molécula 2</b>	45,41 38,75 – 52,25	46,04 37,47 – 56,81	79,42 72,33 – 87,90	122,9 82,82 – 272,2

**Legenda:** ND = Não Determinado. Os dados foram expressos como valores médios de IC<sub>50</sub> e EC<sub>50</sub> ± EPM e avaliados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnet. \*p<0,05 em relação ao grupo controle. Os dados foram obtidos a partir de 3 experimentos independentes realizados em duplicata.

Com os valores de IC<sub>50</sub> e EC<sub>50</sub>, calculamos os índices de seletividade (IS) para as quatro moléculas previamente citadas com valor de IC<sub>50</sub> menor que 50µM. O IS reflete a seletividade de uma molécula para determinada linhagem tumoral em relação a uma linhagem não tumoral e é definido como a relação entre o valor de EC<sub>50</sub> da molécula testada obtida da linhagem não tumoral, dividido pelo valor de IC<sub>50</sub> da mesma molécula testada obtida da(s) linhagem(s) tumoral(s).

As células da linhagem RAW 264.7 são macrófagos originários de tumores murinos induzidos pelo vírus de leucemia murino Abelson. Apesar da origem tumoral, a utilização desta linhagem como modelo de macrófago é bastante aceita, incluindo cálculos de IS, então a consideramos como a linhagem não tumoral (TACIAK *et al.*, 2018). A molécula 2 apresentou os maiores valores IS (destacados em amarelo) indicando uma atividade antiproliferativa mais seletiva para as linhagens tumorais testadas em relação a linhagem não tumoral. Todos os valores de IS estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 4:** Valores do IS.

	<b>HCT-116</b>	<b>PC-3</b>	<b>SNB-19</b>
<b>VN 158</b>	1,22	1,04	0,64
<b>VN 162</b>	1,26	0,92	ND
<b>VN 185</b>	1,62	1,13	0,84
<b>molécula 2</b>	<b>2,70</b>	<b>2,67</b>	<b>1,55</b>

**Legenda:** ND = Não Determinado

Como conclusão desta etapa de triagem dos derivados sintéticos 1,2,4-oxadiazol, escolhemos a molécula 2 para prosseguirmos com os demais ensaios. Nossa escolha levou em consideração os valores encontrados para as porcentagens de inibição, IC<sub>50</sub> e EC<sub>50</sub> e o maior índice de seletividade que está molécula apresentou. Além de que está mesma molécula havia sido objeto de estudo em outros trabalhos do nosso grupo de pesquisa apresentando propriedades antitumorais, antimicrobianas e antiparasitárias (DE OLIVEIRA *et al.*, 2018; DE OLIVEIRA *et al.*, 2021; ROCHA *et al.*, 2022).

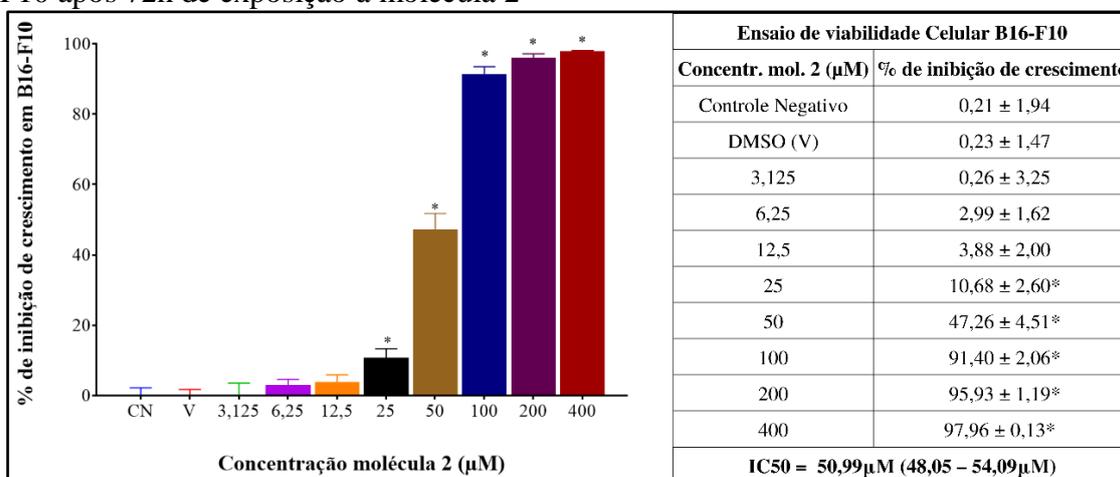
Nesta etapa também definimos que o trabalho seguiria investigando o potencial da molécula 2 em duas frentes biologicamente relacionadas entre si, sua ação imunomoduladora em macrófagos e a sua ação antitumoral em outra linhagem tumoral. MDMO substituíram a linhagem RAW 264.7, apesar de terem o fenótipo e funções similares, a linhagem RAW 264.7 pode apresentar alterações à medida que as células são

continuamente cultivadas (SERRANO CARDONA; MUÑOZ MATA, 2013). A linhagem B16-F10 de melanoma foi a escolhida por também ser oriunda de murino, pela agressividade deste tipo de câncer vista nos dados epidemiológicos apresentados pelo INCA e pelo fato de que o manejo terapêutico do melanoma avançado mais recente aprovado pelo FDA empregar os imunoterápicos interferon- $\alpha$  2b, Vemurafenib e Ipilimumab (CÂNCER, 2023; LEE; MUKHI; LIU, 2012).

## 5.2 A molécula 2 foi capaz de diminuir a viabilidade da linhagem celular de melanoma murino

Para avaliarmos se a molécula 2 teria ação citotóxica também em melanoma murino e, por conseguinte determinar as porcentagens de inibição e valor de IC<sub>50</sub>, realizamos ensaios *in vitro* na linhagem B16-F10 pelo método colorimétrico do MTT. As células foram expostas a concentrações variadas e decrescentes da molécula 2 quais sejam 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125 $\mu$ M. Julgamos necessário aumentar as concentrações aqui empregadas para padronizar com as utilizadas no ensaio de citotoxicidade realizado em MDMO mostrado a seguir. O valor de 122,9 $\mu$ M obtido para a IC<sub>50</sub> em macrófagos da linhagem RAW 264.7 norteou nossa decisão e o objetivo deste ajuste foi obter dados que facilitassem os cálculos das porcentagens de inibição e IC<sub>50</sub>. Analisando os dados apresentados na Figura 16, é possível observar que a molécula 2 foi capaz de inibir o crescimento de B16-F10 de maneira dose-dependente em concentrações acima de 50 $\mu$ M. O valor de IC<sub>50</sub> calculado foi de 50,99 $\mu$ M (48,05 – 54,09 $\mu$ M). Não houve inibição de crescimento por parte do veículo cuja concentração testada foi de 0,4%.

**Figura 16:** Porcentagens de inibição de crescimento e valor de IC<sub>50</sub> de linhagem B16-F10 após 72h de exposição à molécula 2

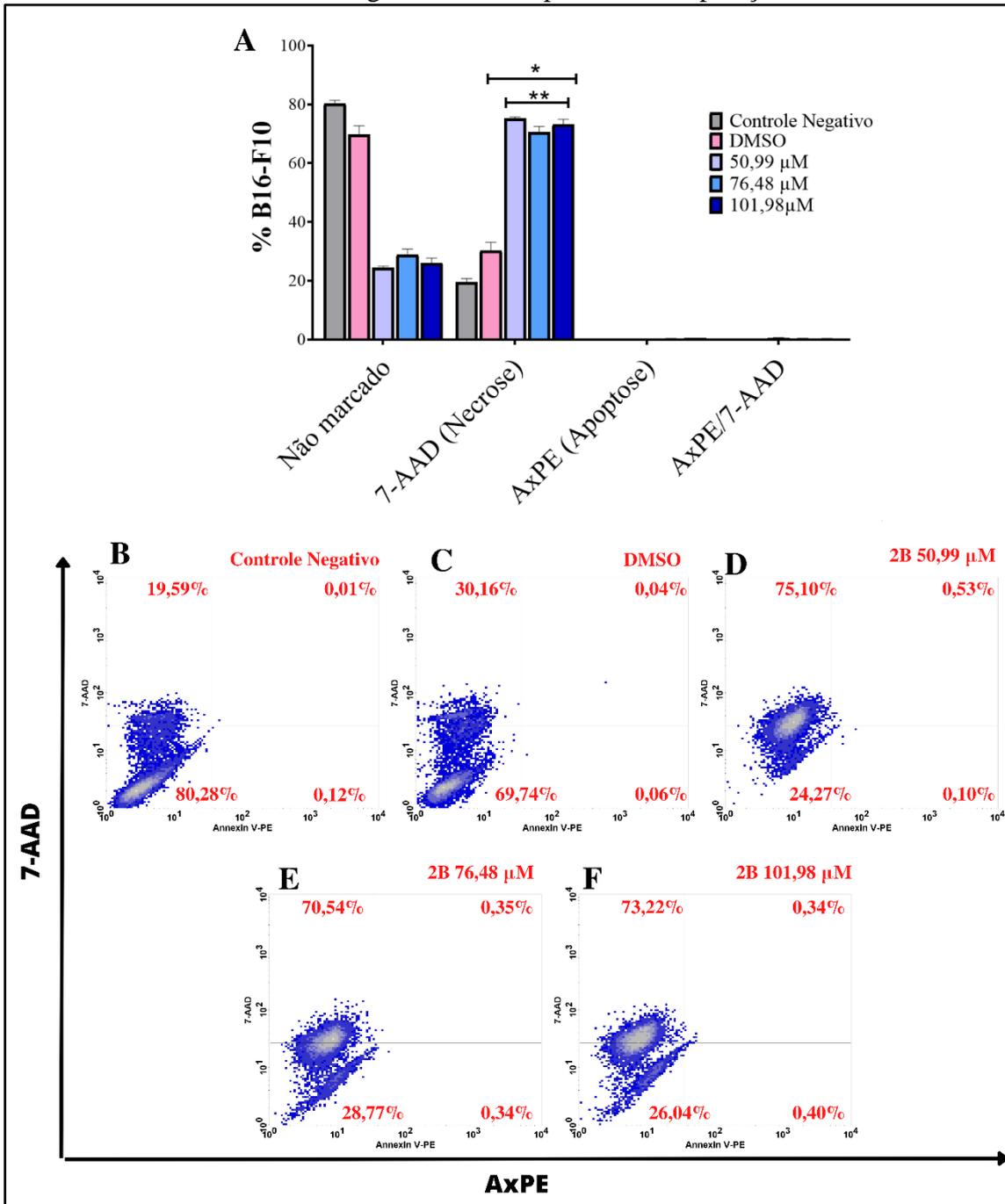


**Legenda:** CN = grupo controle negativo; V = DMSO. Os dados foram expressos como média da porcentagem de inibição de crescimento  $\pm$  EPM e avaliados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnet. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle. Os dados foram obtidos a partir de 3 experimentos independentes realizados em duplicata.

### **5.3 A molécula 2 causou morte por necrose em melanoma murino**

Conhecidos a ação citotóxica e o valor de  $IC_{50}$  para a molécula 2 em B16-F10, utilizamos a citometria de fluxo para avaliarmos a via de morte celular envolvida, entre apoptose e necrose, através dos marcadores AxPE e 7-AAD. O ensaio foi desenvolvido após exposição por 48h à molécula 2 nas concentrações de 50,99 $\mu$ M, 76,48 $\mu$ M e 101,98 $\mu$ M, respectivamente os valores de  $IC_{50}$ , 1,5 x  $IC_{50}$  e 2 x  $IC_{50}$ . Foi possível identificar aumento porcentual significativo de marcação para o corante 7-AAD nas três concentrações utilizadas, respectivamente da menor para a maior 75,10%, 70,54% e 73,22%, quando comparadas com o controle negativo,. Entre si, estes valores não apresentaram diferenças. Também não foram observadas diferenças entre os grupos marcados apenas por AxPE e 7-AAD/AxPE (Figura 17).

**Figura 17:** Porcentagens de células marcadas com AxPE/7-AAD em ensaio de via de morte celular realizado em linhagem B16-F10 após 48h de exposição à molécula 2

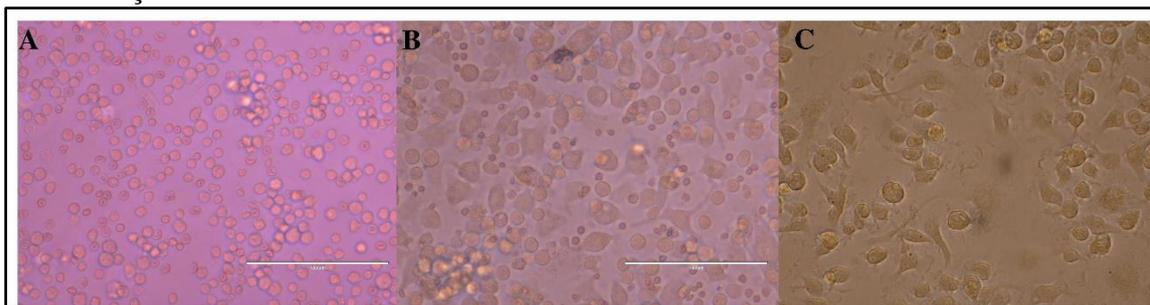


**Legenda:** 50,99 $\mu$ M = IC<sub>50</sub>, 76,48 $\mu$ M = 1,5 x IC<sub>50</sub> e 101,98  $\mu$ M = 2 x IC<sub>50</sub>. (A) Gráfico de barras indicando a porcentagem de células não marcadas, marcadas por 7-AAD e/ou marcadas por AxPE. (B-F). Gráfico *dotplot* mostrando o comportamento e porcentagens de marcação de cada grupo. Os dados foram expressos como média das porcentagens de marcação  $\pm$  EPM e avaliados por *two-way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni. \*p<0,001 em relação ao grupo controle negativo; \*\*p<0,001 em relação ao grupo DMSO. Os dados foram obtidos a partir de 2 experimentos independentes realizados em duplicata.

#### 5.4 Macrófagos foram obtidos de células imaturas da medula óssea de camundongos

Os MDMO foram o produto final das etapas de coleta e diferenciação de células imaturas da medula óssea de camundongos C57BL/6. A Figura 18 mostra as alterações na morfologia celular decorrentes do processo de maturação de células multipotentes em macrófagos maduros. A Figura 18A apresenta células imaturas no dia em que foram coletadas, é possível observar populações heterogêneas com grande variação entre os volumes, homogeneidade do conteúdo citoplasmático, ausência de projeções citoplasmáticas, morfologia arredondada e presença de hemácias em número expressivo. A Figura 18B refere-se ao quarto dia de diferenciação, já é possível observar transições decorrentes deste processo. A variação do volume celular tende a diminuir deixando a população com aspecto mais homogêneo, há perda da homogeneidade citoplasmática, algumas células passam a apresentar morfologia ovalada com emissão das primeiras projeções citoplasmáticas e o número de hemácias sofre decréscimo. A Figura 18C refere-se ao sétimo e último dia do processo de diferenciação, observamos células com volumes pequenos e semelhantes, população homogênea, os citoplasmas são heterogêneos, morfologia fusiforme com grande quantidade de projeções citoplasmáticas, crescimento espraído e ausência de total de hemácias.

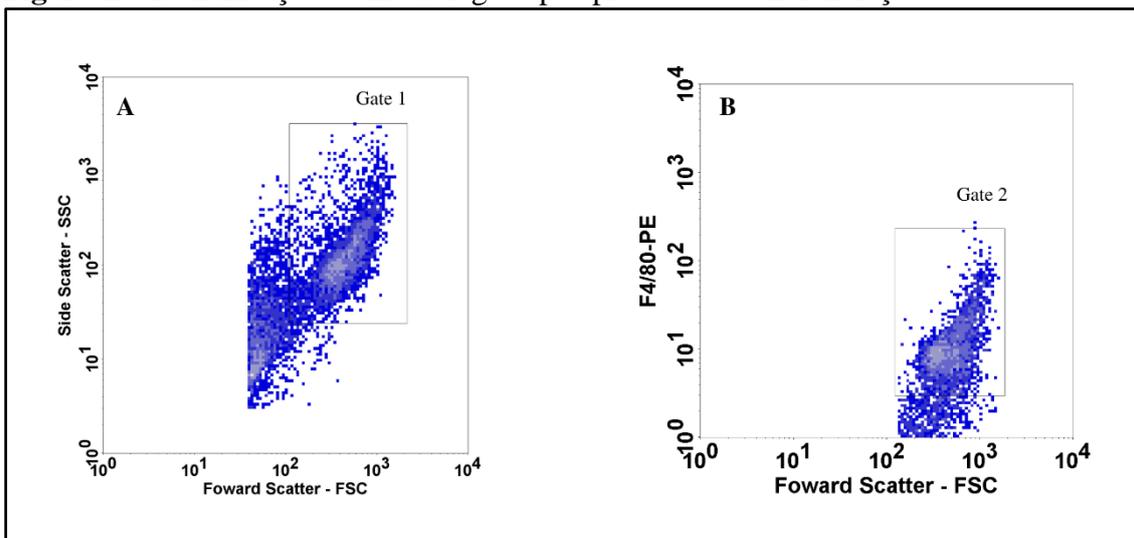
**Figura 18:** Células coletadas da medula óssea de camundongos durante processo de diferenciação de MDMO em diferentes dias



**Legenda:** Células da medula óssea de camundongos C57BL/6 em cultura durante processo de diferenciação celular em macrófagos maduros. (A, B, C) Respectivamente, primeiro, quarto e sétimo dia em cultura com meio de diferenciação. Fotos com aumento de 400x

Além das observações microscópicas, a confirmação de que se tratavam de MDMO foi realizada pela marcação com anti-F4/80-PE para análise por citometria de fluxo. Na Figura 19 é possível observar a população de células avaliada, o gráfico FSC vs F4/80-PE nos indica marcação positiva para F4/80, confirmando que completaram com sucesso a diferenciação.

**Figura 19:** Identificação de macrófagos após processo de diferenciação

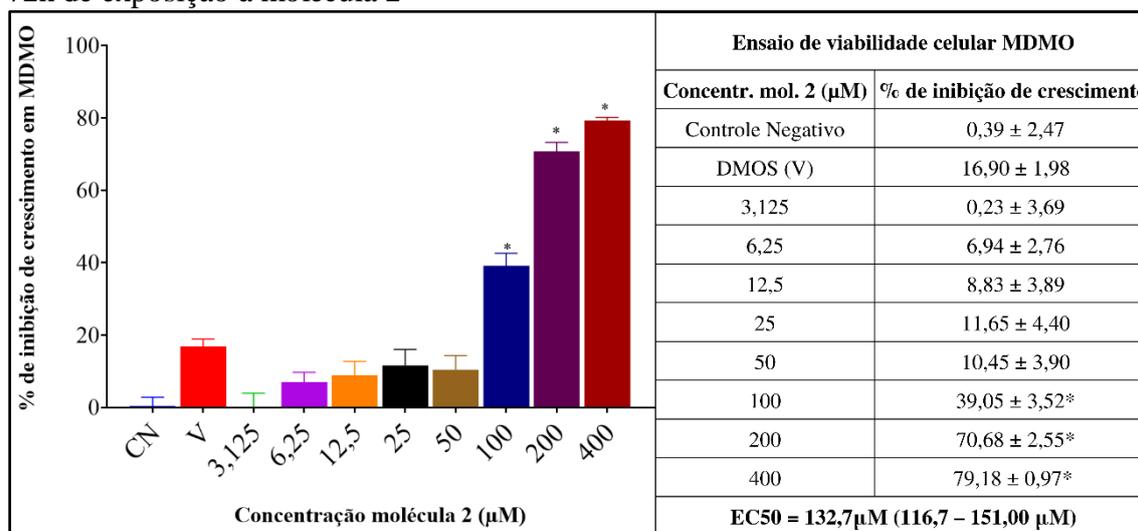


**Legenda:** *Gates* 1 contém a população de células analisadas e *Gate* 2 confirma a diferenciação de células imaturas da medula óssea em macrófagos maduros pela marcação positiva para F4/80.

### 5.5 MDMO são menos sensíveis que melanoma murino ao efeito citotóxico da molécula 2

A fim de avaliarmos se a molécula 2 teria ação citotóxica em MDMO e consequentemente determinar as porcentagens de inibição e valor de EC<sub>50</sub>, realizamos ensaios *in vitro* pelo método colorimétrico do MTT. As células foram tratadas com concentrações variadas e decrescentes da molécula 2 quais sejam 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125µM. Na Figura 20 é possível observar que a molécula 2 foi capaz de inibir o crescimento de MDMO de maneira dose-dependente em concentrações acima de 100µM. O valor de EC<sub>50</sub> calculado foi de 132,7µM (116,7 – 151,0µM). A concentração percentual testada do veículo (DMSO) foi igual da maior concentração da molécula 2, 0,4% no poço. Este grupo apresentou leve redução na viabilidade celular. Apesar disto, é possível inferir que a maior contribuição para o efeito citotóxico é proveniente da molécula 2, visto que, há uma diferença de mais de 60 pontos percentuais entre a inibição provocada pelo veículo e a inibição provocada pela molécula 2 em sua maior concentração.

**Figura 20:** Porcentagens de inibição de crescimento e valor de EC50 de MDMO após 72h de exposição à molécula 2



**Legenda:** CN = grupo controle negativo; V = grupo veículo (DMSO). Os dados foram expressos como média da porcentagem de inibição de crescimento ± EPM e avaliados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnet. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle. Os dados foram obtidos a partir de 3 experimentos independentes realizados em duplicata.

De posse dos valores de  $IC_{50}$  para a linhagem B16-F10 e  $EC_{50}$  para os MDMO, o IS foi calculado para estimar a seletividade da molécula 2. O resultado nos indicou uma seletividade de 2,6 vezes para as células tumorais em relação aos macrófagos. A Tabela 5 traz um comparativo entre as duas linhagens em relação as porcentagens de inibição,  $IC_{50}$  e  $EC_{50}$  e IS.

**Tabela 5:** Porcentagens de inibição, valores de  $IC_{50}$  e  $EC_{50}$  e IS após 72h de exposição melanoma murino e MDMO à molécula 2

	<b>B16-F10</b>	<b>MDMO</b>	<b>IS</b>
<b>% Inibição (100μM)</b>	91,4%	39,05%	---
<b><math>IC_{50}</math> e <math>EC_{50}</math> (μM)</b>	50,99 48,05 – 54,09	132,7 116,7 – 151,0	2,60

### 5.6 A molécula 2 polarizou os MDMO para o fenótipo M1 e induziu a produção de TNF- $\alpha$

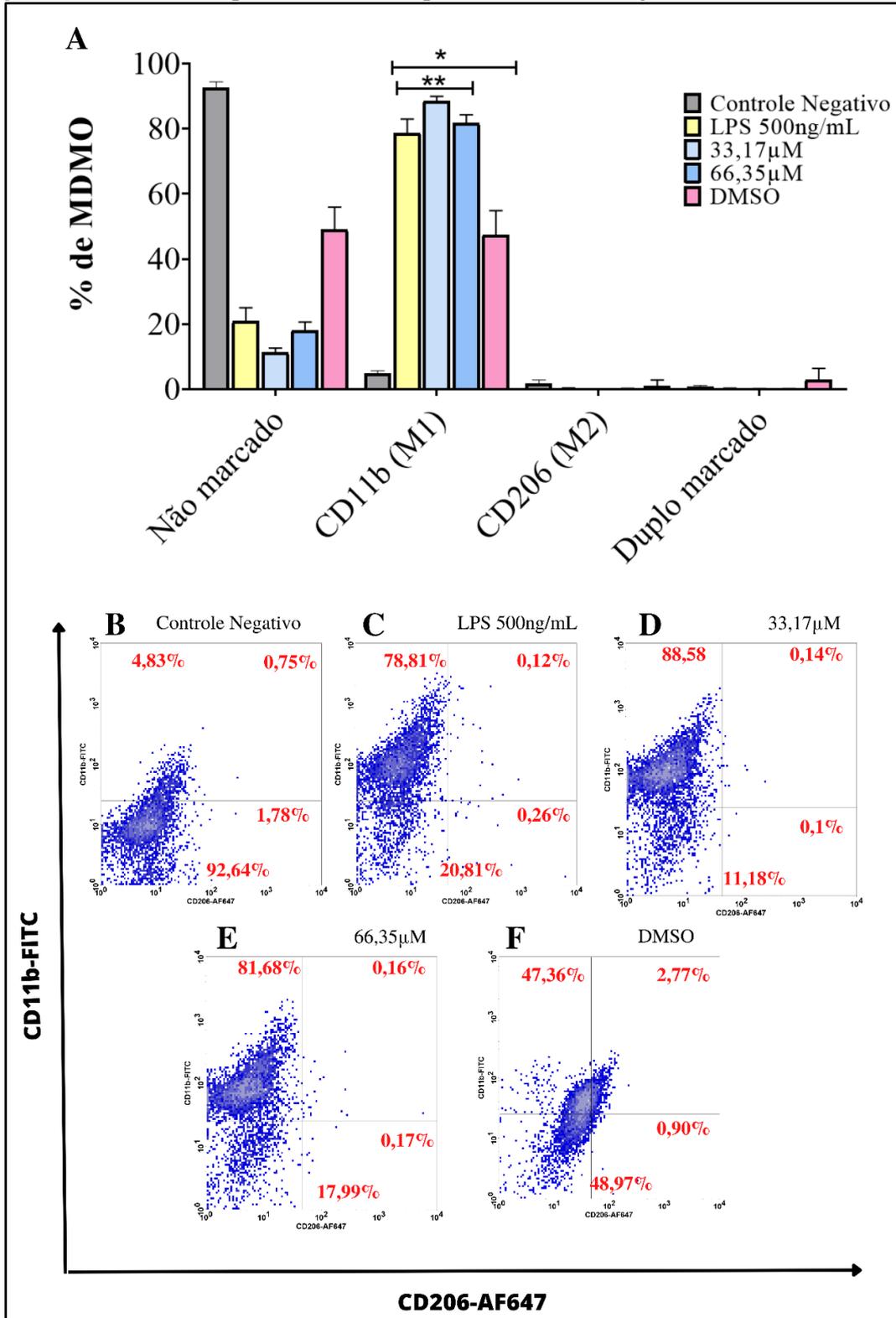
Utilizando a citometria de fluxo e os marcadores anti-F4/80-PE, anti-CD11b-FITC e anti-CD206-Alexa Fluor® 647, MDMO foram avaliados quanto a sua ativação e consequente alteração fenotípica adquirida. Os MDMO foram estimulados com 33,17μM e 66,35μM da molécula 2, que correspondem respectivamente a  $\frac{1}{4}EC_{50}$  e  $\frac{1}{2}EC_{50}$ , e 500ng/mL de LPS. No controle negativo foi adicionado somente meio de cultura

completo. As populações de células foram escolhidas conforme os *gates* definidos previamente no tópico 5.4.2.

Nos nossos ensaios foi possível observar grande porcentagem de células estimuladas pelo LPS com marcação positiva para CD11b. Similar a isto, as duas concentrações da molécula 2 testadas também apresentaram expressiva marcação para CD11b, superior a 80%, indicando um aumento da expressão desta glicoproteína característica de macrófagos ativados pela via clássica, fenótipo M1. O grupo veículo, em que o DMSO foi o estímulo usado, também apresentou marcação positiva para o CD11b em cerca de 48% dos macrófagos, entretanto ao observarmos as porcentagens que representam as marcações CD11b nos grupos LPS e molécula 2, podemos observar que são bem maiores, o que nos leva a crer que o efeito polarizante principal é decorrente destes estímulos. Portanto, para os próximos ensaios de fenotipagem, dosagem de nitrito, TNF- $\alpha$  e IL-12, o DMSO não foi avaliado. Todos os dados estão apresentados na Figura 21.

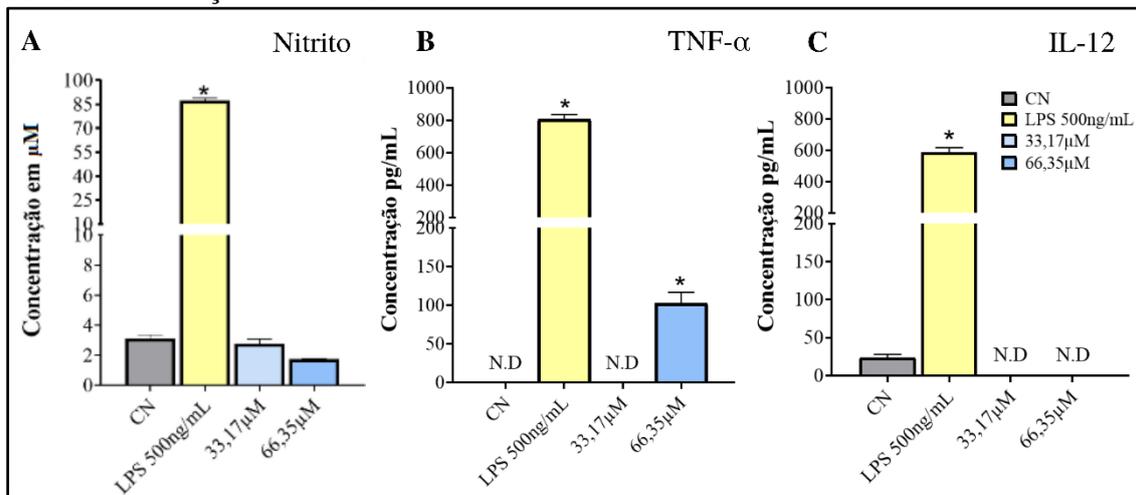
Nos sobrenadantes dos grupos LPS e molécula 2 foram realizadas dosagens para em busca de quantificar a quantidade de nitrito, TNF- $\alpha$  e IL-12, subprodutos da ativação pela via clássica. Os dados estão apresentados na Figura 22. O ensaio para dosagem de nitrito é bastante utilizado para se estimar de forma indireta a produção do NO. Como esperado, no grupo estimulado com LPS houve grande produção de nitrito, o valor quantificado foi de 87,44 $\mu$ M. Já para a molécula 2, em nenhuma das duas concentrações avaliadas houve produção significativa. Para o TNF- $\alpha$  e IL-12, o grupo estimulado com LPS foi capaz de produzir grandes quantidades destas citocinas pró-inflamatórias, 806,30 e 585,48pg/mL respectivamente. Comparando com os grupos estimulados pela molécula 2, detectamos 102,75pg/mL de TNF- $\alpha$  apenas na maior concentração, e em relação ao IL-12 não houve detecção para ambas concentrações.

**Figura 21:** Perfil fenotípico de MDMO após 48h de estimulação com LPS e molécula 2



**Legenda:** Controle negativo apenas com meio de cultura. 33,17µM = ¼ EC<sub>50</sub> e 66,35 µM = ½ EC<sub>50</sub> da molécula 2. (A) Gráfico de barras indicando as porcentagens de MDMO não marcado por CD11b (M1) e marcado por CD206 (M2) e duplo marcado. (B-F) gráfico do tipo *dotplot* mostrando o comportamento e porcentagens de marcação de cada grupo. Os dados foram expressos como média das porcentagens de marcação ± EPM avaliados por *two-way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni. \*p<0,001 em relação ao grupo controle negativo; \*\*p<0,001 em relação ao grupo DMSO. Os dados foram obtidos a partir de 2 experimentos independentes realizados em duplicata.

**Figura 22:** Valores detectados de nitrito, TNF- $\alpha$  e IL-12 no sobrenadante de MDMO após 48h de estimulação com LPS e molécula 2



**Legenda.** CN = controle negativo, apenas com meio de cultura. 33,17  $\mu$ M =  $\frac{1}{4}$  EC<sub>50</sub> e 66,35  $\mu$ M =  $\frac{1}{2}$  EC<sub>50</sub> da molécula 2. (A, B e C) Gráficos em colunas indicando as concentrações de nitrito, TNF- $\alpha$  e IL-12, respectivamente, nos grupos controle negativo (CN), 500ng/mL de LPS, 33,17 $\mu$ M e 66,35 $\mu$ M da molécula 2. Os dados foram expressos como média da concentração  $\pm$  EPM avaliados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnett. \* $p < 0,001$  em relação ao grupo controle negativo. Os dados foram obtidos a partir de 2 experimentos independentes realizados em duplicata.

N.D. = Não detectado

### 5.7 Sobrenadantes oriundos de melanoma murino polarizaram MDMO para o fenótipo M1 e induziram produção de NO, TNF- $\alpha$ e IL-12

Para avaliar o efeito dos sobrenadantes de cultura de melanoma murino sobre o fenótipo dos MDMO simulando o que acontece no microambiente tumoral, as células foram estimuladas com os sobrenadantes A, B, C e D. É provável que todos estes contenham quantidades de DAMPs, visto que foram coletados de ensaio *de identificação* de morte celular, cujos resultados estão apresentados na Figura 17, e alguma porcentagem de morte celular foi identificada para todos os grupos. Além disso, é certa a presença de FDTs produzidos pelas células B16-F10. Não foi possível fazer a identificação e quantificação destes fatores.

O sobrenadante A recolhido do grupo controle negativo do ensaio descrito em 5.4.1, não possuía qualquer resquício de DMSO ou da molécula 2 já que no experimento de origem apenas meio de cultura completo foi adicionado. Os demais, B, C e D foram expostos a concentrações crescentes da molécula 2 no ensaio de origem e provavelmente continham alguma quantidade de DMSO e da molécula 2. As populações de células foram escolhidas conforme os *gates* definidos previamente conforme o tópico 5.4.2.

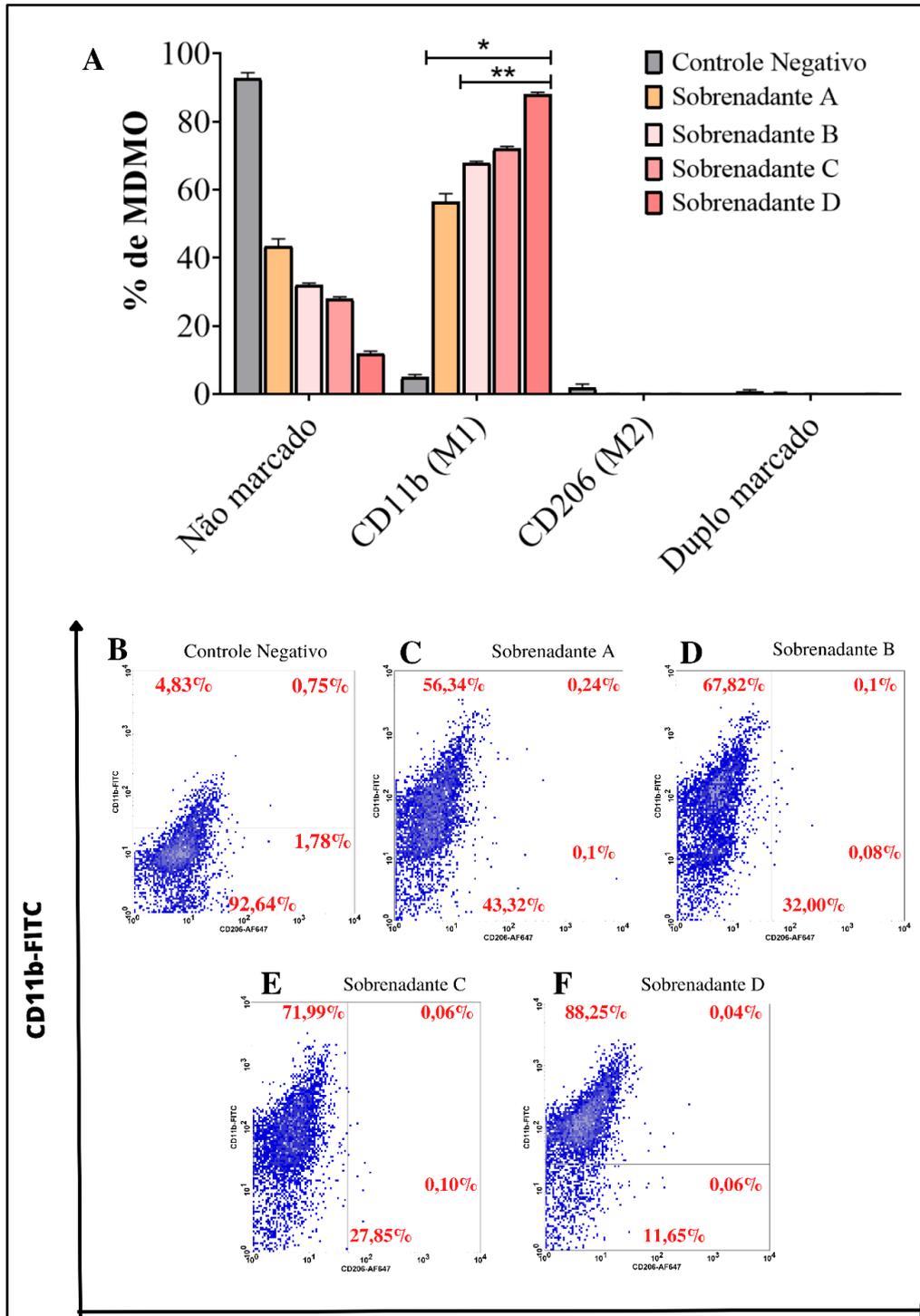
A exceção do grupo controle negativo onde foi adicionado somente meio de cultura, em todos os grupos de MDMO expostos aos quatro sobrenadantes (A, B, C e D) houveram marcações positivas para o CD11b acima de 50%. Inferimos que os sobrenadantes induziram polarização para o fenótipo M1 (Figura 23). O grupo tratado com o sobrenadante A apresentou a menor porcentagem de marcação para CD11b, cerca de 56%, os demais apresentaram marcações maiores e crescentes em relação ao sobrenadante A. O sobrenadante D apresentou valor acima de 81%, semelhante aos grupos de MDMO tratados diretamente com 33,17 $\mu$ M e 66,35 $\mu$ M da molécula 2 como pode ser visto na Figura 21.

Os valores encontrados nas dosagens de nitrito, TNF- $\alpha$  e IL-12 estão apresentados na Figura 24. O ensaio para quantificação de nitrito indicou que nos quatro grupos houve detecção com diferença significativa em relação ao grupo controle negativo. O grupo C foi o único onde a concentração foi maior que 10 $\mu$ M. Se compararmos os valores aqui mensurados com os obtidos após estimulação com LPS e molécula 2 apresentados na Figura 22, observamos que eles são consideravelmente menores em relação ao grupo LPS e são maiores em relação aos grupos estimulados com a molécula 2.

Também em relação ao TNF- $\alpha$ , em todos os grupos houve detecção desta citocina em valores significativamente maiores em relação ao grupo controle negativo. Nos grupos C e D, o valor detectado foi superior a faixa de detecção do kit e seus valores foram expressos como maiores que 1000pg/mL. Ao compararmos estes grupos com o ensaio anterior apresentado na Figura 22, observamos que eles foram capazes de induzir produção superior a induzida pelo LPS.

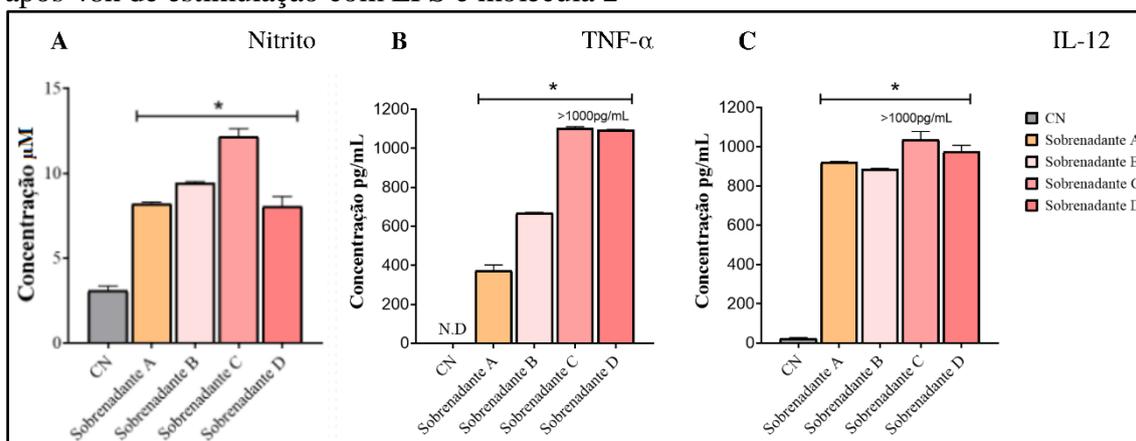
A IL-12 foi detectada em todos os grupos com quantidades acima de 800 pg/mL com diferenças significante em relação ao controle negativo. Novamente no grupo C observamos que o valor detectado superou a faixa de detecção do kit. Comparando com o ensaio anterior apresentado na Figura 22, observamos que o estímulo com os quatro grupos de sobrenadantes foram capazes de induzir a produção da citocina em quantidades maiores que o LPS e molécula 2.

**Figura 23:** Perfil fenotípico de MDMO após 48h de estimulação com sobrenadantes de melanoma murino



**Legenda:** Controle negativo apenas com meio de cultura. Demais grupos oriundos de sobrenadantes de melanoma murino. Sobrenadante A não contém resquícios de DMSO e molécula 2. Sobrenadantes B, C e D contém alguma quantidade de DMSO e molécula 2 nas concentrações 50,99, 76,48 e 101,98 $\mu$ M, respectivamente. (A) Gráfico de barras indicando as porcentagens de MDMO não marcado (M0), marcados por CD11b (M1) e marcados por CD206 (M2) e duplo marcado. (B-F) gráfico do tipo *dotplot* mostrando o comportamento e porcentagens de marcação de cada grupo. Os dados foram expressos como média das porcentagens de marcação  $\pm$  EPM avaliados por *two-way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni. \* $p < 0,001$  em relação ao grupo controle negativo; \*\* $p < 0,001$  em relação ao Sobrenadante A. Os dados foram obtidos a partir de 2 experimentos independentes realizados em duplicata.

**Figura 24:** Valores detectados de nitrito, TNF- $\alpha$  e IL-12 no sobrenadante de MDMO após 48h de estimulação com LPS e molécula 2



**Legenda:** CN = controle negativo, apenas com meio de cultura. Sobrenadante A sem exposição a molécula 2 ou DMSO. Sobrenadantes B, C e D expostos a 50,99 $\mu$ M, 76,48 $\mu$ M e 101,98  $\mu$ M da molécula 2, respectivamente. (A, B e C) Gráficos em colunas indicando as concentrações de nitrito, TNF- $\alpha$  e IL-12. Os dados foram expressos como média da concentração  $\pm$  EPM avaliados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnet. \* $p < 0,001$  em relação ao grupo controle negativo. Os dados foram obtidos a partir de 2 experimentos independentes realizados em duplicata.

N.D. = Não detectado

### 5.8 A estimulação pelos conjuntos molécula 2 + sobrenadante A e molécula 2 + LPS polarizaram MDMO para o fenótipo M1 e induziram produção de NO, TNF- $\alpha$ e IL-12

De posse dos dados individuais realizados nos ensaios anteriores, avaliamos agora a ação da estimulação pelos conjuntos molécula 2 + Sobrenadante A e molécula 2 + LPS sobre o fenótipo dos MDMO. Na Figura 25 estão apresentados os dados obtidos no ensaio de fenotipagem dos MDMO. Podemos observar que todos os grupos apresentaram forte marcação para CD11b. Os dois grupos estimulados pelo conjunto molécula 2 + Sobrenadante A apresentaram cerca de 88% de marcação para CD11b, um valor consideravelmente maior que o observado para o Sobrenadante A isolado (Figura 23), cerca de 56%. Os dois grupos estimulados pelo conjunto molécula 2 + LPS apresentaram cerca de 82% de marcação para CD11b, valor similar ao observado para o LPS isolado (Figura 21), cerca de 79%. A comparação entre o conjunto molécula 2 + Sobrenadante A e molécula 2 + LPS nos mostram que o primeiro apresenta uma porcentagem um pouco superior, mas que representa uma diferença significativa em relação as porcentagens do segundo (Figura 25). A molécula 2 parece ter um comportamento sinérgico junto com o sobrenadante A na polarização para o fenótipo M1.

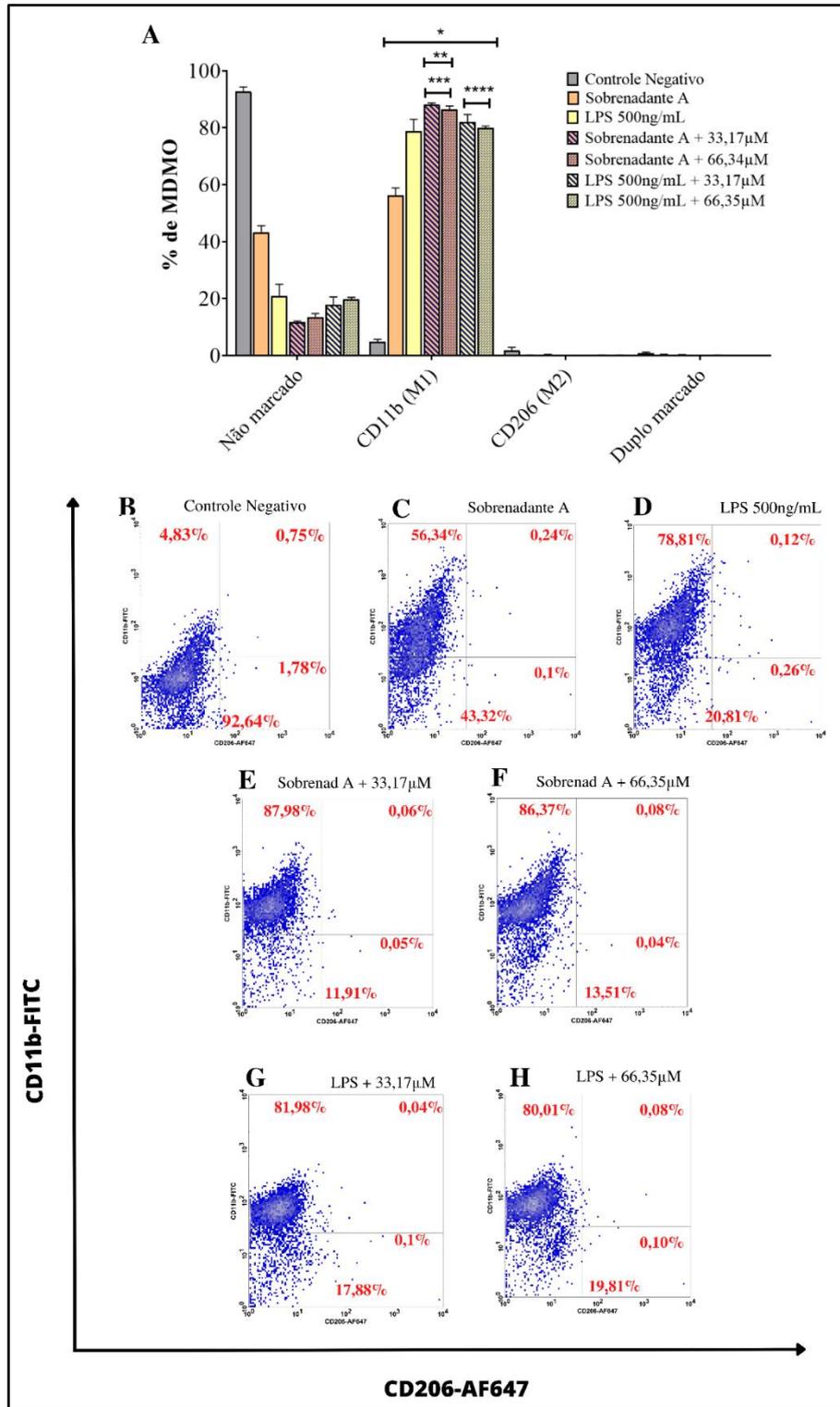
Os valores encontrados na dosagem de nitrito, TNF- $\alpha$  e IL-12 estão apresentados na Figura 26. Diante das dosagens realizadas para quantificar nitrito, observamos que em todos os grupos houve detecção deste analito em quantidade significativamente maiores em relação ao grupo controle negativo. O estímulo conjunto da molécula 2 + LPS foi capaz de aumentar a concentração de nitrito em mais de 3 vezes em relação ao estímulo conjunto da molécula 2 + Sobrenadante A (Figura 26A). Quando comparamos a estimulação pelos conjuntos 33,17 $\mu$ M + LPS (18,03 $\mu$ M) e 66,35 $\mu$ M + LPS (19,15  $\mu$ M) apresentados na Figura 26A com o do LPS isolado (87,44 $\mu$ M) (Figura 22A), observamos uma redução na concentração de nitrito superior a quatro vezes, provavelmente associada a presença da molécula 2. Ao compararmos 33,17 $\mu$ M + Sobrenadante A e 66,35 $\mu$ M + Sobrenadante A também apresentados na Figura 26A com o Sobrenadante A isolado (Figura 24A), não observamos alterações significativas, as concentrações ficaram em torno de 7 e 8 $\mu$ M.

Ao observarmos os dados apresentados na Figura 26B, identificamos que em todos os grupos houve produção de TNF- $\alpha$  quantificado em altas concentrações. Para o grupo controle negativo o analito não foi detectado. Nos estímulos conjuntos molécula 2 + LPS, os valores superaram os dos estímulos conjuntos molécula 2 + Sobrenadante A e chegaram a passar da faixa de detecção do kit, seus valores foram expressos como maiores que 1000pg/mL (Figura 26B). Ao compararmos 33,17 $\mu$ M + LPS (>1000pg/mL) e 66,35 $\mu$ M + LPS (>1000pg/mL) com o ensaio LPS isolado (806,30pg/mL) observamos que a presença do nosso derivado 1,2,4-oxadiazol provavelmente teve efeito sobre a produção de TNF- $\alpha$  (>1000pg/mL), refletido em um maior valor detectado na estimulação conjunta em relação ao LPS empregado isoladamente (Figura 22B). O mesmo ocorre na comparação da estimulação 33,17 $\mu$ M + Sobrenadante A (841,78pg/mL) e 66,35 $\mu$ M (897,09pg/mL) + Sobrenadante A e o sobrenadante A isolado (373,74pg/mL) (Figura 24B).

A citocina IL-12 também foi detectada em todos os grupos avaliados. Para o grupo controle negativo o analito não foi detectado. Dentro dos conjuntos de estimulação molécula 2 + LPS e molécula 2 + Sobrenadante A, observamos uma diferença significativa entre a concentração mais baixa e mais alta (Figura 26C). Apesar de todo o cuidado na realização deste ensaio de ELISA para detecção da IL-12, a alta variação para os valores detectados poderia estar relacionada a erros pré-analíticos e analíticos. Apesar desta ressalva, os conjuntos apresentaram valores de IL-12 diferentes em relação ao LPS

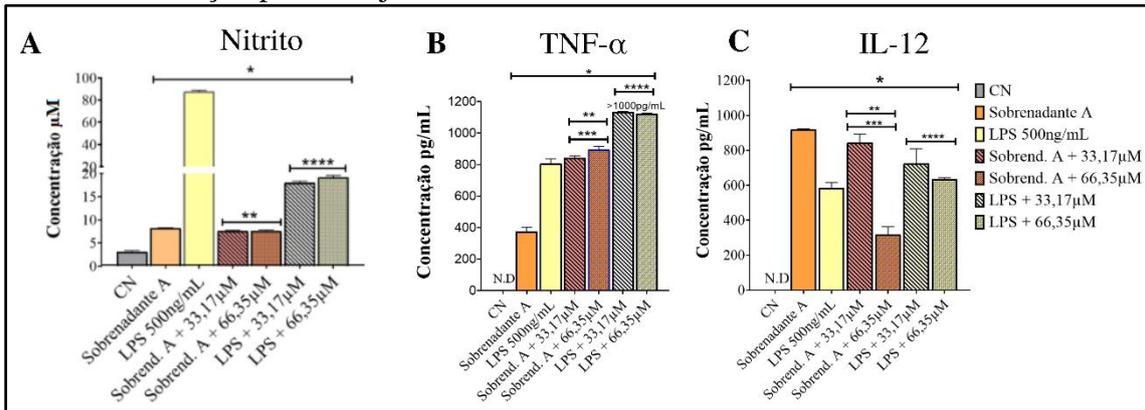
(Figura 22C) e Sobrenadante A (Figura 24C) isolados. Tanto em 33,17 $\mu$ M + LPS (726,58pg/mL) quanto em 66,35 $\mu$ M + LPS (635,95pg/mL), foram detectadas quantidades superiores de IL-12 em relação ao LPS isolado (585,48pg/mL). O contrário é visto para 33,17 $\mu$ M + Sobrenadante A (845,81pg/mL) e 66,35 $\mu$ M + Sobrenadante A (318,00pg/mL), onde foram detectadas quantidades inferiores de IL-12 em relação ao Sobrenadante A (921,30pg/mL) isolado.

**Figura 25:** Perfil fenotípico de MDMO após 48h de estimulação pelos conjuntos molécula 2 + Sobrenadante A e molécula 2 + LPS



**Legenda:** Controle negativo apenas com meio de cultura. Sobrenadante A não contém nenhuma quantidade de DMSO e molécula 2. (A) Gráfico de barras indicando as porcentagens de MDMO não marcados (M0), marcados por CD11b (M1) e marcados por CD206 (M2) e duplo marcados. (B-H) Gráfico do tipo *dotplot* mostrando o comportamento e porcentagens de marcação de cada grupo. Os dados foram expressos como média das porcentagens de marcação  $\pm$  EPM avaliados por *two-way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni. \* $p < 0,001$  em relação ao grupo controle negativo; \*\* $p < 0,001$  em relação ao conjunto de estimulação molécula 2 + LPS. \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao Sobrenadante A isolado. \*\*\*\* $p < 0,001$  em relação ao LPS isolado. Os dados foram obtidos a partir de 2 experimentos independentes realizados em duplicata.

**Figura 26:** Valores detectados de nitrito, TNF- $\alpha$  e IL-12 no sobrenadante de MDMO após 48h de estimulação pelos conjuntos molécula 2 + LPS e molécula 2 + sobrenadante A



**Legenda:** CN = controle negativo, apenas com meio de cultura. Sobrenadante A sem exposição a molécula 2 ou DMSO. (A, B e C) Gráficos em colunas indicando as concentrações de nitrito, TNF- $\alpha$  e IL-12, respectivamente. Os dados foram expressos como média da concentração  $\pm$  EPM avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. \* $p < 0,001$  em relação ao grupo controle negativo. \*\* $p < 0,001$  em relação ao conjunto de estimulação molécula 2 + LPS. \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao Sobrenadante A isolado. \*\*\*\* $p < 0,001$  em relação ao LPS isolado. Os dados foram obtidos a partir de 2 experimentos independentes realizados em duplicata.

N.D. = Não detectado

## 6. DISCUSSÃO

A classe dos oxadiazóis é caracterizada por compostos que possuem um heterociclo formado por um átomo de oxigênio, dois átomos de nitrogênio, dois átomos de carbono e mais duas ligações duplas. A alternância de posições dos átomos e insaturações conferem ao anel uma plasticidade bastante explorada em pesquisas científicas. Grupos químicos de cadeias grandes ou pequenas, hidrofílicos ou hidrofóbicos, doadores ou receptores de elétrons podem ser adicionados com o objetivo de acrescentar ou refinar atividades biológicas (PACE; PIERRO, 2009).

O anel 1,2,4-oxadiazol é especialmente importante para a indústria farmacêutica no que diz respeito ao planejamento racional de novos medicamentos, já que se trata de um grupo com volume, distribuição eletrônica e propriedades físico-químicas semelhantes a amidas e ésteres, ou seja, um bioisómero destes grupos. A permuta entre os grupos acarreta vantagens a molécula deixando-a menos instável sem prejuízo as propriedades biológicas e também almejam o melhoramento da orientação espacial, aumento da biodisponibilidade, da seletividade, potência, dentre outras propriedades (CASCIOFERRO *et al.*, 2019; GLOMB; SZYMANKIEWICZ; ŚWIĄTEK, 2018).

Em artigo de revisão recentemente publicado, constatamos que grande parte dos medicamentos pertencentes a classe dos oxadiazóis comercializados atualmente são derivados do anel 1,2,4-oxadiazol, vale destacar além da importância deste isômero frente aos demais, a grande diversidade de indicações terapêuticas que possuem: vasodilatador, anti-hipertensivo, supressor da tosse, antirretroviral, antagonista opioide, inibidor da catecol-O-metil transferase (COMT), para Distrofia Muscular de Duchenne e Esclerose Múltipla (ARAÚJO *et al.*, 2023).

Ainda sobre esse estudo, identificamos diversos trabalhos em que moléculas derivadas de 1,2,4-oxadiazol apresentaram atividades antitumoral e imunomoduladora. A indução de processos apoptóticos e necróticos, inibição da telomerase, redução da polimerização da tubulina, alteração do potencial de membrana mitocondrial e parada do ciclo celular foram mecanismo propostos para a atividade antitumoral. Ao passo que redução e aumento de infiltrado leucocitário, inibição de isoformas das cicloxigenases (COX), redução ou aumento de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , inibição da ativação de NF- $\kappa$ B, aumento da produção de óxido nítrico e redução de espécies reativas do oxigênio foram mecanismos propostos para imunomodulação (ARAÚJO *et al.*, 2023).

Diante deste contexto, foi objetivo deste estudo avaliar o efeito antitumoral e imunomodulador de derivado sintético 1,2,4-oxadiazol, o N-ciclohexil-3-(3-metilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-amina, denominado como molécula 2, em células de melanoma e MDMO murinos. Iniciamos a etapa de triagem submetendo células de linhagem a ensaios de citotoxicidade empregando uma gama de moléculas sintéticas derivadas do anel 1,2,4-oxadiazol a fim de escolher a mais promissora. Foram empregadas células das linhagens HCT-116, PC-3, SNB-19 e RAW 264.7 e os compostos VN 147, VN 148, VN 155, VN 157, VN 158, VN 162, VN 164, VN181, VN 185, VN 187 e molécula 2. Os ensaios foram realizados pelo método colorimétrico de redução do sal MTT a sal Formazan.

Todos os compostos foram capazes de inibir o crescimento celular em alguma porcentagem na concentração de 100 $\mu$ M como mostrado Tabela 2. Em ordem decrescente de sensibilidade aos compostos temos as linhagens HCT-116, PC-3 e SNB-19. As porcentagens médias de inibição de crescimento calculadas para cada linhagem somando-se a porcentagem de inibição de cada molécula e dividindo pelo número total de moléculas, foram 68,65%, 60,63% e 42,90%, respectivamente. VN 164 se mostrou a molécula menos tóxica. As mais tóxicas foram molécula 2 e VN 162. Os valores de IC<sub>50</sub> foram calculados após exposição por 72h aos compostos. Os menores valores para as linhagens acima foram os seguintes: HCT-116 cerca de 35 $\mu$ M, encontrados nos compostos VN 162 e VN 185; PC-3 cerca de 46 $\mu$ M, encontrado em molécula 2; SNB-19 cerca de 79 $\mu$ M, encontrados nos compostos VN 187 e molécula 2.

Em estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa foram avaliadas as atividades antitumoral de vários compostos derivados de 1,2,4-oxadiazol, sendo alguns deles também empregados neste presente trabalho. As ações citotóxicas dos compostos molécula 2, VN 155 e VN 158 aqui demonstradas, foram também demonstradas nos resultados apresentados por De Oliveira et al. (2018). As porcentagens de inibição de crescimento de HCT-116 quando tratada com molécula 2 e VN 155 são bastante semelhantes, assim como o valor de IC<sub>50</sub> da molécula 2 para PC-3. Ainda sobre a ação citotóxica das moléculas VN 147, VN 148, VN 162, VN 164, VN181, VN 185 e VN 187 nossos resultados corroboram os apresentados por De Oliveira et al. (2021) que também verificaram inibição de crescimento de linhagens tumorais em decorrência da exposição a estes compostos. Além de experimentarem em HCT-116 e PC-3, testaram em mais três linhagens tumorais, SKMEL-103, AGP-01 e NCIH-460, com inibição do crescimento em todas elas. Outros autores também demonstraram a atividade antitumoral de derivados

sintéticos 1,2,4-oxadiazol (GOBEC *et al.*, 2015; MARKOV *et al.*, 2020; POTENZA *et al.*, 2021a; WU *et al.*, 2012; YOUSSEF *et al.*, 2022; ZHANG *et al.*, 2020b).

Um estudo de relação estrutura-atividade seria necessário para identificar os sítios de interação dos derivados 1,2,4-oxadiazol, entretanto é possível extrair algumas informações ao compararmos as estruturas apresentadas na Tabela 1. Todos os compostos possuem substituições nas posições 3 e 5 do anel 1,2,4-oxadiazol. Na posição 3 temos a porção variável das moléculas com alternância dos radicais H, CH<sub>3</sub>, F, OCH<sub>3</sub> e NO<sub>2</sub> ligados ao fenil. Na posição 5 temos os grupos fixos ciclohexil, alcino e glicoglicero-triazol ligados ao anel 1,2,4-oxadiazol por funções orgânicas nitrogenadas.

Para os representantes N-ciclohexil-1,2,4-oxadiazol VN 155, VN 158 e molécula 2, a presença de grupo doador de elétrons, no caso CH<sub>3</sub> presente na molécula 2, parece trazer maior ganho de atividade antitumoral. Para os alcinos-1,2,4-oxadiazol VN 147, VN 148, VN 162 e VN 164, o ganho parece estar associado a presença de grupo halogênio como o Flúor ligado ao fenil presente na molécula VN 162. Para os glicoglicero-triazol-1,2,4-oxadiazol VN 181, VN 185 e VN 187, o ganho parece estar associado a presença de NO<sub>2</sub> ligado ao fenil, presente nas moléculas VN 185 e VN 187 com discreta diferença entre elas. Em seu artigo de revisão, Biernacki *et al.* 2020 compilaram resultados de atividade antitumoral de derivados sintéticos 1,2,4-oxadiazol que corroboram com os nossos em relação ao aumento ou diminuição de atividade condicionada pelo grupo ligante ao fenil (BIERNACKI *et al.*, 2020).

A linhagem RAW 264.7 tem seu uso como modelo de macrófago bastante aceito e foi considerada como a linhagem não tumoral na etapa de triagem das moléculas (TACIAK *et al.*, 2018). Assim como as demais, observamos que os compostos utilizados também foram capazes de inibir o crescimento desta linhagem. VN 162 exibiu o maior potencial antiproliferativo com cerca de 99% de inibição de crescimento na concentração fixa de 100µM, esta molécula também esteve entre as de maior potencial para as HCT-116, PC-3 e SNB-19. Outra molécula com potencial semelhante foi a molécula 2, entretanto sua porcentagem de inibição para RAW 264.7 foi cerca de 51%, o menor dentre os compostos utilizados. Os valores de EC<sub>50</sub> foram calculados para VN 157, VN 158, VN 162, VN 187 e molécula 2, sendo este último o que apresentou o maior valor, cerca de 122µM. Ao relacionarmos as concentrações inibitórias mínimas dos compostos foi possível calcular o IS. A molécula 2 apresentou os melhores resultados e foi 2,70, 2,67 e

1,55 vezes mais seletiva para HCT-116, PC-3 e SNB-19 respectivamente, que para os macrófagos RAW 264.7.

O tratamento com a quimioterapia tradicional traz bastante desconforto para os pacientes já que os fármacos citotóxicos não são específicos para as células tumorais e provocam efeitos adversos diversos como fadiga, náusea, vômitos, diarreia, anemia, alopecia, leucopenia, *rash* cutâneo e etc. Também são considerados elementos limitantes a dose e frequência de administração. Compostos dotados de máximo efeito tóxico direcionado ao tumor e mínimo efeito colateral norteiam as pesquisas e desenvolvimento de novos medicamentos e neste contexto, moléculas mais seletivas despertam mais atenção. (YADAV *et al.*, 2017b).

Considerando os valores das porcentagens de inibição de crescimento, IC<sub>50</sub> e EC<sub>50</sub>, bem como ação citotóxica mais seletiva para células tumorais em relação aos macrófagos da linhagem RAW264.7, e também guiados por trabalhos prévios publicados pelo nosso grupo de pesquisa, em que foram comprovadas as atividades antitumoral, antimicrobiana e antiparasitário da molécula 2 (DE OLIVEIRA, *et al.*, 2018; DE OLIVEIRA *et al.*, 2021; ROCHA *et al.*, 2022), optamos por seguir nosso estudo com esta mesma molécula através uma abordagem em duas frentes biologicamente relacionadas entre si, citotoxicidade para melanoma murino e imunomodulação da imunidade inata, no caso de MDMO.

Foram escolhidas a linhagem tumoral B16-F10, originária de melanoma de camundongos C57BL/6, espécie *Mus musculus* e macrófagos da mesma raça e espécie, obtidos por diferenciação de células imaturas da medula óssea. Dado o insucesso da quimioterapia isolada para o tratamento de melanomas avançados, agentes imunoterápicos são utilizados associados a outras moléculas capazes de agir potencializando as respostas imunológicas e se tornaram a modalidade mais eficiente atualmente empregada com resultados bastante positivos para os pacientes (LEE; MUKHI; LIU, 2012; TÍMÁR; HEGEDÜS; RÁSÓ, 2018). Em indivíduos, os TAMs são o tipo de leucócito mais comum em tumores sólidos e tendem a assumir o fenótipo M2. O resultado é que desempenham funções favoráveis ao crescimento do tumor como a promoção do crescimento de novos vasos sanguíneos e diminuição da imunovigilância. Este papel central no desenvolvimento dos tumores tornaram essas células alvos terapêuticos em que se busca a eliminação das células já presente no TME, inibição do

recrutamento de novos macrófagos e repolarização dos presentes para o fenótipo M1 (LIU; JOSHI, 2020; QIAN *et al.*, 2017).

Células da linhagem B16-F10 foram submetidas a ensaio de citotoxicidade *in vitro* pelo método colorimétrico do MTT para avaliação das porcentagens de inibição e calcular o valor de IC<sub>50</sub>. Assim como nos ensaios anteriores, a molécula 2 foi capaz de inibir o crescimento desta linhagem celular em diferentes concentrações, resultando num valor de IC<sub>50</sub> de 50,99µM. Conhecido o efeito citotóxico em B16-F10, prosseguimos com os ensaios para investigação da via envolvido na morte celular através de ensaio *in vitro* utilizando os marcadores AxPE e 7-AAD e leitura por citometria de fluxo. Os dois métodos mais bem caracterizados e prevalentes para se estudar morte celular são apoptose e necrose. O emprego desses marcadores permite a identificação de células viáveis (AxPE-/7-AAD-), em processo de apoptose inicial (AxPE+/7-AAD-), apoptose tardia (AxPE+/7-AAD+) e necrose (AxPE-/7-AAD+) por citometria de fluxo. As células tratadas com as três concentrações empregadas da molécula 2 apresentaram elevada porcentagem de marcações características para processos necróticos (NIRMALA; LOPUS, 2019).

Processos apoptóticos são programados e controlados caracterizados por ativação da via das caspases, aumento da permeabilidade mitocondrial, arredondamento celular, diminuição de volume, condensação de cromatina e fragmentação nuclear e de membrana plasmática com formação de *blebs*. Em situações em que as células sofrem injúrias repentinas como hipóxia, radiação, calor e exposição a agentes químicos citotóxicos, ocorre morte por via distinta e não orquestrada conhecido como necrose. É um processo independente de gasto energético onde as células sofrem um “inchaço” que culmina com a ruptura da membrana plasmática com consequente liberação de DAMPs para o meio extracelular (D'ARCY, 2019).

DAMPs são moléculas que funcionam como adjuvantes ou que sinalizam perigo diretamente para o sistema imune intato, a morte celular por necrose invariavelmente é acompanhada de um processo inflamatório. Em oposição a apoptose que é considerada um mecanismo de morte tolerável ao sistema imune, a necrose é considerada como um mecanismo de morte imunogênico. No contexto da terapia para o câncer com quimioterápicos, em paralelo a via de morte induzida, alterações na quantidade de CTLs, linfócitos Treg, células NK, células dendríticas e macrófagos M1 no TME são observadas

a depender do agente empregado condicionando o prognóstico, daí a importância de moléculas polivalentes (AHMED; TAIT, 2020; KROEMER *et al.*, 2013).

Estudos com neoplasias em murinos mostraram que o tratamento com antraciclina foi mais eficiente em camundongos imunocompetentes em comparação aos imunocomprometidos. Em humanos, foi observado que a antraciclina causa morte imunogênica em células tumorais e tem sido utilizada para preparo de terapia vacinal em pacientes com câncer. A resposta imunológica é dependente de macrófagos e das células dendríticas na medida que estas células fagocitam os antígenos das células tumorais mortas, processam e apresentam a linfócitos e células NK (KROEMER *et al.*, 2013). O fato de termos identificado que a molécula 2 também causar morte do tipo imunogênica em melanoma murino nos sugere que seu uso em organismo poderia causar o mesmo tipo de morte com incremento da ativação do sistema imunológico.

Ao estudar a atividade antitumoral de uma série de derivados oxadiazóis, Ziedan *et al.* (2010) destacaram que um dos compostos que exibiu elevada atividade citotóxica para a linhagem tumoral MIA PaCa-2 (câncer de pâncreas) causou morte via necrose, diferente dos demais compostos que induziram apoptose. Destacaram que o resultado é relevante representando uma alternativa para compostos que induzem morte por apoptose, pois consideram que o desenvolvimento de mecanismos resistentes à apoptose reduzem a sensibilidade das células tumorais, aumentam a sobrevivência e pioram o prognóstico do paciente (ZIEDAN *et al.*, 2010).

Markov *et al.* (2020) avaliaram a via de morte por apoptose ou necrose via marcação de células HeLa (carcinoma cervical) com Anexina-V e iodeto de propídeo (PI), induzida por um dos compostos oxadiazóis que abordaram no seu estudo. Eles verificaram que o aumento da concentração do composto provocou uma transição da população de células em apoptose recente (marcadas somente por Anexina-V) para apoptose tardia (marcação dupla Anexina-V e PI) além de aumento de marcação de população de células necróticas (marcadas somente por PI). Ainda destacaram que esta transição de apoptose para necrose é dose-dependente e similar a que ocorre com agentes anticâncer bem estabelecidos como cisplatina, etoposídeo e doxorrubicina. (MARKOV *et al.*, 2020). Nas concentrações por nós utilizadas não foram observados este comportamento. Como partimos do valor de IC<sub>50</sub>, não descartamos que a redução deste valor possa refletir o mesmo comportamento dose-dependente.

Após as etapas de coleta da medula óssea, diferenciação induzida por CSF-M e confirmação por citometria de fluxo, MDMO foram utilizados para realização de ensaios de citotoxicidade pelo método do MTT e avaliação fenotípica após estimulação com a molécula 2, LPS e sobrenadantes oriundos de melanoma murino. Assim como observado em B16-F10, a molécula 2 foi capaz de inibir o crescimento dos MDMO em diferentes concentrações, o valor de EC<sub>50</sub> foi de 132,70µM. O cálculo do IS nos mostrou uma seletividade de cerca de 2,6 vezes para a linhagem tumoral em relação a não tumoral.

Em todos os ensaios para avaliação fenotípica foram empregados os marcadores anti-F4/80-PE, anti-CD11b-FITC e anti-CD206-Alexa Fluor® 647. F4/80 é um glicoproteína da família dos fatores de crescimento epidermal amplamente utilizada como marcador de macrófagos murinos de origens variadas. CD11b é uma glicoproteína pertencente à família das integrinas superexpressa na superfície dos macrófagos M1. CD206, também conhecido como receptor de manose de macrófagos (MR), pertence a superfamília das lectinas tipo C e está superexpresso na superfície de macrófagos M2. As três marcações simultâneas possibilitam identificar macrófagos maduros nos estados de repouso M0 (F4/80+/CD11b-/CD206-), ativados pela via clássica M1 (F4/80+/CD11b+/CD206-) e ativados pela via alternativa M2 (F4/80+/CD11b-/CD206+) (VAN DEN BOSSCHE; BAARDMAN; DE WINTHER, 2015; YING *et al.*, 2013).

Os resultados obtidos nos ensaios realizados combinando os três marcadores nos mostraram que a metodologia empregada para diferenciação dos macrófagos foi exitosa, a população de células analisada apresentou forte marcação para F4/80 confirmando se tratar de uma população de macrófagos maduros. No grupo controle negativo, mais de 90% das células analisadas não apresentaram marcação para CD11b ou CD206, entendido como um estado não ativado no qual os macrófagos se apresentam com fenótipo M0. Entendemos também que a metodologia empregada teve pouco efeito sobre a ativação dos macrófagos e atribuímos mudanças fenotípicas primordialmente aos estímulos fornecidos às células. O valor de EC<sub>50</sub> denotou que MDMO são menos sensíveis a molécula 2 possibilitando que escolhêssemos as concentrações de 33,17 e 66,35µM para os ensaios de alterações fenotípicas. Para os MDMO, são concentrações com baixa citotoxicidade, porém ficam ao redor do valor de IC<sub>50</sub> para a linhagem B16-F10.

A complexa interação entre a inflamação e o processo de resolução está intimamente relacionada à flexibilidade funcional dos macrófagos. Para restaurar o

equilíbrio nos tecidos, os macrófagos podem rapidamente modificar suas características e assumir funções mediante o estímulo recebido. Os macrófagos M1 são ditos pró-inflamatórios pois estão intimamente envolvidos no início e manutenção destes processos. São ativados por IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e LPS, produzem IL-1b, IL-6, TNF- $\alpha$ , EROs, ERNs, além de aumentada atividade fagocítica, apresentação de antígenos e ativação de linfócitos TCD4+, TCD8+ e células NK. Já os M2 são ditos anti-inflamatórios pois exercem funções primordiais nas etapas de regeneração e remodelação dos tecidos, na resolução da inflamação. São ativados por IL-4, IL-10 e IL-13, produzem IL-10, TGF- $\beta$ , VEGF, MMP9 dentre outros (GAO; LIANG; WANG, 2022; LIU; JOSHI, 2020).

O TME é um complexo ambiente formado por fibras de colágeno e elastina, vasos sanguíneos, células tumorais, células estromais e células do sistema imunológico, como linfócitos T e B, células dendríticas, células supressoras derivadas de mielóides e (MSDC) e macrófagos. Em geral, na inicialização dos tumores, os macrófagos são atraídos por CSF-M e CCL-2 e ativados para M1, exercem funções pró-inflamatórias e assim desempenham papel antitumoral. Em caso de insucesso e estabelecimento do tumor, TAMs são ativados no TME e polarizados para M2 passando a desempenhar funções pró-tumorais (GAO; LIANG; WANG, 2022; KIM; BAE, 2016; LIU; JOSHI, 2020).

A participação dos TAMs M2 condiciona a progressão dos tumores. Atuam na diminuição da imunovigilância por atraírem e estimularem Treg que por sua vez inibem as atividades antitumorais de CTLs e NK. São responsáveis por manter um ambiente inflamatório crônico ao secretarem IL17 e IL23 perpetuando a instabilidade genética. Fomentam a formação de vasos sanguíneos e a metástase do tumor ao secretar substâncias como o VEGF e MMP9. Portanto, um objetivo fundamental das terapias contra o câncer que se baseiam em macrófagos é diminuir a quantidade de função dos M2 e aumentar dos M1 (ANDERSON *et al.*, 2021).

De maneira geral, as análises fenotípicas pós-estimulação nos mostraram que a molécula 2, o LPS e os sobrenadantes oriundo de melanoma murino empregados de forma isolada foram capazes de modular os MDMO. Nosso estudo mostrou um aumento na expressão de CD11b, indicando que a molécula 2 induziu polarização dos MDMO para o fenótipo M1 em alta porcentagem das células analisadas. Nos sobrenadantes destes grupos não foram detectados nitrito e nem IL-12. Somente para o grupo exposto a 66,35 $\mu$ M da molécula 2 foi detectado produção de TNF- $\alpha$ .

O LPS oriundo de bactérias gram-negativas é um conhecido e potente ativador de macrófagos *in vitro* e assim como em organismos completos, atua via sinalização TLR4/NF- $\kappa$ B com conseqüente ativação pela via clássica. A ativação desta via de sinalização além de polarizar os macrófagos para o perfil M1 leva invariavelmente ao desencadeamento de resposta inflamatória onde o macrófago passa a produzir citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 além do aumento da produção de NO decorrente do aumento da expressão de iNOS. (MESHKANI; VAKILI, 2016; ORECCHIONI *et al.*, 2019). Como esperado, a exposição dos MDMO a LPS provocou polarização para o fenótipo M1. Também detectamos o nitrito em grande quantidade refletindo a alta produção de NO, assim como de TNF- $\alpha$  e IL-12.

A ideia de estimular MDMO com sobrenadantes oriundos de ensaio prévio com células de melanoma murino buscou simular a influência de produtos solúveis contidos no sobrenadante sobre o fenótipo dos macrófagos. Identificamos que a molécula 2 induziu a morte por necrose, sendo assim, além de produtos secretados não conhecidos e antígenos tumorais, os sobrenadantes continham quantidades variáveis de DAMPs das células da linhagem B16-F10. Foi observado que os MDMO foram polarizados para M1 após contato com todos os grupos de sobrenadantes. Os sobrenadantes que continham resquícios da molécula 2 (Sobrenadantes B, C e D) foram capazes de aumentar a porcentagem de células M1 em relação ao sobrenadante A em que não havia qualquer resquício da molécula 2. Também foi possível observar que a estimulação provocou aumento na quantidade de nitrito, TNF- $\alpha$  e IL-12.

A morte celular imunogênica (MCI) tem ganhado relevância ultimamente pelo fato de que aumenta a resposta imune inata e adaptativa. Foram identificados tratamentos corriqueiramente como o uso de antraciclina, ciclofosfamida, oxaliplatina, de radioterapia, de viroterapia e de terapia fotodinâmica que causam MCI e induzem imunidade antitumoral robusta (GARG; AGOSTINIS, 2017). Uma característica comum entre as MCI é a liberação de DAMPs de células mortas ou em processo de morte no meio. Normalmente estão localizados no interior das células distribuídos no núcleo, citoplasma e retículo endoplasmático, e não implicam em respostas imunológicas. No entanto, quando liberados para o meio externo após morte celular, são reconhecidos por receptores presentes em células imunológicas e passam a desempenhar um papel imunogênico. Calreticulina, proteínas de choque térmico (HSPs), proteína de alta mobilidade box 1 (HMGB1), ATP, DNA e RNA são exemplos de DAMPs. DAMPs

podem ser reconhecidos tanto pelo sistema imunológico inato quanto pelo adaptativo por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) distintos, o que conduz à quimiotaxia, homing, ativação e/ou maturação, resultando, em última análise, na apresentação cruzada de antígenos tumorais a linfócitos T CD8+ no contexto de uma imunomodulação robusta. (BIRMPILIS *et al.*, 2022)

Os tumores se desenvolvem em microambientes complexos e dinâmicos que afetam seu desenvolvimento, disseminação e metástase. Células tumorais e vizinhos mantêm frequente interação através de contato físico e liberação de fatores solúveis. Moléculas como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, mediadores inflamatórios e vesículas contendo fragmentos de DNA, corpos apoptóticos com carregando genes transmissíveis e exossomos são recursos que células tumorais utilizam para se comunicar com outras ou com células normais. O entendimento da maneira como as células cancerígenas interagem entre si e as consequências disto pode ser aplicado para criação de abordagens terapêuticas com o objetivo impedir a progressão e resistência aos quimioterápicos em uso (BAGHBAN *et al.*, 2020).

A pesquisa em imunoterapia contra o câncer focada em TAMs como alvos terapêuticos vem ganhando relevância. Uma abordagem que tem se mostrado promissora é a repolarização do fenótipo M2 para o M1. Sabemos que o fenótipo dos macrófagos é determinado pelos estímulos recebidos do TME. Macrófagos M2 estão associados a ativação dos receptores M-CSFR, IL-10R, IL-4R, IL-13R, TGFβR e EGFR e vias de sinalização PI3K/AKT, JAK/STAT6 ou STAT3 e TGF-β/SMAD. Enquanto que a polarização M1 está ligada a ativação dos receptores de IFN-γ, IL-12, TNF, GM-CSF e *toll-like* e das vias de sinalização JNK, P38, NF-κB p65, JAK/STAT1. (KERNEUR; CANO; OLIVE, 2022).

Também influenciam na repolarização dos MDMO a concentração dos agonistas ligados em seus receptores, o tempo em que a via fica ativada após ativação e redundância de algumas vias de sinalização para o caso de inoperância da via principal. Apesar de toda complexidade envolvida, o emprego de moléculas projetadas para bloquear a via de sinalização dos macrófagos pró-tumorais em modelos pré-clínicos e ensaios clínicos iniciais colocam os macrófagos como alvos eficazes de terapias isoladas ou combinadas contra o câncer. (GUO *et al.*, 2016; KERNEUR; CANO; OLIVE, 2022).

Semelhante a exposição isolada, os conjuntos molécula 2 + Sobrenadante A e molécula 2 + LPS também foram capazes de modular os MDMO polarizando-os para o fenótipo M1. Observamos que a presença da molécula 2 teve um efeito sinérgico na polarização para M1 especialmente se compararmos ao considerável aumento de 56% para 88% entre os MDMO estimulados com o sobrenadante A e com o conjunto molécula 2 + sobrenadante A. O mesmo efeito foi identificado na quantificação de TNF- $\alpha$  para ambos os conjuntos em relação a estimulação isolada. Para IL-12 observamos o efeito sinérgico para o conjunto molécula 2 + LPS em relação a estimulação isolada. Em relação a dosagem de nitrito, foi observada redução da quantidade para o conjunto molécula 2 + LPS em relação a estimulação isolada.

Dentre as células do sistema imunológico, os macrófagos são capazes de responder rapidamente a estímulos e produzir NO, que por sua vez é capaz de matar vírus e bactérias invasores. Também se atribui a ele a capacidade de induzir a morte células tumorais pelo mesmo mecanismo. Além dos papéis anteriores, o NO também está envolvido na diferenciação de linfócitos T para o perfil Th1 e desenvolvimento de linfócitos B produtores de anticorpos (RAHAT; HEMMERLEIN, 2013). Alguns estudos apresentaram aumento na concentração de NO em decorrência do uso de compostos oxadiazóis (ABD-ELLAH *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2015). Os autores destacaram que a maleabilidade da classe permitiu a síntese de estruturas contendo nitratos de ésteres que facilmente podem liberar NO para o meio, conferindo assim propriedades antitumorais. Tal via paralela antitumoral diferente da investigada neste estudo valoriza o potencial da classe do oxadiazóis.

O aumento da concentração de citocinas pró-inflamatórias no TME tem relação direta com o aumento da atividade citotóxica de células imunes. O TNF- $\alpha$  é um mediador inflamatório potente produzido e secretado principalmente por macrófagos M1. A produção por estas células desencadeia uma variedade de respostas celulares incluindo a ativação da transcrição de genes pró-inflamatórios e secreção de citocinas e quimiocinas, ativação de outros macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células NK e CTLs, aumento da apresentação antigênica e fagocitose e podem induzir a morte direta de células tumorais via ativação de caspase-8. A IL-12 é uma citocina pró-inflamatória produzida e expressa principalmente por APCs, como células dendríticas e macrófagos. No contexto do TME estimula células efetoras da imunidade inata e adaptativa levando ao aprimoramento de respostas imunes citotóxicas, macrófagos são polarizados para M1,

linfócitos TCD8<sup>+</sup> são transformados em CTLs e células NK são recrutadas. A ativação mediada pela IL-12 desencadeia a liberação de citocinas Th1 como o IFN- $\gamma$ , a consequência é inibição de linfócitos Treg e aumento da expressão de moléculas MHC I pelas células tumorais facilitando o reconhecimento (BERRAONDO *et al.*, 2019; HABANJAR *et al.*, 2023).

Alguns estudos mostraram que derivados sintéticos 1,2,4-oxadiazol foram capazes de modular o sistema imunológico reduzindo a inflamação e os níveis de citocinas pró-inflamatórias. Estes resultados são contrários aos nossos (ABD EL-HAMEED *et al.*, 2021; GOBEC *et al.*, 2015; MARKOV *et al.*, ; NOROUZI *et al.*, 2016; POTENZA *et al.*, 2021b; ZHANG *et al.*, 2020b). Em seu estudo sobre atividade anti-HBV de derivados 1,2,4-oxadiazol, Qiu et al. 2022 verificou que um composto teve ação agonista sobre receptores TLR8 ativando a via NF- $\kappa$ B em células mononucleares de sangue periférico. Mostrou também que em decorrência da ligação com TLR8, houve expressão de TNF- $\alpha$  e IL-12 de maneira dose dependente (QIU *et al.*, 2022). Nossos resultados vão de encontro a esses corroborando o potencial imunomodulador dos derivados 1,2,4 oxadiazol.

Não foi objetivo deste estudo precisar mecanismos pelos quais a molécula 2 modula MDMO. Como já citado, o fenótipo M1 está relacionado a ativação das vias de sinalização JNK, P38, NF- $\kappa$ B p65, JAK/STAT1(KERNEUR; CANO; OLIVE, 2022). A participação relevante na polarização dos MDMO para o fenótipo M1 sugere que a molécula N-ciclohexil-3-(3-metilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-amina tem participação na ativação dessas vias. A quantificação de outras citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, por ELISA e por método mais preciso como RT-PCR, além de a identificação de marcadores celulares envolvidos na fagocitose e apresentação antigênica seria de grande valor para avançarmos neste sentido. Os resultados apresentados referendam o grande potencial dos compostos oxadiazóis e em especial da molécula 2. Objeto de estudo em trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa, ficou aqui demonstrada mais uma vez sua atividade antitumoral e a descoberta da atividade imunomoduladora em MDMO.

## 7. CONCLUSÃO

Todos os compostos derivados 1,2,4-oxadiazol apresentaram atividade antiproliferativa em pelo menos uma das linhagens celulares utilizadas na etapa de triagem. Estes resultados nos levaram a selecionar a molécula 2 para prosseguimento do estudo empregando-a em abordagem antitumoral em células de B16-F10 de melanoma murino e em abordagem imunomoduladora em MDMO. Em ensaios de citotoxicidade a molécula 2 apresentou atividade citotóxica tanto em B16-F10 e MDMO, sendo 2,6 vezes mais seletiva para a linhagem tumoral. A investigação da via de morte em B16-F10 indicou que a molécula 2 causou a morte das células por necrose.

Os MDMO foram expostos a molécula 2, LPS e os sobrenadantes oriundo de melanoma murino empregados de forma isolada ou conjuntamente. Verificamos que todos foram capazes de polariza-los para o fenótipo M1. A exposição à molécula 2 foi induziu a produção de TNF- $\alpha$  na concentração de 66,35 $\mu$ M. A exposição aos sobrenadantes oriundos de B16-F10 induziram a produção de NO, TNF- $\alpha$  e IL-12. A exposição aos conjuntos de estimulação Sobrenadante A + molécula 2 e LPS + molécula 2 induziram a produção de NO, TNF- $\alpha$  e IL-12.

## 8. REFERÊNCIAS

ABD-ELLAH, H. S.; ABDEL-AZIZ, M.; SHOMAN, M. E.; BESHAR, E. A. M.; KAOUD, T.; AHMED, A. F. F. Bioorganic Chemistry inflammatory, COX inhibitory activities and ulcerogenic liability. **Bioorganic Chemistry**, v. 74, p. 15–29, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.06.003>>.

ABD EL-HAMEED, R. H.; MAHGOUB, S.; EL-SHANBAKY, H. M.; MOHAMED, M. S.; ALI, S. A. Utility of novel 2-furanones in synthesis of other heterocyclic compounds having anti-inflammatory activity with dual COX2/LOX inhibition. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 36, n. 1, p. 977–986, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/14756366.2021.1908277>>.

ABDULKHALEQ, L. A.; ASSI, M. A.; ABDULLAH, R.; ZAMRI-SAAD, M.; TAUFIQ-YAP, Y. H.; HEZMEE, M. N. M. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. **Veterinary World**, v. 11, n. 5, p. 627–635, maio 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.627-635>>.

AHMED, A.; TAIT, S. W. G. Targeting immunogenic cell death in cancer. **Molecular Oncology**, v. 14, n. 12, p. 2994–3006, dez. 2020. Disponível em: <<https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1878-0261.12851>>.

ANDERSON, N. R.; MINUTOLO, N. G.; GILL, S.; KLICHINSKY, M. Macrophage-based approaches for cancer immunotherapy. **Cancer Research**, v. 81, n. 5, p. 1201–1208, 2021.

ARAÚJO, H. M.; DE MOURA, G. A.; ROCHA, Y. M.; VIANA RODRIGUES, J. P.; NICOLETE, R. Oxadiazole Derivatives as Anticancer and Immunomodulatory Agents: A Systematic Review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 29, 2022.

ARAÚJO, H. M.; DE MOURA, G. A.; ROCHA, Y. M.; VIANA RODRIGUES, J. P.; NICOLETE, R. Oxadiazole Derivatives as Anticancer and Immunomodulatory Agents: A Systematic Review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 30, n. 30, p. 3472–3485, set. 2023. Disponível em: <<https://www.eurekaselect.com/209303/article>>.

ARNETH, B. Tumor Microenvironment. **Medicina**, v. 56, n. 1, p. 15, 30 dez. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1648-9144/56/1/15>>.

ATMARAM, U. A.; ROOPAN, S. M. Biological activity of oxadiazole and thiazole derivatives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 106, n. 9–10, p. 3489–3505, 2022.

BAGHBAN, R.; ROSHANGAR, L.; JAHANBAN-ESFAHLAN, R.; SEIDI, K.; EBRAHIMI-KALAN, A.; JAYMAND, M.; KOLAHIAN, S.; JAVAHERI, T.; ZARE, P. Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. **Cell Communication and Signaling**, v. 18, n. 1, p. 1–19, 2020.

BERRAONDO, P.; SANMAMED, M. F.; OCHOA, M. C.; ETXEBERRIA, I.; AZNAR, M. A.; PÉREZ-GRACIA, J. L.; RODRÍGUEZ-RUIZ, M. E.; PONZ-SARVISE, M.; CASTAÑÓN, E.; MELERO, I. Cytokines in clinical cancer immunotherapy. **British Journal of Cancer**, v. 120, n. 1, p. 6–15, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41416-018-0328-y>>.

BIERNACKI, K.; DAŠKO, M.; CIUPAK, O.; KUBIŃSKI, K.; RACHON, J.; DEMKOWICZ, S. Novel 1,2,4-oxadiazole derivatives in drug discovery. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 6, 2020.

BIRMPILIS, A. I.; PASCHALIS, A.; MOURKAKIS, A.; CHRISTODOULOU, P.; KOSTOPOULOS, I. V.; ANTIMISSARI, E.; TERZOUDI, G.; GEORGAKILAS, A. G.; ARMPILIA, C.; PAPAGEORGIS, P.; KASTRITIS, E.; TERPOS, E.; DIMOPOULOS, M. A.; KALBACHER, H.; LIVANIOU, E.; CHRISTODOULOU, M.-I.; TSITSILONIS, O. E. Immunogenic Cell Death, DAMPs and Prothymosin  $\alpha$  as a Putative Anticancer Immune Response Biomarker. **Cells**, v. 11, n. 9, p. 1415, 22 abr. 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4409/11/9/1415>>.

CÂNCER, I. N. do. **Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil**. [s.l: s.n.]v. 19991–6 p.

CANÈ, S.; UGEL, S.; TROVATO, R.; MARIGO, I.; DE SANCTIS, F.; SARTORIS, S.; BRONTE, V. The endless saga of monocyte diversity. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. August, p. 1–18, 2019.

CARBONE, M.; LI, Y.; IRACE, C.; MOLLO, E.; CASTELLUCCIO, F.; DI PASCALE, A.; CIMINO, G.; SANTAMARIA, R.; GUO, Y. W.; GAVAGNIN, M. Structure and cytotoxicity of phidianidines A and B: First finding of 1,2,4-oxadiazole system in a marine natural product. **Organic Letters**, v. 13, n. 10, p. 2516–2519, 2011.

CARVALHO, J. E. Molecular Link Mechanisms between Inflammation and Cancer. p. 3831–3852, 2012.

CASCIOFERRO, S.; ATTANZIO, A.; DI SARNO, V.; MUSELLA, S.; TESORIERE, L.; CIRRINCIONE, G.; DIANA, P.; PARRINO, B. New 1,2,4-oxadiazole nortopsentin derivatives with cytotoxic activity. **Marine Drugs**, v. 17, n. 1, p. 1–15, 2019.

CHATTERJEE, B.; SAHA, P.; BOSE, S.; SHUKLA, D. MicroRNAs: As Critical Regulators of Tumor- Associated Macrophages. [s.d.]

COSTA, A. C.; SANTOS, J. M. O.; GIL DA COSTA, R. M.; MEDEIROS, R. **Impact of immune cells on the hallmarks of cancer: A literature review****Critical Reviews in Oncology/Hematology**Elsevier Ireland Ltd, 1 dez. 2021.

D'ARCY, M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell Biology International**, v. 43, n. 6, p. 582–592, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/cbin.11137>>.

DE FREITAS, J. J. R.; DA SILVA, E. E.; REGUEIRA, J. L. L. F.; DE ANDRADE, S. A.; CALVALCANTE, P. M. M.; DE OLIVEIRA, R. N.; DE FREITAS FILHOA, J. R. 1,2,4-Oxadiazoles: Synthesis and applications. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p. 670–691, 2012.

DE OLIVEIRA, V. N. M.; DOS SANTOS, F. G.; FERREIRA, V. P. G.; ARAÚJO, H. M.; DO Ó PESSOA, C.; NICOLETE, R.; DE OLIVEIRA, R. N. Focused microwave irradiation-assisted synthesis of N-cyclohexyl-1,2,4-oxadiazole derivatives with antitumor activity. **Synthetic Communications**, v. 48, n. 19, p. 2522–2532, 2018a.

DE OLIVEIRA, V. N. M.; DOS SANTOS, F. G.; FERREIRA, V. P. G.; ARAÚJO, H. M.; DO Ó PESSOA, C.; NICOLETE, R.; DE OLIVEIRA, R. N. Focused microwave

irradiation-assisted synthesis of N-cyclohexyl-1,2,4-oxadiazole derivatives with antitumor activity. **Synthetic Communications**, v. 48, n. 19, 2018b.

DEB, P. K.; AL-SHAR'I, N. A.; VENUGOPALA, K. N.; PILLAY, M.; BORAH, P. In vitro anti-TB properties, in silico target validation, molecular docking and dynamics studies of substituted 1,2,4-oxadiazole analogues against Mycobacterium tuberculosis. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 36, n. 1, p. 869–884, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/14756366.2021.1900162>>.

FRANKEN, L.; SCHIWON, M.; KURTS, C. Macrophages: Sentinels and regulators of the immune system. **Cellular Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 475–487, 2016.

GALDIERO, M. R.; MARONE, G.; MANTOVANI, A. Cancer inflammation and cytokines. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 10, n. 8, p. 1–17, 2018.

GAO, J.; LIANG, Y.; WANG, L. Shaping Polarization Of Tumor-Associated Macrophages In Cancer Immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 13, n. June, p. 1–12, 2022.

GARG, A. D.; AGOSTINIS, P. Cell death and immunity in cancer: From danger signals to mimicry of pathogen defense responses. **Immunological Reviews**, v. 280, n. 1, p. 126–148, 2017.

GATELY, M. K.; CHIZZONITE, R.; PRESKY, D. H. Measurement of human and mouse interleukin-12. **Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]**, v. Chapter 6, p. 1–15, 2001.

GENTEK, R.; MOLAWI, K.; SIEWEKE, M. H. Tissue macrophage identity and self-renewal. **Immunological Reviews**, v. 262, n. 1, p. 56–73, 2014.

GLOMB, T.; SZYMANKIEWICZ, K.; ŚWIĄTEK, P. Anti-cancer activity of derivatives of 1,3,4-oxadiazole. **Molecules**, v. 23, n. 12, p. 1–16, 2018.

GOBEC, M.; TOMA, T.; MARKOVI, T.; MLINARI, I. Chemico-Biological Interactions analogs of resveratrol. v. 240, p. 200–207, 2015.

GONÇALVES, J. C. R.; SOBRAL, M. V. **Cultivo de células: da teoria à bancada**. João Pessoa: UFPB, 2020. 166 p.

GORDON, S.; PLÜDDEMANN, A.; MUKHOPADHYAY, S. Plasma membrane receptors of tissue macrophages: functions and role in pathology. **Journal of Pathology**, v. 250, n. 5, p. 656–666, 2020.

GRETEN, F. R.; GRIVENNIKOV, S. I. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. **Immunity**, v. 51, n. 1, p. 27–41, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.06.025>>.

GUO, Q.; JIN, Z.; YUAN, Y.; LIU, R.; XU, T.; WEI, H.; XU, X.; HE, S.; CHEN, S.; SHI, Z.; HOU, W.; HUA, B. New Mechanisms of Tumor-Associated Macrophages on Promoting Tumor Progression: Recent Research Advances and Potential Targets for Tumor Immunotherapy. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, 2016.

HABANJAR, O.; BINGULA, R.; DECOMBAT, C.; DIAB-ASSAF, M.; CALDEFIE-CHEZET, F.; DELORT, L. Crosstalk of Inflammatory Cytokines within the Breast

Tumor Microenvironment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 4, p. 1–40, 2023.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **The Hallmarks of Cancer Review evolve progressively from normalcy via a series of preCell**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)>.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **Hallmarks of cancer: The next generationCell4** mar. 2011.

HEGDE, P. S.; CHEN, D. S. Top 10 Challenges in Cancer Immunotherapy. **Immunity**, v. 52, n. 1, p. 17–35, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.12.011>>.

HUANG, B.; ZHANG, Y. Teaching an old dog new tricks: Drug discovery by repositioning natural products and their derivatives. **Drug Discovery Today**, v. 27, n. 7, p. 1936–1944, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.02.007>>.

JUN, J. C.; RATHORE, A.; YOUNAS, H.; GILKES, D.; POLOTSKY, V. Y. Hypoxia-Inducible Factors and Cancer. **Current Sleep Medicine Reports**, v. 3, n. 1, p. 1–10, 28 mar. 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s40675-017-0062-7>>.

KERNEUR, C.; CANO, C. E.; OLIVE, D. Major pathways involved in macrophage polarization in cancer. **Frontiers in immunology**, v. 13, n. October, p. 1026954, 2022.

KIM, J.; BAE, J. S. Tumor-associated macrophages and neutrophils in tumor microenvironment. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, 2016.

KOTAS, M. E.; MEDZHITOV, R. Homeostasis, Inflammation, and Disease Susceptibility. **Cell**, v. 160, n. 5, p. 816–827, fev. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867415001750>>.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; KEPP, O.; ZITVOGEL, L. Immunogenic cell death in cancer therapy. **Annual Review of Immunology**, v. 31, p. 51–72, 2013.

KUMAR, V.; PATEL, S.; TCYGANOV, E.; GABRILOVICH, D. I. The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. **Trends in Immunology**, v. 37, n. 3, p. 208–220, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2016.01.004>>.

LEE, B.; MUKHI, N.; LIU, D. Current management and novel agents for malignant melanoma. **Journal of Hematology and Oncology**, v. 5, p. 1–7, 2012.

LEI, X.; LEI, Y.; LI, J. K.; DU, W. X.; LI, R. G.; YANG, J.; LI, J.; LI, F.; TAN, H. B. Immune cells within the tumor microenvironment: Biological functions and roles in cancer immunotherapy. **Cancer Letters**, v. 470, n. July 2019, p. 126–133, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.11.009>>.

LI, M.; HE, L.; ZHU, J.; ZHANG, P.; LIANG, S. Targeting tumor-associated macrophages for cancer treatment. **Cell and Bioscience**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13578-022-00823-5>>.

LIN, Y.; XU, J.; LAN, H. Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: Biological roles and clinical therapeutic applications. **Journal of Hematology and Oncology**, v. 12,

n. 1, p. 1–16, 2019.

LIU, K. X.; JOSHI, S. “Re-educating” Tumor Associated Macrophages as a Novel Immunotherapy Strategy for Neuroblastoma. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. September, p. 1–17, 2020.

LUZZATTO, L.; PANDOLFI, P. P. Causality and Chance in the Development of Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 1, p. 84–88, 2015.

MACIEL, E.; NEVES, B. M.; SANTINHA, D.; REIS, A.; DOMINGUES, P.; TERESA CRUZ, M.; PITT, A. R.; SPICKETT, C. M.; DOMINGUES, M. R. M. Detection of phosphatidylserine with a modified polar head group in human keratinocytes exposed to the radical generator AAPH. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 548, p. 38–45, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2014.02.002>>.

MALYSHEV, I.; MALYSHEV, Y. Current concept and update of the macrophage plasticity concept: Intracellular mechanisms of reprogramming and M3 macrophage “switch” phenotype. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

MAMAN, S.; WITZ, I. P. A history of exploring cancer in context. **Nature Reviews Cancer**, v. 18, n. 6, p. 359–376, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41568-018-0006-7>>.

MARKOV, A. V.; SEN'KOVA, A. V.; POPADYUK, I. I.; SALOMATINA, O. V.; LOGASHENKO, E. B.; KOMAROVA, N. I.; ILYINA, A. A.; SALAKHUTDINOV, N. F.; ZENKOVA, M. A. Novel 3'-substituted-1',2',4'-oxadiazole derivatives of 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid and their o-acylated amidoximes: Synthesis and evaluation of antitumor and anti-inflammatory potential in vitro and in vivo. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 10, p. 1–41, 2020.

MARKOV, A. V.; SEN, A. V.; POPADYUK, I. I.; SALOMATINA, O. V. of 18  $\beta$  H-Glycyrrhetic Acid and Their O -Acylated Amidoximes : Synthesis and Evaluation of Antitumor and Anti-Inflammatory Potential In Vitro and In Vivo. [s.d.]

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428–435, 2008.

MELO DE OLIVEIRA, V. N.; FLÁVIA DO AMARAL MOURA, C.; PEIXOTO, A. dos S.; GONÇALVES FERREIRA, V. P.; ARAÚJO, H. M.; LAPA MONTENEGRO PIMENTEL, L. M.; PESSOA, C. do Ó.; NICOLETE, R.; VERSIANI DOS ANJOS, J.; SHARMA, P. P.; RATHI, B.; PENA, L. J.; ROLLIN, P.; TATIBOUËT, A.; NASCIMENTO DE OLIVEIRA, R. Synthesis of alkynylated 1,2,4-oxadiazole/1,2,3-1H-triazole glycoconjugates: Discovering new compounds for use in chemotherapy against lung carcinoma and Mycobacterium tuberculosis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 220, 2021.

MESHKANI, R.; VAKILI, S. **Tissue resident macrophages: Key players in the pathogenesis of type 2 diabetes and its complications**. [s.l.] Elsevier B.V., 2016. v. 46277–89 p.

MICHELE HOGAN, M.; VOGEL, S. N. Measurement of tumor necrosis factor and lymphotoxins. **Current Protocols in Immunology**, v. 2017, p. 6.10.1-6.10.7, 2017.

MOLINARO, ETELCIA MORAES; CAPUTO, L. F. G. A. **Capítulo 1: Biologia celular**

**e ultraestrutura.** [s.l: s.n.]234–236 p.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, dez. 1983. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022175983903034>>.

MUNIR, M. T.; KAY, M. K.; KANG, M. H.; RAHMAN, M. M.; AL-HARRASI, A.; CHOUDHURY, M.; MOUSTAID-MOUSSA, N.; HUSSAIN, F.; RAHMAN, S. M. Tumor-associated macrophages as multifaceted regulators of breast tumor growth. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 12, 2021.

MUPPIDI, J.; PORTER, M.; SIEGEL, R. M. Measurement of Apoptosis and Other Forms of Cell Death. **Current Protocols in Immunology**, v. 59, n. 1, p. 1–36, fev. 2004. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142735.im0317s59>>.

MUUL, L. M.; HEINE, G.; SILVIN, C.; JAMES, S. P.; CANDOTTI, F.; RADBRUCH, A.; WORM, M. Measurement of proliferative responses of cultured lymphocytes. **Current Protocols in Essential Laboratory Techniques**, v. 2011, n. SUPPL.94, p. 1–26, 2011.

NIRMALA, J. G.; LOPUS, M. Cell death mechanisms in eukaryotes. **Cell Biol Toxicol**, v. 36, n. 1, p. 145–164, 2019.

NOROUZI, S.; NOROUZI, M.; AMINI, M.; AMANZADEH, A.; NABIUNI, M.; IRIAN, S.; SALIMI, M. Two COX-2 inhibitors induce apoptosis in human erythroleukemia K562 cells by modulating NF- $\kappa$ B and FHC pathways. **DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, n. 1, p. 1–9, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s40199-015-0139-0>>.

OLIVEIRA, Valentina Nascimento e Melo de. Síntese e atividade biológica de glicoglicero-heterociclos funcionalizados com 1,2,3-triazol/1,2,4-oxadiazol. 2020. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2020.

ORECCHIONI, M.; GHOSHEH, Y.; PRAMOD, A. B.; LEY, K. Macrophage polarization: Different gene signatures in M1(Lps+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively activated macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. MAY, p. 1–14, 2019.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Website**. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/cancer>>. Acesso em: 1 jul. 2022.

PACE, A.; PIERRO, P. The new era of 1,2,4-oxadiazoles. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 7, n. 21, p. 4337–4348, 2009.

PAN, Y.; YU, Y.; WANG, X.; ZHANG, T. Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. December, 2020.

PETERS, J. M.; GONZALEZ, F. J. The Evolution of Carcinogenesis. **Toxicological Sciences**, v. 165, n. 2, p. 272–276, 2018.

PORTA-PARDO, E.; VALENCIA, A.; GODZIK, A. **Understanding oncogenicity of cancer driver genes and mutations in the cancer genomics era** FEBS Letters Wiley Blackwell, 1 dez. 2020.

POTENZA, M.; SCIARRETTA, M.; CHINI, M. G.; SAVIANO, A.; MAIONE, F.; D'AURIA, M. V.; DE MARINO, S.; GIORDANO, A.; HOFSTETTER, R. K.; FESTA, C.; WERZ, O.; BIFULCO, G. Structure-based screening for the discovery of 1,2,4-oxadiazoles as promising hits for the development of new anti-inflammatory agents interfering with eicosanoid biosynthesis pathways. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 224, 2021a.

POTENZA, M.; SCIARRETTA, M.; CHINI, M. G.; SAVIANO, A.; MAIONE, F.; D'AURIA, M. V.; DE MARINO, S.; GIORDANO, A.; HOFSTETTER, R. K.; FESTA, C.; WERZ, O.; BIFULCO, G. Structure-based screening for the discovery of 1,2,4-oxadiazoles as promising hits for the development of new anti-inflammatory agents interfering with eicosanoid biosynthesis pathways. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 224, p. 113693, 2021b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113693>>.

QIAN, Y.; QIAO, S.; DAI, Y.; XU, G.; DAI, B.; LU, L.; YU, X.; LUO, Q.; ZHANG, Z. Molecular-Targeted Immunotherapeutic Strategy for Melanoma via Dual-Targeting Nanoparticles Delivering Small Interfering RNA to Tumor-Associated Macrophages. **ACS Nano**, v. 11, n. 9, p. 9536–9549, 2017.

QIU, J.; ZOU, Y.; LI, S.; YANG, L.; QIU, Z.; KONG, F.; GU, X. Discovery of benzimidazole substituted 1, 2, 4-oxadiazole compounds as novel anti-HBV agents with TLR8-agonistic activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 244, n. October, p. 114833, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114833>>.

QU, X.; TANG, Y.; HUA, S. Immunological approaches towards cancer and inflammation: A cross talk. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. MAR, 2018.

RAHAT, M. A.; HEMMERLEIN, B. Macrophage-tumor cell interactions regulate the function of nitric oxide. **Frontiers in Physiology**, v. 4 JUN, n. June, p. 1–15, 2013.

ROCHA, Y. M.; MAGALHÃES, E. P.; DE MEDEIROS CHAVES, M.; MACHADO MARINHO, M.; NASCIMENTO E MELO DE OLIVEIRA, V.; NASCIMENTO DE OLIVEIRA, R.; LIMA SAMPAIO, T.; DE MENEZES, R. R. P. P. B.; MARTINS, A. M. C.; NICOLETE, R. Antiparasitary and antiproliferative activities in vitro of a 1,2,4-oxadiazole derivative on *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, v. 121, n. 7, p. 2141–2156, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00436-022-07554-z>>.

ROSTAM, H. M.; REYNOLDS, P. M.; ALEXANDER, M. R.; GADEGAARD, N.; GHAEMMAGHAMI, A. M. Image based Machine Learning for identification of macrophage subsets. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.

RYAN, B. M.; FAUPEL-BADGER, J. M. **The hallmarks of premalignant conditions: A molecular basis for cancer prevention** *Seminars in Oncology* W.B. Saunders, 1 fev. 2016.

SERRANO CARDONA, L.; MUÑOZ MATA, E. Paraninfo Digital. **Early Human Development**, v. 83, n. 1, p. 1–11, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.09.003>> <<http://dx.doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2014.01.002>> <[http://dx.doi.org/10.1016/S0378-3782\(12\)70006-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-3782(12)70006-3)> <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2341287914000763>> <<http://dx.doi.org/10.1016/>>.

- SICA, A.; ERRENI, M.; ALLAVENA, P.; PORTA, C. Macrophage polarization in pathology. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 21, p. 4111–4126, 2015.
- STEENSMA, D. P.; TIMM, M.; WITZIG, T. E. Flow cytometric methods for detection and quantification of apoptosis. **Methods in molecular medicine**, v. 85, p. 323–332, 2003.
- TACIAK, B.; BIAŁASEK, M.; BRANIEWSKA, A.; SAS, Z.; SAWICKA, P.; KIRAGA, Ł.; RYGIEL, T.; KRÓL, M. Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. **PLoS ONE**, v. 13, n. 6, p. 1–13, 2018.
- TAYLOR, P. R.; MARTINEZ-POMARES, L.; STACEY, M.; LIN, H. H.; BROWN, G. D.; GORDON, S. Macrophage receptors and immune recognition. **Annual Review of Immunology**, v. 23, p. 901–944, 2005.
- TÍMÁR, J.; HEGEDÜS, B.; RÁSÓ, E. The role of lipid signaling in the progression of malignant melanoma. n. May, p. 245–255, 2018.
- TODA, G.; YAMAUCHI, T.; KADOWAKI, T.; UEKI, K. Preparation and culture of bone marrow-derived macrophages from mice for functional analysis. **STAR Protocols**, v. 2, n. 1, p. 100246, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.xpro.2020.100246>>.
- TROUPLIN, V.; BOUCHERIT, N.; GORVEL, L.; CONTI, F.; MOTTOLA, G.; GHIGO, E. Bone marrow-derived macrophage production. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 81, p. 1–6, 2013.
- VAIDYA, A.; PATHAK, D.; SHAH, K. 1,3,4-oxadiazole and its derivatives: A review on recent progress in anticancer activities. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 97, n. 3, p. 572–591, 2021.
- VAN DEN BOSSCHE, J.; BAARDMAN, J.; DE WINTHER, M. P. J. Metabolic characterization of polarized M1 and M2 bone marrow-derived macrophages using real-time extracellular flux analysis. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2015, n. 105, p. 1–7, 2015.
- VAROL, C.; MILDNER, A.; JUNG, S. **Macrophages: Development and tissue specialization**. [s.l.: s.n.]v. 33643–675 p.
- WANG, H.; FRANCO, F.; HO, P. C. Metabolic Regulation of Tregs in Cancer: Opportunities for Immunotherapy. **Trends in Cancer**, v. 3, n. 8, p. 583–592, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trecan.2017.06.005>>.
- WANG, T.; VAN DER VLIES, A. J.; UYAMA, H.; HASEGAWA, U. Nitric oxide-releasing polymeric furoxan conjugates. **Polymer Chemistry**, v. 6, n. 44, p. 7737–7748, 2015.
- WARD, R. A.; FAWELL, S.; FLOC'H, N.; FLEMINGTON, V.; MCKERRECHER, D.; SMITH, P. D. Challenges and Opportunities in Cancer Drug Resistance. **Chemical Reviews**, v. 121, n. 6, p. 3297–3351, 2021.
- WU, T.; DAI, Y. Tumor microenvironment and therapeutic response. **Cancer Letters**, v. 387, p. 61–68, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.043>>.

WU, Y.; LI, J.; WU, J.; MORGAN, P.; XU, X.; RANCATI, F.; VALLESE, S.; RAVEGLIA, L.; HOTCHANDANI, R.; FULLER, N.; BARD, J.; CUNNINGHAM, K.; FISH, S.; KRYKBAEV, R.; TAM, S.; GOLDMAN, S. J.; WILLIAMS, C.; MANSOUR, T. S.; SAIHAH, E.; SYPEK, J.; LI, W. Discovery of potent and selective matrix metalloprotease 12 inhibitors for the potential treatment of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 1, p. 138–143, 2012.

YADAV, N.; KUMAR, P.; CHHIKARA, A.; CHOPRA, M. Development of 1,3,4-oxadiazole thione based novel anticancer agents: Design, synthesis and in-vitro studies. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 95, n. August, p. 721–730, 2017a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.110>>.

YADAV, N.; KUMAR, P.; CHHIKARA, A.; CHOPRA, M. Development of 1,3,4-oxadiazole thione based novel anticancer agents: Design, synthesis and in-vitro studies. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 95, n. July, p. 721–730, 2017b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.110>>.

YAO, Y.; XU, X. H.; JIN, L. Macrophage polarization in physiological and pathological pregnancy. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. MAR, p. 1–13, 2019.

YING, W.; CHERUKU, P. S.; BAZER, F. W.; SAFE, S. H.; ZHOU, B. Investigation of macrophage polarization using bone marrow derived macrophages. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 76, p. 1–8, 2013.

YOUSSEF, B. G. M.; GOUDA, A. M.; MOUSTAFA, A. H.; ABDELHAMID, A. A.; GOMAA, H. A. M.; KAMAL, I.; MARZOUK, A. A. Design and synthesis of new triarylimidazole derivatives as dual inhibitors of BRAFV600E/p38 $\alpha$  with potential antiproliferative activity. **Journal of Molecular Structure**, v. 1253, 2022.

ZAHEDI ASL, S.; GHASEMI, A.; AZIZI, F. Serum nitric oxide metabolites in subjects with metabolic syndrome. **Clinical Biochemistry**, v. 41, n. 16–17, p. 1342–1347, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.08.076>>.

ZHANG, J.; LU, Y.; PIENTA, K. J. Multiple roles of chemokine (C-C Motif) ligand 2 in promoting prostate cancer growth. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 102, n. 8, p. 522–528, 2010.

ZHANG, S. Y.; SONG, X. Y.; LI, Y.; YE, L. L.; ZHOU, Q.; YANG, W. B. Tumor-associated macrophages: A promising target for a cancer immunotherapeutic strategy. **Pharmacological Research**, v. 161, n. July, p. 105111, 2020a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105111>>.

ZHANG, X.; GONCALVES, R.; MOSSER, D. M. The isolation and characterization of murine macrophages. **Current Protocols in Immunology**, n. SUPPL. 83, p. 1–14, 2008.

ZHANG, Y.; ZHANG, Q.; ZHANG, J.; SONG, J.; LI, J.; HAN, K. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Synthesis and evaluation of 1,2,4-oxadiazole derivatives as potential anti-inflammatory agents by inhibiting NF- $\kappa$ B signaling pathway in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. v. 30, n. June, p. 1–6, 2020b.

ZIEDAN, N. I.; STEFANELLI, F.; FOGGI, S.; WESTWELL, A. D. Design, synthesis and pro-apoptotic antitumour properties of indole-based 3,5-disubstituted oxadiazoles.

**European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 10, p. 4523–4530, 2010.  
Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.07.012>>.

## 9. ANEXO I - Artigo relacionado à tese publicado como 1º autor

### Oxadiazole Derivatives as Anticancer and Immunomodulatory Agents: A Systematic Review

Send Orders for Reprints to [reprints@benthamscience.net](mailto:reprints@benthamscience.net)

Current Medicinal Chemistry, XXXX, XX, 1-00

1

#### SYSTEMATIC REVIEW ARTICLE

## Oxadiazole Derivatives as Anticancer and Immunomodulatory Agents: A Systematic Review

Héverton Mendes Araújo<sup>1</sup>, Gabriel Acácio de Moura<sup>1</sup>, Yasmim Mendes Rocha<sup>1</sup>, João Pedro Viana Rodrigues<sup>1</sup> and Roberto Nicolete<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacy, Federal University of Ceará (UFC), Fortaleza - CE, Brazil and Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz Ceará), Eusébio - CE, Brazil

**Abstract: Background:** Tumor plasticity processes impact the treatment of different types of cancer; as an effect of this, the bioprospecting of therapies from natural and/or synthetic compounds that can regulate or modulate the immune system has increased considerably. Oxadiazole derivatives are structures that exhibit diverse biological activities. Therefore, this review aimed to evaluate the activity of oxadiazole compounds against tumor cell lines and their possible immune-mediated mechanisms.

**Methods:** A search in PubMed, Web of Science, and Science Direct databases was carried out on studies published from January 1, 2004, to January 31, 2022, using "oxadiazole" in combination with the other descriptors "cancer" and "macrophage". Only experimental *in vitro* and *in vivo* articles were included. A similar search strategy was used in the Derwent Innovation Index database for technology mapping. The search was performed on Drugbank using the descriptor oxadiazole for commercial mapping.

**Results:** 23 oxadiazole studies were included in this review, and some biological activities linked to antitumoral and immunomodulation were listed. Oxadiazole derivatives inhibited tumor cell growth and proliferation, blocked cell cycle, modulated mitochondrial membrane potential, presented immunoregulatory activity by different mechanisms reducing proinflammatory cytokines levels and acted directly as selective inhibitors of the COX enzyme. There was an increase in oxadiazole patent publications in the last 11 years, with emphasis on chemistry, pharmacy and biotechnology applied to microbiology areas. Compounds with 1,2,4-oxadiazole isomer are predominant in patent publications and approved drugs as observed in the technological and commercial mapping.

**Conclusion:** Therefore, oxadiazole derivatives are therapeutic molecules that can be considered promising for the development of cancer therapies.

**Keywords:** Oxadiazoles, cancer, immunomodulation, inflammatory mediators, macrophages, chemotherapy.

#### 1. INTRODUCTION

Cancer is a heterogeneous syndrome that arises from multiple endogenous and exogenous factors that promote the mutation of several genes [1]. Genetic modifications give cancer the ability to bypass natural cell-cell contact limits, induce cell proliferation regardless of growth factors, and substantially modify metabolic pathways to maximize biological processes

efficiency [2]. Heterogeneity in the metabolic characteristics of human tumors continues to be a challenge for the development of more specific and effective therapies [3].

Living organisms rely on their immune systems to maintain homeostasis. By monitoring the presence of foreign pathogens and abnormal or transformed cells, the immune system can combat them [4]. Cancer immunotherapy uses natural mechanisms to enhance the effector functions of the immune system against cancer cells, so this technic appears to be promising [5]. Therefore, the study of bioactive molecules triggering immune responses may lead to improved pharmacologi-

\*Address correspondence to this author at the (Fiocruz Ceará), São José Street, S/N - Precabura Zip Code: 61773-270, Eusébio - Ceará - Brazil, Tel/Fax: (+55)85 3215-6458; E-mail: [roberto.nicolete@fiocruz.br](mailto:roberto.nicolete@fiocruz.br)

0929-8673/XX \$65.00+.00

© XXXX Bentham Science Publishers

## 10. ANEXO II - Artigos relacionados à tese publicado como coautor

Synthesis of alkynylated 1,2,4-oxadiazole/1,2,3-1H-triazole glycoconjugates:  
Discovering new compounds for use in chemotherapy against lung carcinoma  
and *Mycobacterium tuberculosis*

European Journal of Medicinal Chemistry 220 (2021) 113472

Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>

Synthesis of alkynylated 1,2,4-oxadiazole/1,2,3-1H-triazole glycoconjugates: Discovering new compounds for use in chemotherapy against lung carcinoma and *Mycobacterium tuberculosis*

Valentina Nascimento Melo de Oliveira<sup>b</sup>, Cybele Flávia do Amaral Moura<sup>a</sup>,  
Aline dos Santos Peixoto<sup>c</sup>, Vanessa Pinheiro Gonçalves Ferreira<sup>d,e</sup>,  
Héverton Mendes Araújo<sup>d,e</sup>, Lilian Maria Lapa Montenegro Pimentel<sup>c</sup>,  
Claudia do Ó Pessoa<sup>d</sup>, Roberto Nicoletti<sup>d,e</sup>, Janaina Versiani dos Anjos<sup>b</sup>,  
Prem Prakash Sharma<sup>f</sup>, Brijesh Rathi<sup>f</sup>, Lindomar José Pena<sup>g</sup>, Patrick Rollin<sup>h</sup>,  
Arnaud Tatibouët<sup>h</sup>, Ronaldo Nascimento de Oliveira<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Chemistry, Federal Rural University of Pernambuco, Dois Irmãos, 52071-900, Recife, Brazil  
<sup>b</sup> Department of Fundamental Chemistry, Federal University of Pernambuco, 50740-540, Recife, Brazil  
<sup>c</sup> Department of Immunology, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Brazil  
<sup>d</sup> Laboratório de Oncologia Experimental, Núcleo de Pesquisa em Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil  
<sup>e</sup> Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Recife, Brazil  
<sup>f</sup> Laboratory for Translational Chemistry and Drug Discovery, Department of Chemistry, Hansraj College University Enclave, University of Delhi, Delhi, India  
<sup>g</sup> Department of Virology, Oswaldo Cruz Foundation, Fiocruz, 50740-465, Recife, PE, Brazil  
<sup>h</sup> Université D'Orléans et CNRS, ICA, UMR 7311, BP 6759, F-45067, Orléans, France

**ARTICLE INFO**

**Article history:**  
Received 21 January 2021  
Received in revised form 8 April 2021  
Accepted 9 April 2021  
Available online 18 April 2021

**Keywords:**  
Glycosugar  
1,2,3-Triazole  
1,2,4-Oxadiazole  
Antitubercular activity  
Antiproliferative activity  
MD Simulations

**ABSTRACT**

A total of forty-three compounds were synthesized, including thirty-two new ones. Among those compounds, seventeen were selected and tested on human tumor cell lines: PC-3 (prostate adenocarcinoma), HCT-116 (colorectal tumor), NCIH-460 (lung carcinoma), SKMEL-103 (melanoma) and AGP-01 (gastric tumor). Alkynylated 1,2,4-oxadiazoles **2m**, **3g** and **3k** exhibited antiproliferative activities against NCIH-460 in culture. Alkynylated *N*-cyclohexyl-1,2,4-oxadiazoles **3a-m** and bis-heterocycle glucoglycero-1,2,3-triazole-*N*-cyclohexyl-1,2,4-oxadiazole derivatives **5a-k** and **6-11** were evaluated for their *in vitro* efficacy towards *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) H<sub>37</sub>Ra and H<sub>37</sub>Rv strains. In general, glycosugars conjugated to 1,2,4-oxadiazole via a 1,2,3-triazole linkage (**5a**, **5e**, **5j**, **5k**, and **7**) showed *in vitro* inhibitory activity against Mtb (H<sub>37</sub>Rv). The largest molecules bis-triazoles **10** and **11**, proved inactive against TB. Probably the absence of the *N*-cyclohexyl group in compound **8** and 1,2,4-oxadiazole nucleus in compound **9** were responsible for its low activity. Glucoglycero-triazole-oxadiazole derivatives **5e** (10 μM) and **7** (23.9 μM) were the most promising antitubercular compounds, showing a better selective index than when tested against RAW 264.7 and HepG2 cells. Vero cell were used to investigate cytotoxicity of compounds **5a**, **5h**, **5j**, **5k**, and these compounds showed good cell viability. Further, *in silico* studies were performed for most active compounds (**5e** and **7**) with potential drug targets, DprE1 and InhA of Mtb to understand possible interactions aided with molecular dynamic simulation (100ns).

© 2021 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

\* Corresponding author.  
E-mail address: [ronaldo.noliveira@ufpe.br](mailto:ronaldo.noliveira@ufpe.br) (R. Nascimento de Oliveira).

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113472>  
0223-5234/© 2021 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

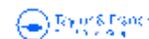
D.O.I. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113472>

Focused microwave irradiation-assisted synthesis of *N*-cyclohexyl-1,2,4-oxadiazole derivatives with antitumor activity



**Synthetic Communications**

An International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry



ISSN: 0039-7911 (Print) 1532-2432 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/lsyc20>

## Focused microwave irradiation-assisted synthesis of *N*-cyclohexyl-1,2,4-oxadiazole derivatives with antitumor activity

Valentina Nascimento Melo de Oliveira, Franciane Gonçalves dos Santos, Vanessa Pinheiro Gonçalves Ferreira, Héverton Mendes Araújo, Cláudia do Ó Pessoa, Roberto Nicolete & Ronaldo Nascimento de Oliveira

To cite this article: Valentina Nascimento Melo de Oliveira, Franciane Gonçalves dos Santos, Vanessa Pinheiro Gonçalves Ferreira, Héverton Mendes Araújo, Cláudia do Ó Pessoa, Roberto Nicolete & Ronaldo Nascimento de Oliveira (2018) Focused microwave irradiation-assisted synthesis of *N*-cyclohexyl-1,2,4-oxadiazole derivatives with antitumor activity, *Synthetic Communications*, 48:19, 2522-2532, DOI: [10.1080/00397911.2018.1509350](https://doi.org/10.1080/00397911.2018.1509350)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/00397911.2018.1509350>



View supplementary material ↗



Published online: 08 Oct 2018.



Submit your article to this journal ↗



Article views: 17



View Crossmark data ↗

Full Terms & Conditions of access and use can be found at  
<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=lsyc20>

D.O.I. <https://doi.org/10.1080/00397911.2018.1509350>