



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

JOSÉ YURI GOMES DA SILVA

**EFEITO DA INTERAÇÃO ENTRE FÁRMACOS INDUTORES DE MORTE
CELULAR IMUNOGÊNICA E PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO NO
ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO**

FORTALEZA -CE

2024

JOSÉ YURI GOMES DA SILVA

EFEITO DA INTERAÇÃO ENTRE FÁRMACOS INDUTORES DE MORTE CELULAR
IMUNOGÊNICA E PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO NO ESTRESSE DE
RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.
Orientador: Prof. Dr. Diego Veras Wilke.

FORTALEZA – CE

2024

JOSÉ YURI GOMES DA SILVA

EFEITO DA INTERAÇÃO ENTRE FÁRMACOS INDUTORES DE MORTE CELULAR
IMUNOGÊNICA E PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO NO ESTRESSE DE
RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.
Orientador: Prof. Dr. Diego Veras Wilke.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Diego Veras Wilke

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Lucas Antônio Duarte Nicolau

Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAr)

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)

D11e da Silva, José Yuri Gomes.

Efeito da interação entre fármacos indutores de morte celular imunogênica e proteínas de choque térmico no estresse de retículo endoplasmático / José Yuri Gomes da Silva. – 2024.
95 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2024.

Orientação: Prof. Dr. Diego Veras Wilke.

1. bioinformática. 2. docagem molecular. 3. quimioterapia. 4. western blotting. I. Título.

CDD 615.1

A Deus.

Aos meus pais, Cleide e João.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, sem os quais não teria conseguido passar dois dias nesta cidade grande que é Fortaleza. Sem os quais talvez nem tivesse conseguido realizar o sonho de ingressar na Universidade Federal do Ceará. Sem os quais nunca teria descoberto o que é amor de verdade. Passei boa parte da minha infância chorando escondido por ter sido doado pelos meus progenitores, hoje não consigo imaginar o quão melhor estou por ter conseguido uma família de verdade. É tudo por vocês e para vocês, para sempre.

Aos meus irmãos, em especial à irmã, Ivoneide. Obrigado por cuidar de mim desde cedo, por confiar e fazer o possível para me ver feliz. Obrigado por ter trazido ao mundo as minhas sobrinhas, Iara e Tainá, outras duas pessoas essenciais para mim. Aproveitando, obrigado, meninas, por compartilharem a infância e adolescência de vocês comigo, apesar da distância. Ao Cássio e ao Júnior, muito obrigado por todo apoio. À Ioneide, Micássio e Ana Cleide, obrigado por cuidarem da gente do outro plano.

Ao meu namorado e companheiro, Iago. Obrigado por fazer parte da minha vida e torná-la infinitamente melhor. Amo você. À Lara, Kátia, Dn. Neném, João, Inês. Obrigado por me aceitarem na casa de vocês e por estarem comigo por semanas seguidas. Ao Apolo e Novato, “obrigato” por tornarem meus dias mais felizes com o amor felino, e por não me arranharem quando passo horas abraçado contra a vontade de vocês.

Aos queridos amigos do LABBMar, Marcelo Peixoto, Marcelo Fernandes, Iandara e Talita. Um agradecimento especial ao “EdificandoMar”: Thais, Katharine, Clara e Eduardo e às meninas da CeGenBio, Maísa e Mariana. Obrigado não apenas pelas informações atualizadas do que ocorre ao nosso redor, mas por todo apoio, consideração e momentos de felicidade. Aos outros amigos que fiz pelo NPDM, em especial ao Robert (LOE), Isadora e Beatriz (FarmaGen).

Fico muito feliz em agradecer novamente ao Prof. Diego Wilke, por continuar aceitando orientar este outrora graduando, e agora mestrando. Obrigado por toda paciência, pelas discussões sobre ciência e por toda inspiração. Espero trabalhar com o senhor por muito mais tempo. Obrigado por me presentear com o desafio e agora prazer de conhecer e pesquisar sobre as HSPs.

Ao professor Pedro Noronha, por ter sido um verdadeiro orientador na bioinformática. Obrigado por me inspirar a ser um bom pesquisador e a compartilhar os conhecimentos adquiridos com o mundo. Obrigado pela ótima didática e por ter as melhores disciplinas ofertadas. Você é incrível!

Aos professores Bruno Anderson e Lucas Nicolau por terem aceitado fazer parte desta defesa de mestrado. Acredito que as contribuições serão incríveis. À dr. Sarah Sant'Anna por aceitar ser suplente da banca e à profa. Paula Jimenez, por ter participado da qualificação do trabalho e contribuído de forma admirável. Muito bom conhecer a senhora na USP.

Aos membros do LAFARMAR-USP, em especial à Amanda Hirata, que durante 40 dias me recepcionou, acompanhou e ensinou com bastante paciência as técnicas *in vitro* utilizadas neste trabalho. Foi muito bom conhecê-la e compartilhar assuntos e conhecimento. À prof. Letícia Lotufo por ter me recebido em seu laboratório, compartilhado conversas agradáveis e contribuído bastante durante as análises. Ao Elthon, muito obrigado por me apresentar São Paulo e por ser um ótimo companheiro de rolês e de discussões acadêmicas.

Aos meus amigos da graduação Daniel, Gabriel, Sara, Yvana e Wilker. Muito sucesso na vida acadêmica e pessoal de vocês. Aos queridos amigos da EEEP Pedro de Queiroz Lima, Pedro, Viviane e Jarlisson. Obrigado por tantos anos de amizade. Aos amigos que roubei do Iago: Lana, Beatriz e Isadora. Obrigado pela companhia incrível.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, por todo aprendizado adquirido. Obrigado por confiar a mim e ao Kalleu a representação discente. À Coordenação, especialmente aos professores Alexandre Havt e Roberto César. Às secretárias Laura e Milena, muito obrigado pelo trabalho incrível e dedicação.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pela concessão da minha bolsa de mestrado, sem a qual minha permanência em Fortaleza e no PPGF seriam impossíveis. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela ajuda de custo que permitiu minha viagem à São Paulo e realização dos experimentos *in vitro*. Aos auxílios financeiros que recebi do CNPq através da Rede PROSPECMAR e que ajudaram bastante nos gastos com a viagem.

Especialmente, agradeço a Deus, merecedor de toda honra e glória. Obrigado por cuidar de mim e das pessoas que amo, mesmo que de formas ininteligíveis para minha cabeça limitada. Obrigado por todo Amor divino.

Por fim, obrigado a quem leu esta sessão de agradecimentos. Foi um esforço torná-la um pouco menor que a minha vontade. Não sei se consegui. Obrigado por terem lido mesmo assim.

“A hora mais assustadora é sempre antes de
começar.” (Stephen King)

RESUMO

EFEITO DA INTERAÇÃO ENTRE FÁRMACOS INDUTORES DE MORTE CELULAR IMUNOGÊNICA E PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO NO ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

A resistência tumoral se caracteriza com um dos principais desafios enfrentados pela terapia oncológica, de modo que a busca de novos alvos e abordagens se torna necessária. A morte celular imunogênica (MCI) é um tipo raro de morte celular regulada seguida da apresentação de padrões moleculares associados a dano (DAMPs), capaz de levar a uma resposta imune tumor-específica, melhorando o prognóstico de pacientes e contornando a resistências. Entre os alvos promissores para o tratamento oncológico estão as proteínas de choque térmico ou HSPs. Os quimioterápicos indutores de MCI cisplatina e paclitaxel são capazes de inibir a chaperona HSP90. O presente trabalho investigou, a partir de metodologias *in silico*, a interação entre os quimioterápicos doxorubicina (DOX), daunorrubicina (DAU), etoposídeo, mitoxantrona (indutores de MCI), geldanamicina, 17-AAG (pan-inibidores de HSP90), estaurosporina (STA) e 5-FU (não indutores de MCI) e as subunidades N-terminal das chaperonas HSP90A e GRP94. As melhores interações *in silico* ocorreram entre os fármacos DOX, DAU e 17-AAG e a chaperona GRP94 e entre STA e a chaperona HSP90A. Os fármacos DOX e STA foram investigados quanto à indução de estresse de retículo (ER) nas linhagens humanas de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7. A modulação da expressão de proteínas relacionadas a ER foi investigada por western blotting e os fármacos foram incubados sozinhos e em combinação com os inibidores de IRE1 α (Kira6, 1 μ M) e de PERK (GSK2606414, 5 μ M). A incubação com STA levou ao aumento da expressão da proteína BiP na linhagem MDA-MB-231, enquanto a incubação com DOX causou a diminuição de BiP em MCF-7. A fosforilação de eIF2 α foi aumentada nos tratamentos com DOX e STA e revertida com o uso de GSK2606414 de forma mais eficiente em MCF-7. O ensaio de formação de colônias apontou uma diminuição significativa no crescimento celular em todos os tratamentos com quimioterápicos. Os inibidores de IRE1 α e PERK não apresentaram influência na formação de colônias, exceto Kira6 na linhagem MDA-MB-231. Os achados deste trabalho corroboram com os presentes na literatura para DOX e adicionam novas informações relacionadas ao ER induzido por STA.

Palavras-chave: bioinformática; docagem molecular; quimioterapia; western blotting.

ABSTRACT

EFFECT OF INTERACTIONS BETWEEN IMMUNOGENIC CELL DEATH-INDUCING AGENTS AND HEAT SHOCK PROTEINS ON ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS

Tumor resistance represents a significant challenge in oncology therapy, underscoring the necessity for new targets and treatment approaches. Immunogenic cell death (ICD) is a distinct form of regulated cell death characterized by the presentation of damage-associated molecular patterns (DAMPs). This process can elicit a tumor-specific immune response, thereby improving patient prognosis and overcoming resistance to treatment. Heat shock proteins (HSPs) have emerged as promising targets in oncology. Chemotherapeutic agents that induce ICD, such as cisplatin and paclitaxel, have the capacity to inhibit the chaperone HSP90. This study utilized *in silico* methodologies to examine the interactions between the chemotherapeutics doxorubicin (DOX), daunorubicin (DAU), etoposide, mitoxantrone (ICD inducers), geldanamycin, 17-AAG (pan-inhibitors of HSP90), staurosporine (STA), and 5-fluorouracil (5-FU) (non-ICD inducers) with the N-terminal subunits of the chaperones HSP90A and GRP94. The most favorable *in silico* interactions were observed between DOX, DAU, and 17-AAG with the chaperone GRP94, and between STA and the chaperone HSP90A. The effects of DOX and STA on endoplasmic reticulum (ER) stress were investigated in human breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF-7. The modulation of ER-related protein expression was assessed via western blotting, and the drugs were tested both individually and in combination with IRE1 α (Kira6, 1 μ M) and PERK (GSK2606414, 5 μ M) inhibitors. STA treatment led to an increase in BiP protein expression in the MDA-MB-231 cell line, whereas DOX treatment resulted in a decrease in BiP expression in MCF-7 cells. Phosphorylation of eIF2 α was elevated in response to both DOX and STA treatments, with GSK2606414 effectively reversing this effect in MCF-7 cells. Colony formation assays revealed a significant reduction in cell growth across all chemotherapeutic treatments. Inhibitors of IRE1 α and PERK had no significant impact on colony formation, except for Kira6 in the MDA-MB-231 cell line. The results of this study are consistent with existing literature on DOX and provide new insights into ER stress induced by STA.

Keywords: bioinformatics; molecular docking; chemotherapy; western blotting.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Características distintivas do câncer.	21
Figura 2 - Esquema do estresse de proteínas mal enoveladas – UPR.	26
Figura 3 - Estruturas das moléculas utilizadas para os ensaios <i>in silico</i>	34
Figura 4 - Exemplo de arquivo com configurações.....	37
Figura 5 – Comandos para iniciação do docagem molecular.	38
Figura 6 - Execução de Docagem Molecular com AutoDock Vina.....	39
Figura 7 - Página inicial do DockThor	40
Figura 8 - Estruturas sobrepostas das subunidades N-terminal das chaperonas HSP90A.	45
Figura 9 - Estruturas sobrepostas das subunidades N-terminal da chaperona GRP94.....	46
Figura 10 - Alinhamento entre as subunidades N-terminal das chaperonas HSP90A e GRP94.	47
Figura 11 - Poses das melhores afinidades entre doxorubicina e HSP90A.....	49
Figura 12 - Poses das melhores interações entre daunorrubicina e HSP90A.....	49
Figura 13 - Poses das melhores afinidades entre mitoxantrona e HSP90A.	50
Figura 14 - Poses das melhores afinidades entre etoposídeo e HSP90A.....	50
Figura 15 - Poses das melhores interações entre estaurosporina e HSP90A.....	51
Figura 16 - Poses das melhores interações entre doxorubicina e GRP94.....	53
Figura 17 - Poses das melhores interações entre daunorrubicina e GRP94.	53
Figura 18 - Poses das melhores interações entre tanespimicina e GRP94.	54
Figura 19 - Poses das melhores interações entre etoposídeo e GRP94.	54
Figura 20 - Poses das melhores interações entre estaurosporina e GRP94.	55
Figura 21 - Interações moleculares entre estaurosporina e 4NH7 (AutoDock Vina).....	56
Figura 22 - Interações moleculares entre estaurosporina e 4NH7 (DockThor).....	56
Figura 23 - Interações moleculares entre tanespimicina e 4NH9 (AutoDock Vina).	57
Figura 24 - Interações moleculares entre tanespimicina e 4NH9 (DockThor).....	58
Figura 25 - Interações moleculares entre doxorubicina e 7ULL (AutoDock Vina).	59
Figura 26 - Interações moleculares entre doxorubicina e 7ULL (DockThor).....	59
Figura 27 - Interações moleculares entre daunorrubicina e 7ULL (AutoDock Vina).	60
Figura 28- Interações moleculares entre daunorrubicina e 7ULL (DockThor).....	61
Figura 29 - Sobreposição das estruturas 4NH7 (HSP90A) antes e depois da interação com a estaurosporina.....	62

Figura 30 - Sobreposição das estruturas de GRP94 antes e depois da interação com os ligantes.	63
Figura 31 - Análises da expressão de proteínas relacionadas ao estresse de retículo em linhagens de câncer de mama.	66
Figura 32 - Razão das formas fosforilada e não fosforilada de eIF2 α	67
Figura 33 - Efeitos do tratamento com quimioterápicos na formação de colônias.	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Coordenadas das caixas - HSP90A (AutoDock Vina).....	37
Tabela 2 - Coordenadas das caixas - GRP94 (AutoDock Vina).....	37
Tabela 3 - Coordenadas das caixas - HSP90A (DockThor).....	40
Tabela 4 - Coordenadas das caixas - GRP94 (DockThor).....	41
Tabela 5 - Anticorpos utilizados para Western Blotting.	44
Tabela 6 - Valores de afinidade entre as subunidades N-terminal de HSP90A e alguns quimioterápicos citotóxicos.....	48
Tabela 7 - Valores de afinidade entre as subunidades N-terminal de GRP94 e alguns quimioterápicos citotóxicos.....	52
Tabela 8 - Valores de concentração inibitória média (CI ₅₀) obtidos no ensaio do MTT (n=3) nas linhagens de câncer de mama.	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

.pdb	Formato Protein Data Bank
.pdbqt	Formato Protein Data Bank para AutoDock
.sdf	Formato de Arquivo de Dados Espaciais (<i>Spatial data file</i>)
.txt	Formato de texto
17-AAG	7-N-alil-amino-17-demetoxigeldanamicina ou Tanespimicina
5-FU	5-Fluoruracil
BSA	Albumina sérica bovina
CI ₅₀	Concentração inibitória média
DAMP	Padrões Moleculares associados a dano (<i>Damage-associated molecular pattern</i>)
DAU	Daunorrubicina
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DOX	Doxorrubicina
ER	Estresse de retículo
ETO	Etoposídeo
GCO	Observatório Global do Câncer (<i>Global cancer observatory</i>)
HMGB1	Grupo de alta mobilidade box 1
HSP	Proteína de choque térmico (<i>Heat shock protein</i>)
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (<i>International agency for research on cancer</i>)
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Kcal/mol	Quilograma por mol
KDa	Quilodalton
LNCC	Laboratório Nacional de Computação Científica
MCI	Morte celular imunogênica

MTT	brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio
MTX	Mitoxantrona
RMSD	Raiz Quadrada do Desvio Quadrático Médio (<i>Root Mean Square Deviation</i>)
STA	Estaurosporina
ShRNA	RNA hairpin curto
TP II	Topoisomerase II
WHO	Organização Mundial de Saúde (<i>World Health Organization</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Câncer.....	18
1.2. Câncer de Mama.....	18
1.3. Oncogênese	20
1.4. Tratamento Oncológico	22
1.5. Morte Celular imunogênica.....	23
1.6. Estresse de retículo.....	25
1.7. Proteínas de choque térmico, estresse de retículo e MCI.....	27
1.8. Fármacos indutores de MCI	29
1.9. Busca por alvos moleculares utilizando ferramentas de bioinformática.....	30
2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS.....	33
3.1. Objetivo geral.....	33
3.2. Objetivos específicos.....	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1. Escolha das estruturas dos ligantes	34
4.2. Escolha das estruturas proteicas	34
4.3. Docagem Molecular	35
4.3.1. Preparo dos ligantes	35
4.3.2. AutoDock Vina	36
4.3.3. DockThor	39
4.4. Comparação e Análise dos resultados	41
4.5. Geração de imagens	41
4.6. Cultivo Celular	42
4.7. Ensaio de Viabilidade Celular	42
4.8. Ensaio de formação de colônias	42
4.9. Western Blotting.....	43
5. RESULTADOS.....	45
5.1. Alinhamento das estruturas proteicas.....	45
5.2. Docagem Molecular – HSP90A	48
5.3. Docagem Molecular – GRP94	51
5.4. Escolha e análise das interações.....	55

5.4.1. Interações estaurosporina e 4NH7 (HSP90A)	55
5.4.2. Interações tanespimicina e 4NH9 (GRP94).....	57
5.4.3. Interações doxorubicina e 7ULL (GRP94).....	59
5.4.4. Interações daunorrubicina e 7ULL (GRP94).....	60
5.5. Comparação entre as estruturas Pré-Docagem e Pós-Docagem.....	61
5.6. Determinação da Concentração Inibitória Média (CI ₅₀)	64
5.7. Avaliação da expressão de proteínas relacionadas ao estresse de retículo.....	64
5.8. Avaliação do efeito do tratamento na formação de colônias.....	68
6. DISCUSSÃO.....	71
7. CONCLUSÃO	86
REFERÊNCIAS	87

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

O termo câncer abrange um amplo grupo de doenças que culminam com a proliferação desordenada de células, podendo adquirir a capacidade de invadir tecidos adjacentes ou migrar, através da circulação sanguínea, para outros tecidos ou órgãos. Basicamente todos os tecidos do corpo podem desenvolver neoplasias malignas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022). Dados da Organização Mundial da Saúde (WHO) apontam que o câncer é a principal causa de morte mundialmente, contabilizando cerca de 10 milhões de óbitos em 2020, o que pode ser simplificado como uma a cada seis mortes ao redor do mundo. Além das complicações para a saúde, as neoplasias malignas causam impactos comerciais e sociais, influenciando direta e indiretamente na vida dos pacientes oncológicos, seus familiares, profissionais da saúde, comunidade e indústria farmacêutica (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022).

Entre as neoplasias mais impactantes considerando incidência de novos casos, estão os cânceres de mama, pulmão, cólon e reto, próstata, pele não melanoma e estômago, respectivamente. Apesar de não ocupar o ranking dos cinco órgãos com mais incidência de novas neoplasias, os cânceres de fígado ocuparam a terceira posição em relação à mortalidade. Outro destaque são os cânceres cervicais, que lideraram o ranking de mortalidade em mais de 20 países (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022).

Dados do Observatório Global do Câncer (GCO), programa da Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC) apontam que o número de novos casos de câncer no Brasil em 2022 foi superior a 627 mil. A agência também aponta que o número de mortes no mesmo ano aproximou-se dos 279 mil. Quando se considera o número de casos persistentes (com mais de cinco anos desde o diagnóstico), o País ultrapassa 1.600.000 casos (IARC, 2022). Dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), Órgão responsável pelo mapeamento das neoplasias em território nacional, preveem para o triênio 2023-2025 o diagnóstico de 704 mil novos casos de câncer. Entre os tipos mais representativos de câncer no Brasil estão o de pele não melanoma, próstata e mama, cólon e reto, pulmão e estômago (INCA, 2022a).

1.2. Câncer de Mama

Embora ocupem o segundo lugar de incidência e o quarto em morte considerando todos os sexos, as neoplasias de mama lideram o ranking de mortalidade e incidência quando consideradas pessoas do sexo feminino. Dados da Agência Internacional de Pesquisa do Câncer apontam que em 2022, cerca de 2,3 milhões de mulheres apresentaram neoplasias de mama,

enquanto o número de mortes pela doença se aproximou dos 667 mil (IARC, 2024). No Brasil, o cerca de 31% dos casos de câncer que acometem mulheres são de mama. Mais de 94 mil mulheres foram diagnosticadas e um número superior a 22 mil faleceu devido à neoplasia (IARC, 2024).

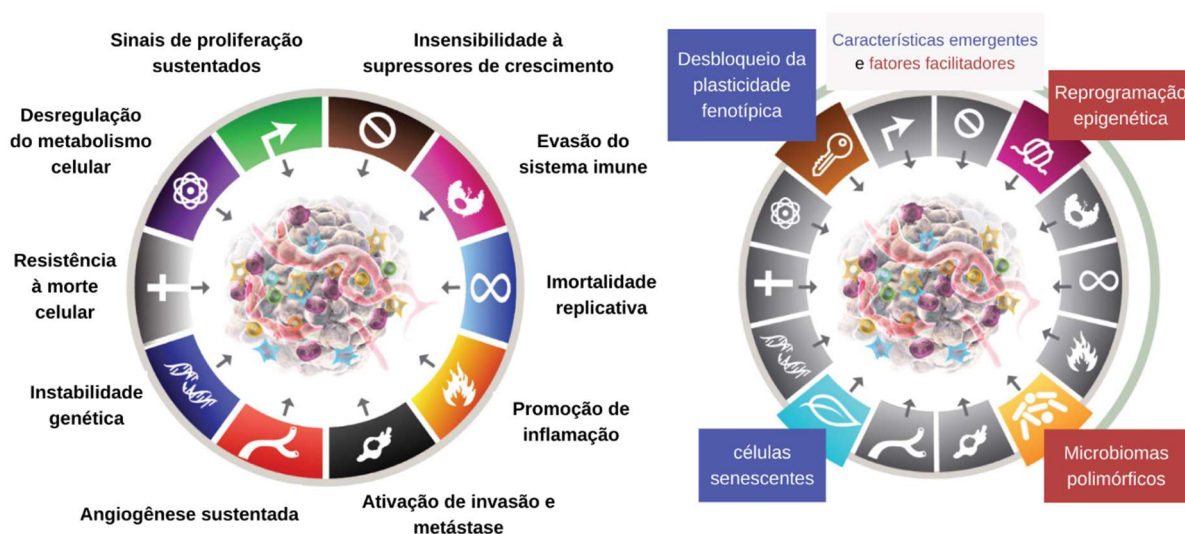
As neoplasias de mama possuem alta heterogeneidade a nível molecular, capazes de influenciar na eficácia e efeitos adversos durante o tratamento oncológico. Durante o estágio inicial, cujos tumores estão apenas na mama (ou se espalharam minimamente pelos linfonodos axilares), os cânceres de mama são considerados curáveis, especialmente durante o uso de terapias multimodais, eficazes em cerca de 80% dos pacientes. Todavia, tumores de mama metastáticos (em estágio avançado) são pouco capazes de cura com o uso de terapias multimodais, de modo que o principal objetivo da terapia oncológica é aumentar a sobrevida do paciente e garantir mais qualidade de vida através de tratamentos com toxicidade diminuída e controle de efeitos adversos (HARBECK et. al., 2019).

Aproximadamente 10% dos cânceres de mama estão relacionados ao histórico familiar. Esta porcentagem, entretanto, varia de acordo com fatores ambientais, étnicos, etc. Indivíduos cujo familiares de primeiro grau foram acometidos com a doença possuem uma chance aumentada em três vezes de desenvolverem câncer de mama. Em pacientes sem histórico familiar, o principal fator de risco para desenvolvimento de tumores de mama está relacionado à exposição hormonal. O estrogênio é um dos principais promotores para o surgimento de neoplasias de mama, ligando-se no receptor de estrogênio presente no núcleo e atuando como um fator de transcrição. Durante os ciclos menstruais, o desequilíbrio entre estrogênio e progesterona podem aumentar a proliferação celular das glândulas mamárias, levando ao acúmulo de mutações devido a alta taxa mitótica. O aumento da exposição ao estrogênio leva à proliferação de células pré-tumorais e de células do estroma, facilitando o desenvolvimento de neoplasias. O hormônio, após se ligar ao receptor de estrogênio, também é capaz de modular a expressão de genes de fatores de crescimento, permitindo o crescimento e progressão tumoral. Fármacos como o tamoxifeno, capazes de bloquear o efeito do estrogênio nas glândulas mamárias ou capazes de bloquear a produção do hormônio (a exemplo dos inibidores de aromatase) são eficazes em tumores de mama sensíveis a hormônios (HARBECK et. al., 2019). A depender do subtipo do tumor, outros quimioterápicos, como antraciclina e taxanos, bem como a combinação destes podem ser uma opção de tratamento, especialmente em tumores menos avançados.

1.3.Oncogênese

O processo de transformação de uma célula até adquirir um fenótipo tumoral é denominado oncogênese ou carcinogênese. Esse processo consiste em três estágios principais: Iniciação, promoção e progressão. Durante a iniciação, as células de um tecido, por ação de fatores carcinogênicos, endógenos ou ambientais, passam a sofrer modificações genéticas e/ou epigenéticas ainda não capazes de serem identificadas clinicamente. Durante a promoção, as células iniciadas continuam a acumular mutações, tornando-se malignas. Essas modificações permitem que as células passem a se dividir de forma desordenada enquanto adquirem ainda mais alterações moleculares, formando uma população heterogênea suscetível à seleção darwiniana. O estágio de sucessivas divisões pode ser denominado de progressão tumoral (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013; INCA, 2022b). Durante a progressão, as células sofrem pressões seletivas imunes e não imunes, de modo que para que um tumor sobreviva, é necessário contornar a identificação e combate orquestrados pelo sistema imunológico, bem como adequar o próprio funcionamento celular para que as diversas divisões celulares sejam possíveis sem levar as células do tumor à morte (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013). As alterações necessárias à formação e progressão tumoral, compartilhadas em vários tipos de neoplasias são denominadas como “características distintivas do câncer” (publicadas originalmente com o termo em inglês “*Hallmarks of cancer*”), e foram categorizadas pelos autores Hanahan e Weinberg (Figura 1), em três publicações que serão citadas e discutidas a seguir.

Figura 1 - Características distintivas do câncer.



Fonte: Traduzido de Hanahan, 2022. À esquerda, as características distintivas do câncer publicados em 2011 e à direita duas novas características emergentes, “desbloqueio da plasticidade fenotípica” e “células senescentes” e dois fatores que contribuem para a oncogênese, a “reprogramação epigenética” e a presença de “microbiomas polimórficos”.

O primeiro artigo das “Características distintivas do câncer”, publicado no ano 2000, apresenta os seis primeiros *Hallmarks*: Resistência à apoptose, sinais de proliferação sustentados, insensibilidade à inibidores de crescimento, invasão de outros tecidos e metástase, potencial replicativo ilimitado e angiogênese sustentada. Embora mantenham-se como características importantes para a oncologia, os conceitos foram aprimorados nos artigos posteriores, a exemplo da resistência à apoptose, que se tornou “resistência à morte celular” à medida em que os conhecimentos relacionados a outros processos de morte, como a autofagia, foram melhores compreendidos. Essas características são essenciais para o desenvolvimento tumoral, considerando que este se torna hábil para escapar da morte à despeito do funcionamento incorreto das funções fisiológicas, replicar-se de forma desordenada apesar dos sinais de inibição e permitir a nutrição e invasão de tecidos através da angiogênese (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Na segunda revisão, publicada em 2011, além das atualizações conceituais, foram adicionadas aos *Hallmarks* quatro novos pontos: Evasão do sistema imune, promoção da inflamação, instabilidade genética e desregulação do metabolismo celular. Enquanto as duas últimas complementam as características do artigo de 2000, elucidando de uma maneira mais específica como a própria obtenção e processamento de energia na célula tumoral ocorre e discutindo a instabilidade genética que permite a rápida adaptação do tumor aos desafios enfrentados durante a carcinogênese, as duas primeiras novas características adicionam uma

nova variável à compreensão do funcionamento de um tumor: O microambiente tumoral. Formado pelo próprio tumor e por células do sistema imune e de tecido conjuntivo, é no microambiente tumoral onde são liberadas moléculas, tanto pelo tumor, quanto pelos outros tipos celulares presentes, facilitando a proliferação celular, a evasão e modificação do sistema imune, transição epitelial-mesenquimal, metástases, entre outros acontecimentos pró-tumorais (HANAHAH; WEINBERG, 2011).

Considerando os novos dois *hallmarks* associados ao microambiente tumoral, o processo inflamatório promove um ambiente que funciona de duas maneiras principais, em momentos distintos da vida do tumor: Em estágios mais iniciais favorecendo a ocorrência de mutações por meio de liberação de espécies reativas de oxigênio, acelerando a oncogênese, e em um estágio seguinte, secretando moléculas como fatores de crescimento, contribuindo para o aumento da população de células tumorais. As células do sistema imunológico, por sua vez, perdem a capacidade de reconhecer e combater o tumor (imunovigilância) e passam a não somente tolerar a presença do tumor, mas secretar moléculas que auxiliam na manutenção deste (HANAHAH; WEINBERG, 2011).

Por fim, o último artigo da série “*Hallmarks of cancer*”, foi publicado em 2022. Nele, além da adição de duas novas características emergentes, desbloqueio da plasticidade fenotípica e células senescentes, foram adicionadas duas características facilitadoras, que possibilitam a ocorrência da oncogênese, os microbiomas polimórficos e a reprogramação epigenética (HANAHAH, 2022).

1.4. Tratamento Oncológico

As principais estratégias para o tratamento anticâncer são a cirurgia, a radioterapia, a quimioterapia, a imunoterapia, a hormonoterapia e a terapia alvo-dirigida (MILLER et al., 2022). Das abordagens citadas, a quimioterapia é a mais utilizada pelos pacientes oncológicos, seja em monoterapia, ou como estratégia terapêutica adjuvante (após um tratamento considerado principal, como a cirurgia) ou neoadjuvante (administrada anteriormente ao tratamento principal) (CHU; DEVITA JUNIOR, 2021). Uma das principais problemáticas relacionadas à quimioterapia é a toxicidade, considerando que apesar de atuarem principalmente em células tumorais, as moléculas citotóxicas são capazes de atingir tecidos saudáveis, levando o paciente a apresentar efeitos adversos como neuropatia periférica, caquexia e distúrbios gastrointestinais (QUINTÃO et al., 2019).

Considerando o papel desenvolvido pelo microambiente tumoral, especialmente pelas células da sistema imunológico, a imunoterapia tem sido uma das abordagens terapêuticas mais promissoras devido à capacidade de regular o microambiente, capacitando as células imunes para atacar e eliminar o tumor de diferentes formas (TAN; LI; ZHU, 2020). Contudo, mesmo sendo uma abordagem promissora, a imunoterapia pode ocasionar efeitos colaterais graves relacionados à atividade aumentada do sistema imune, como tempestade de citocinas, pneumonite, miocardite fetal e efeitos neurotóxicos potencialmente fatais (LI et al., 2022). Além da toxicidade relacionada à imunoterapia, duas outras barreiras relacionadas à resistência à abordagem podem dificultar o uso desta nos pacientes oncológicos. A resistência inata à imunoterapia ocorre quando, por imunossupressão ou diante de tumores “frios”, o paciente não apresenta uma resposta objetiva à terapia. No caso da resistência adquirida, à insensibilidade à imunoterapia ocorre após o início das administrações, seguida de progressão tumoral durante ou ao final do tratamento (O’DONNELL; TENG; SMYTH, 2019).

Uma outra forma de categorizar tumores se baseia nos componentes do microambiente tumoral, especialmente na presença ou ausência de linfócitos infiltrantes do tumor e da alta/baixa expressão de PD-L1, desenvolvida em 2015 por Teng e colaboradores. De acordo com esta classificação, um tumor pode ser considerado frio (quando possui tanto a expressão de PD-L1, quanto o nível de linfócitos T reduzidos), intermediário (quando apresenta um nível intermediário de células T ou células T apenas circundantes ao tumor e uma expressão intermediária de PD-L1) ou quentes (com as duas variáveis em níveis elevados) (TENG et al., 2015). A depender do perfil do microambiente tumoral, o paciente recebe prognósticos distintos. Para uma melhor efetividade da imunoterapia, é importante que a classificação esteja entre quente e intermediário, visto que tumores frios possuem uma maior dificuldade de resposta, e conseqüentemente, um prognóstico pior. Todavia, algumas estratégias podem ser utilizadas para tornar um tumor frio em quente, entre elas a indução de morte celular imunogênica (REN et al., 2022).

1.5.Morte Celular imunogênica

A morte celular imunogênica compreende um padrão de morte único que começa com um estresse organelar, principalmente no retículo plasmático, e culmina com a morte da célula seguida da apresentação de padrões moleculares associados a danos (DAMPs, do inglês *damage-associated molecular patterns*) e de citocinas às células imunes, em especial aos linfócitos T, que se tornam capazes de reconhecer as células tumorais e promover uma resposta

imune tumor-específica para combatê-las (GALLUZZI et. al., 2020; ZHOU et. al., 2019). Descrita inicialmente pelo grupo do pesquisador Guido Kroemer (CASARES et. al., 2005), a MCI tem sido uma estratégia eficaz para aumentar a imunogenicidade dos tumores e pode ser induzida por tratamentos oncológicos como a radioterapia, terapia fotodinâmica e por alguns quimioterápicos específicos, denominados como indutores de morte celular imunogênica (GALLUZZI et. al., 2020; CASARES et. al., 2005). Além do combate específico ao tumor, a MCI, através de eventos coordenados e liberação de DAMPs, leva à aquisição de memória imunológica, evento que leva à eliminação do tumor primário e combate aos focos metastáticos (RODRIGUES et al., 2022). Em 2018, o Comitê de Nomenclatura sobre Morte Celular (CNMC) definiu a MCI como uma forma de morte celular regulada suficiente para ativação de respostas imunes adaptativas em hospedeiros imunocompetentes. O estabelecimento da MCI, contudo, depende de dois parâmetros essenciais: A antigenicidade e a adjuvancidade (GALLUZZI et. al., 2018).

Células em processo de morte celular devem expressar antígenos que se liguem ao receptor de antígenos da célula T (TCR). Caso estes antígenos não tenham sido apresentados ao repertório de células T circulantes durante a seleção tímica, esse reconhecimento não ocorre. Desse modo, a morte celular regulada pode causar uma resposta imunogênica em um hospedeiro e não causar em outro, refletindo diferenças interindividuais no repertório de células T circulantes, independentemente da fonte de antígeno. Diante da ausência de antigenicidade, a morte celular regulada pode provocar lesões inflamatórias robustas relevantes para distúrbios não malignos, mas não eficientes na deflagração de respostas imunes adaptativas (GALLUZZI et. al., 2023). Entre os fatores que atuam influenciando a antigenicidade de tumores, ainda em indivíduos singênicos imunocompetentes estão a carga mutacional elevada que acompanha a própria oncogênese e progressão tumoral. Além disso, a antigenicidade de células tumorais está diretamente relacionada à apresentação do antígeno, de modo que defeitos genéticos e/ou epigenéticos que comprometam essa apresentação serão benéficos para o desenvolvimento e sucesso tumoral (GALLUZZI et. al., 2020).

No caso dos indutores de MCI, os DAMPs liberados durante a morte celular atuam potencializando a adjuvancidade. Quanto à classificação, os DAMPs são categorizados em três grupos: sinais pró-fagocíticos, moléculas imunoestimuladoras e citocinas/quimiocinas. A exposição da calreticulina no folheto externo da membrana plasmática em consequência à resposta integrada de estresse de retículo e a fosforilação do fator de iniciação da tradução eucariótica 2-alfa (eIF2 α) são os principais DAMPs pró-fagocíticos. Entre as principais

moléculas imunoestimuladoras estão o ATP, ativamente secretado por mecanismos relacionados à autofagia, bem como o grupo de alta mobilidade box 1 (HMGB1) e a anexina A1, ambos liberados do núcleo. Outra molécula secretada durante a morte celular imunogênica é a HSP90A e sua correspondente do retículo endoplasmático, GRP94. Por fim, entre os principais DAMPs do grupo das citocinas e quimiocinas estão o interferon tipo I (IFN) e o ligante 10 de quimiocina com motivo C-X-C (CXCL10) (FUCIKOVA et al., 2020).

Entre as perturbações na homeostase celular essenciais à deflagração da MCI estão os estresses organelares, em especial o estresse de retículo (ER), devido ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio e conseqüente estresse de proteínas mal enoveladas (UPR, do inglês *unfolded protein response*) (SPROOTEN et. al., 2023). A ocorrência de UPR é responsável pela translocação de proteínas do retículo endoplasmático, como a calreticulina e a GRP94 para a membrana citoplasmática, citada anteriormente como um dos principais sinais da ocorrência de morte celular imunogênica (ARIA; REZAEI, 2023).

1.6. Estresse de retículo

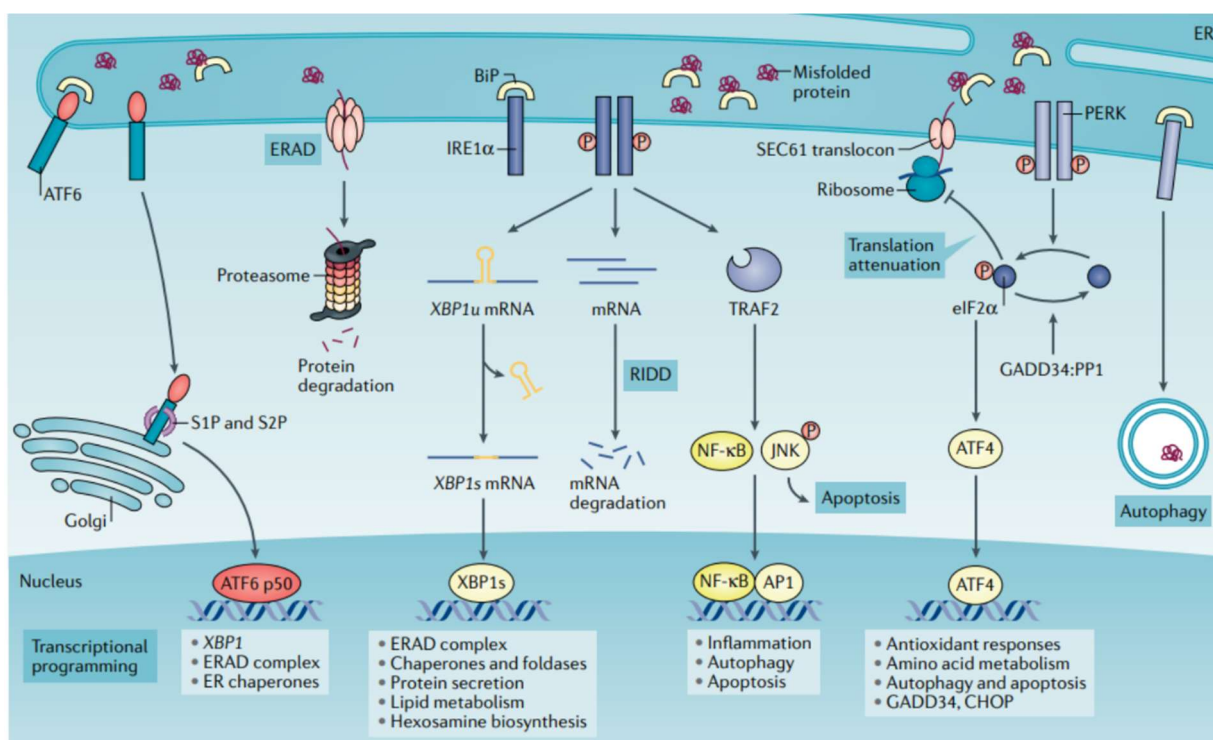
O retículo endoplasmático tem como principal função a síntese, enovelamento adequado, modificações pós-traducionais e distribuição da grande maioria das proteínas presentes nas células eucariontes. A manutenção correta da síntese, enovelamento e distribuição pode ser nomeada com proteostase (CHEN; CUBILLOS-RUIZ, 2020). Para tanto, é necessária a atuação de uma grande família de proteínas denominadas chaperonas, em especial as proteínas de choque térmico ou HSPs, do inglês *heat shock protein*. Considerando que a proteostase é uma condição complexa e que depende de uma gama de fatores, eventos de diversas naturezas, genéticas ou ambientais, podem levar à perturbação deste equilíbrio, causando a situação denominada como estresse de proteínas mal enoveladas (CHEN; CUBILLOS-RUIZ, 2022).

Três proteínas presentes na membrana do retículo endoplasmático atuam como sensores da homeostase proteica e de estresse de retículo: a Proteína ativadora do fator de transcrição 6 (ATF6, do inglês *activating transcription factor 6*), a Enzima 1 α dependente de Inositol (IRE1 α , do inglês *inositol-requiring enzyme 1 α*) e a Proteína quinase semelhante à quinase RNA de retículo endoplasmático (PERK, do inglês *Protein kinase RNA-like ER kinase*). Em condições de proteostase, as três proteínas sinalizadoras estão ligadas à chaperona HSP70 Proteína de ligação à imunoglobulina - BiP (do inglês *binding-immunoglobulin protein*) também conhecida com GRP78. A interação entre a BiP e as proteínas sinais mantém as vias de

estresse de retículo inativadas, todavia, após a perturbação desse equilíbrio causada pelo acúmulo de proteínas mal enoveladas no lúmen do ER, a BiP se desprende dos complexos na membrana da organela, permitindo que as três proteínas sinais iniciem uma cascata de sinalização (CHEN; CUBILLOS-RUIZ, 2022).

A figura 2 apresenta as cascatas relacionadas ao estresse de proteínas mal enoveladas. Como abordado anteriormente, em condições de homeostase, a proteína BiP se liga às três proteínas de sinalização de estresse de retículo, ATF6, IRE1 α e PERK. Por se tratar de uma chaperona, a afinidade de BiP por proteínas mal enoveladas é superior à afinidade pelas proteínas de sinalização, assim, durante o aumento da expressão de proteínas mal dobradas no lúmen do retículo endoplasmático, a chaperona se desprende dos complexos e passa a atuar na tentativa de voltar ao estado de equilíbrio (WALTER; RON, 2011).

Figura 2 - Esquema do estresse de proteínas mal enoveladas – UPR.



Fonte: Chen e Cubillos-Ruiz (2022). No esquema, é possível observar as três vias de sinalização de estresse de retículo, bem como os principais mediadores e vias relacionadas às modificações sofridas pelas células – especialmente às tumorais – em situações de estresse.

Após a ativação das vias de estresse de retículo, existem dois principais destinos para as células tumorais: A reprogramação celular e consequente manutenção da sobrevivência, ou a morte celular. Na verdade, para a grande maioria das células tumorais, a manutenção de um estresse de retículo leve e constante é benéfico, auxiliando na proliferação tumoral,

angiogênese, metástase, entre outros eventos pró-tumorais. Todavia, um estresse celular mais acentuado, normalmente num curto período de tempo (causado por drogas citotóxicas como a doxorubicina, por exemplo) leva à morte celular, tanto por apoptose, quanto, no caso dos indutores de MCI, à apoptose seguida de morte celular imunogênica (CHEN; CUBILLOS-RUIZ, 2022). Vale também ressaltar, que além dos efeitos celulares, a ativação de vias de estresse de retículo é capaz de influenciar no microambiente tumoral, especialmente nas células imunes. Por exemplo, a superexpressão de XBP1 (da via da PERK) e de ATF6 pode culminar com o declínio da apresentação de moléculas de MHC de classe 1 para células imunes, levando à evasão do sistema imune (ALMEIDA et. al., 2007; CHEN; CUBILLOS-RUIZ, 2022).

Diante da complexidade do ER, uma ampla gama de proteínas auxilia na manutenção da proteostase, especialmente as proteínas de choque térmico (HSPs). Descobertas em meados dos anos 1960, essas chaperonas recebem esta denominação por terem sido superexpressas após a exposição de cromossomos da mosca da frutas (*Drosophila melanogaster*) a temperaturas mais altas, levando ao “inchaço” de regiões específicas dos cromossomos (BIRBO et. al., 2021). As proteínas de choque térmico estão presentes em todos os organismos conhecidos, procarióticos e eucarióticos e estão envolvidas nos mais diversos processos celulares, desde ao enovelamento e correção de proteínas à modulação de processos imunes em organismos mais complexos. Além de presentes e altamente expressas ao longo dos táxons, as HSPs estão entre as proteínas mais conservadas ao longo do processo evolutivo (BIRBO et. al., 2021; SOMU et. al., 2024).

1.7. Proteínas de choque térmico, estresse de retículo e MCI

As proteínas de choque térmico representam um extenso grupo de polipeptídeos divididos de acordo com o peso molecular, assim, um membro da família das HSP90 possui um peso molecular aproximado de 90 quilodaltons (KDa). Ainda de acordo com o peso molecular, essas proteínas são categorizadas como pequenas HSPs (HSP10 e HSP27), HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 e as duas proteínas que juntas compõem o grupo das grandes HSPs, a chaperona HSP100 e ClpB (SOMU et. al., 2024). As HSPs estão distribuídas em diversos compartimentos celulares nas células eucarióticas, especialmente no citoplasma, retículo endoplasmático, mitocôndria, núcleo (HSP27) e na membrana celular (HSP27 em condições fisiológicas, embora outras chaperonas sejam expostas na membrana durante situações de estresse) (HANAHAN; WEINBERG, 2011; MARDAN-NIK et. al., 2014; SOMU et. al., 2024).

Diante de condições normais, cerca de 3% de todo o proteoma celular é composto por proteínas de choque térmico (BIRBO et. al., 2021). Após a oncogênese, a célula tumoral em progressão necessita de uma alta taxa de síntese proteica, caso contrário, não serão possíveis os processos de divisão celular, angiogênese, entre outros. Desse modo, uma célula tumoral é mais dependente do funcionamento adequado da maquinaria de síntese proteica quando comparada às células saudáveis. Assim, além do própria condição de estresse de retículo causada pelo aumento da síntese peptídica, a célula tumoral precisa aumentar a expressão de HSPs (WU et. al., 2017). Além da manutenção do enovelamento correto das proteínas, o aumento da expressão de chaperonas como HSP27, 70 e 90 atuam como mecanismos citoprotetores, diminuindo os níveis de estresse reticular e mantendo-o em intensidades aceitáveis. Não somente diante de cânceres, estudos apontam o aumento da expressão de chaperonas de choque térmico diante de estímulos como quimioterapia, inibição de tirosina-quinases, estresse oxidativo, dentre outros (SOMU et. al, 2024).

Considerando a importância das HSPs para a manutenção da homeostase celular, as chaperonas têm sido investigadas como alvos promissores no combate às neoplasias. Especialmente às chaperonas HSP60 (principalmente devido ao seu papel na resistência de tumores como cervicais resistentes ao 5-FU, além de outros mecanismos citoprotetores) (PACE et. al., 2013; WONG et. al., 2008), HSP70 e HSP90 (SOMU et. al., 2024). Enquanto as proteínas da família HSP70 atuam principalmente em processos de sinalização celular e recrutamento de outras co-chaperonas, as HSP90 atuam principalmente na correção das estruturas proteicas, embora, como já discutido anteriormente, também sejam capazes de atuar na sinalização e agirem como DAMPs diante da ocorrência de morte celular imunogênica (ARIA; REZAEI, 2023).

Diversas proteínas essenciais na sobrevivência de células tumorais são clientes da chaperona HSP90, entre elas as proteínas ERBB2, o “Guardião do genoma” p53, o receptor de fator de crescimento HER2, os proto-oncogenes B-Raf e C-Raf, o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), entre outros (SOMU et. al., 2024). Considerando que a grande maioria das proteínas clientes de HSP90 são mutadas e/ou superexpressas nas neoplasias malignas, a inibição da chaperona atua como uma abordagem farmacológica de combate ao câncer. Existem quatro formas principais de HSP90, as HSP90A e B, presentes no citoplasma, sendo a primeira a forma induzível e a segunda, constitutiva; a GRP94 (por vezes também chamada com HSP90B), ou endoplasmina, presente majoritariamente no ER (embora também ocorra no citosol) e a TRAP1, presente na mitocôndria (SREEDHAR et. al., 2004).

As estratégias de inibição de HSP90 consistem na utilização de inibidores nas três subunidades da proteína: A N-terminal, onde ocorrem as primeiras interações com o ATP e o estímulo para dimerização via C-terminal, a subunidade do meio e a subunidade C-terminal, onde a proteína dimeriza e se torna apta a desenvolver sua atividade biológica (BIRBO et. al., 2021). A subunidade N-terminal da HSP90 possui um bolso de ligação com ATP cuja estrutura é conservada não apenas entre membros da família HSP90, mas entre outros grupos proteicos, como girases e quinases. Os primeiros inibidores de HSP90 atuam nesta subunidade. Entre as principais moléculas pan-inibidoras de HSP90 estão a geldanamicina (natural), o 17-AAG ou tanespimicina (sintético) e o radicol (natural) (SOMU et. al., 2024).

O C-terminal de HSP90, por sua vez, tem um número menor de inibidores conhecidos, entre eles a novobiocina, um antibiótico obtido a partir de *Staphylococcus saprophyticus* e um conhecido inibidor de DNA girases, e alguns fármacos utilizados na clínica como antineoplásicos, entre eles o cisplatina e o taxol, ambos indutores de morte celular imunogênica.

1.8. Fármacos indutores de MCI

Embora sejam uma estratégia promissora no tratamento anticâncer, mais de 90% dos quimioterápicos citotóxicos não são capazes de induzir morte celular imunogênica (BEZU et al., 2018). Entre exemplos de moléculas citotóxicas indutoras de MCI estão as antraciclinas (doxorubicina, daunorrubicina e idarrubicina), os taxanos (paclitaxel e docetaxel), os análogos da platina (cisplatina e oxaliplatina), e o análogo de nucleosídeo gemcitabina (SPROOTEN et. al., 2023). Desse modo, a busca por novos agentes indutores de MCI deve ser realizada a fim de proporcionar melhores possibilidades de tratamento para os pacientes oncológicos. Além disso, a combinação entre fármacos indutores de MCI e não indutores, ou com abordagens imunoterapêuticas pode ser uma forma de melhorar o prognóstico de pacientes, como já apontam alguns estudos pré-clínicos e clínicos (GALLUZI et. al., 2023).

Uma das principais classes de indutores de MCI, as antraciclinas, estão entre os principais fármacos utilizados na quimioterapia. A doxorubicina (DOX), principal molécula do grupo, possui um amplo espectro de atuação, sendo utilizada no tratamento de neoplasias de mama, pulmão, gastrointestinais, ovário, tireoide, entre outros (GIURINI; GODLA; GUPTA, 2024). Entre os principais mecanismos de ação da DOX está a estabilização do complexo Topoisomerase II e DNA, impedindo a duplicação do DNA e consequentemente levando a célula à morte. No citoplasma, a antraciclina também é capaz de se ligar à subunidade 20S do

proteassoma, formando um complexo DOX-Proteassoma, levando o complexo até o núcleo através dos poros nucleares (VAN DER ZANDEN; QIAO; NEEFSJE, 2021). Além da interação direta com o DNA e a maquinaria relacionada ao material genético, uma outra característica da doxorrubicina crucial para a toxicidade é a promoção de estresse oxidativo. A porção quinona da antraciclina pode ser transformada em semiquinona por enzimas oxidoredutases, entre elas as do grupo citocromo P450. O grupo semiquinona pode se regenerar rapidamente, convertendo moléculas de oxigênio em espécies reativas de oxigênio, como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (VAN DER ZANDEN; QIAO; NEEFSJE, 2021). Todavia, a contribuição da produção de espécies de oxigênio pela doxorrubicina para a atividade anticâncer do fármaco ainda tem sido discutida e permanece incerta, de modo que aparenta ser um mecanismo de ação mais secundário.

1.9. Busca por alvos moleculares utilizando ferramentas de bioinformática

Abordagens *in silico* podem auxiliar tanto nos processos de descoberta e caracterização de novas drogas, quanto no reposicionamento de fármacos existentes para novos tratamentos, com custos e tempo de execução menores que os experimentais convencionais (GALATI et. al., 2021). Especialmente para produtos naturais, que geralmente são moléculas com características *multi-targets*, o uso de ferramentas computacionais permite a investigação da interação desses compostos com uma série de moléculas potencialmente alvos (ALMASRI, 2018; GALATI et. al., 2021). Em especial, o docking molecular é uma das principais abordagens computacionais empregadas para avaliar a interação molecular entre a potencial nova droga e os alvos, observando como as ligações que ocorrem entre os grupos atômicos e podendo até prever quais determinantes são capazes de otimizar a interação entre elas. Novas abordagens computacionais como o docking reverso também têm sido empregadas na pesquisa farmacológica a fim de investigar características moleculares importantes, como a determinação do(s) grupo(s) farmacofórico(s) dos compostos estudados (PINZI; RASTELLI, 2019).

2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Ocupando a primeira posição entre as principais causas de morte mundialmente, os cânceres impactam direta e indiretamente a vida dos pacientes, familiares, profissionais da saúde, indústria farmacêutica e na economia de modo geral. O trabalho de Chen et. al. (2023), realizou uma estimativa do impacto econômico dos 29 principais tipos de câncer em 204 países. O trabalho, considerando dados a partir de 2020, estimou um valor de pelo menos 25 trilhões (descartando do cálculo a inflação da moeda) de dólares gastados no tratamento oncológico até o ano de 2050. Dentre os valores estimados, mais de 7% serão destinados ao tratamento de tumores de mama, o terceiro com mais recursos destinados a nível mundial, e o primeiro em impacto orçamentário em países como Argélia e Brasil (CHEN et. al., 2023). A resistência tumoral, desse modo, aumenta o tempo de uso e dependência do paciente ao sistema de saúde. A busca por novos alvos e tratamentos se faz necessária a fim de contornar resistências e tornar os tumores novamente suscetíveis. A morte celular imunogênica é uma estratégia promissora para otimizar o tratamento e aumentar as chances de cura (GALLUZZI et. al., 2020; REN et al., 2022).

Dentre os alvos farmacológicos emergentes para o combate a neoplasias malignas estão as proteínas de choque térmico. Além de desenvolverem um papel importante na proteostase celular, as HSPs, especialmente HSP70 e HSP90, atuam no recrutamento e atividade das células do sistema imune (SOMU et. al., 2024). Estudos apontam que o uso combinado de inibidores de HSP90 e fármacos não indutores de MCI podem levar à ocorrência do fenômeno. Além disso, a utilização desses inibidores na imunoterapia e terapia fotodinâmica são capazes de potencializar os efeitos imunológicos (FU et. al., 2023; LEE et. al., 2011; LIU et. al., 2020). Fármacos indutores de MCI como a cisplatina e o paclitaxel possuem como um de seus *off-targets* a chaperona HSP90. Assim, é possível que a inibição da proteína tenha um papel importante para a imunogenicidade dos quimioterápicos indutores de MCI. Todavia, inibidores de HSP90 como monoterapia não aparentam ser tão eficazes em causar uma resposta imune necessária para MCI (LIU et. al., 2020; SOMU et. al., 2024). Considerando essas variáveis, é possível hipotetizar que fármacos que além de inibir chaperonas de choque térmico possuam outros mecanismos de citotoxicidade possam ser melhores indutores de morte celular imunogênica.

Nesse contexto, tendo a doxorrubicina como um potente indutor de morte celular imunogênica, é possível investigar se a antraciclina é capaz de interagir e inibir chaperonas de

choque térmico, especialmente a HSP90. De fato, o trabalho de WANG e colaboradores (2021), por meio da técnica de *microarray* de proteínas, identificou não somente a ligação entre a chaperona GRP94 (HSP90 presente no retículo endoplasmático) e a doxorrubicina, como considerou a interação como um das 27 melhores em um teste envolvendo mais de 400 alvos. Todavia, o trabalho de WANG et. al. (2021) continuou a investigação somente com os cinco melhores, de modo que a forma como essa interação ocorre e a relevância num contexto celular não foram exploradas.

Nesse cenário, o presente trabalho pretende, a partir de ferramentas *in silico*, investigar a interação entre produtos naturais citotóxicos, especialmente a doxorrubicina e as chaperonas de choque térmico HSP90. Além disso, através dos ensaios de docagem molecular, objetiva-se compreender se interação com as chaperonas pode ser um fator decisivo para a indução de morte celular imunogênica pelos fármacos investigados. O uso de ferramentas de bioinformática pretende atuar como um direcionamento para futuros ensaios fenotípicos a fim de compreender a relação entre inibição de HSP90 e imunogenicidade. Além da investigação *in silico* da interação entre chaperonas e os fármacos, àqueles mais promissores na triagem computacional serão investigados quanto à capacidade de promoção de estresse de retículo, crucial para a ocorrência de MCI.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar a interação entre quimioterápicos indutores e não indutores de morte celular imunogênica e as proteínas de choque térmico HSP90A e GRP94 e sua relação com a modulação das principais vias de estresse de retículo em células de câncer de mama.

3.2. Objetivos específicos

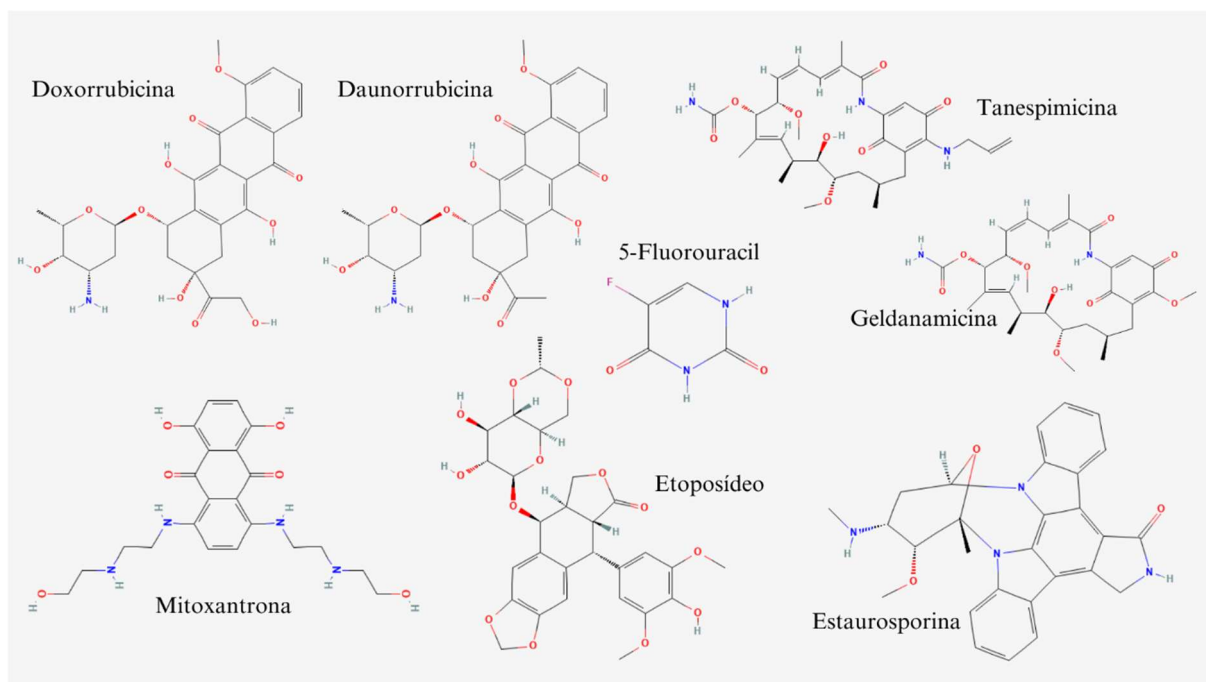
- Caracterizar a interação *in silico* de quimioterápicos indutores e não indutores de morte celular imunogênica e proteínas de choque térmico;
- Investigar a modulação de vias de estresse de retículo após incubação com quimioterápicos *in vitro*;
- Observar a influência do tratamento com quimioterápicos, sozinhos e combinados com inibidores de vias de estresse, na formação de colônias em culturas de células de câncer de mama.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Escolha das estruturas dos ligantes

Todas as estruturas 3D dos ligantes (Figura 3) foram obtidas através da plataforma PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) no formato .sdf. Para este trabalho, foram consideradas as estruturas das antraciclinas doxorubicina (PubChem CID 31703) e daunorrubicina (PubChem CID 30323), dos pan-inibidores de N-terminal de HSP90 tanespimicina ou 17-AAG (PubChem CID 6505803) e geldanamicina (PubChem CID 5281885), do fármaco antineoplásico antimetabólito 5-fluorouracil – 5FU (PubChem CID 3385); da antraquinona mitoxantrona (PubChem CID 4212), do semissintético derivado da podofilotoxina, etoposídeo (PubChem CID 36462) e a estrutura da estaurosporina (PubChem CID 44259), potente inibidor de tirosinas quinases.

Figura 3 - Estruturas das moléculas utilizadas para os ensaios *in silico*.



Fonte: Elaborado pelo autor. Estruturas obtidas do PubChem. As estruturas foram baixadas no formato .sdf e convertidas para .pdb a fim de possibilitar a docagem molecular.

4.2. Escolha das estruturas proteicas

As estruturas N-terminal das chaperonas HSP90A e HSP90B (GRP94) foram obtidas no repositório Protein Data Bank – PDB (<https://www.rcsb.org/>). Como representantes da chaperona de estresse térmico HSP90A foram selecionadas as estruturas 4NH7, 3WHA e 6GQ6.

A chaperona GRP94, por sua vez, está representada pelas estruturas 7ULL, 4NH9 e 1YT2. Todas as estruturas utilizadas foram obtidas experimentalmente, por meio da técnica de difração de raios X. Exceto pelas estruturas 1YT2, cristalizada na forma Apo (sem nenhuma molécula além dos resíduos de aminoácidos), todas os arquivos foram abertos previamente no *software* Pymol (<https://pymol.org/2/>) e tiveram seus ligantes excluídos a fim de evitar interferências do ligante prévio no realização dos testes.

A maioria das estruturas utilizadas são chaperonas da espécie humana, e tiveram como sistema de expressão heteróloga a bactéria *Escherichia coli* e a espécie de lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (na estrutura 4NH7). A única exceção é a estrutura 1YT2, chaperona GRP94 presente na espécie *Canis lupus familiaris*, o cão doméstico. Todavia, a escolha de manter a estrutura se dá devido à cristalização ter ocorrido na forma Apo, sem qualquer ligante. Além das proteínas de choque térmico como um todo serem bastante conservadas ao longo dos táxons, o alinhamento posterior das sequências aponta uma semelhança de 99% entre as estruturas.

A fim de identificar as semelhanças entre as estruturas, as sequências foram alinhadas utilizando a plataforma virtual Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>). Para tal, foi feito o *download* da sequência fasta das estruturas, disponíveis na página do PDB de cada uma delas. Os testes de alinhamento foram realizados tanto entre as subunidades da mesma proteína, quanto entre as estruturas 4NH7 e 4NH9, a fim de identificar as diferenças entre as sequências de aminoácidos nas duas proteínas. A escolha das duas estruturas para comparação ocorreu em decorrência de ambas terem sido obtidas num mesmo trabalho, publicado em 2014 por Ernst e colaboradores.

4.3. Docagem Molecular

4.3.1. Preparo dos ligantes

Após serem obtidos no PubChem, os ligantes no formato .sdf foram convertidos para o formato .pdb utilizando o software Pymol. Essa primeira preparação é necessária para a realização de Docagem molecular utilizando o AutoDock Vina, visto que, para preparo da estrutura, deve-se adicionar o ligante no formato .pdb, de modo que o software consiga identificar e otimizar os pontos de rotação da molécula. Considerando que o DockThor (<https://dockthor.lncc.br/v2/>) possui a própria metodologia de preparo de ligantes e proteínas,

não se faz necessário realizar essas análises prévias, sendo possível utilizar o arquivo recém extraído do PubChem como ligante. Todavia, a fim de manter uma uniformidade, foram submetidos à plataforma os arquivos no formato .pdb. O processo de preparação do ligante e da proteína nas duas plataformas utilizadas será discutido nos tópicos seguintes.

4.3.2. AutoDock Vina

O AutoDock Vina (TROT; OLSON, 2010) é um programa de código aberto que possibilita a realização de docagem molecular. Para a utilização do AutoDock Vina, é necessária a preparação dos ligantes e das estruturas proteicas, bem como a delimitação da “caixa”, espaço onde as possíveis interações entre proteína e ligante irão ocorrer.

Para preparação do polipeptídeo, o arquivo original, após *download* na plataforma PDB e no formato .pdb é adicionado à interface “AutoDock Tools”, que permite a visualização e preparação das estruturas analisadas via AutoDock Vina. Após adicionar à proteína ao programa, são necessários três passos principais para preparação da macromolécula: Remoção das estruturas de água, adição de átomos de hidrogênio (os quais podem não ser identificadas durante a cristalização de uma estrutura) e adição de cargas. No presente trabalho, apenas os hidrogênios polares foram adicionados às estruturas.

Quanto à adição de cargas, foram adicionadas à proteína as “Cargas de Kollman”. Nesse tipo de adição de cargas, o *software* utiliza o campo de força de Amber. Ao adicionar as cargas de Kollman em uma proteína, o cálculo das possíveis cargas é realizado com base na densidade eletrônica orbital da molécula. Após a adição das cargas, a molécula é salva em um arquivo na extensão .pdbqt, que será utilizada na análise pelo AutoDock.

Após finalizar o preparo das proteínas, a caixa foi determinada. As tabelas 1 e 2 apresentam os dados para as caixas nos ensaios com as HSP90A e B, respectivamente. Para tal, o sítio de ligação com o ATP nas estruturas foi delimitado e a caixa foi definida a partir disto. Após visualização da caixa no AutoDock Tools, é necessária a criação de um documento de texto contendo esses dados. Este arquivo deverá ser citado na linha de comando durante a execução do docagem. A figura 4 exemplifica o arquivo de texto necessário, contendo as informações da proteína, ligante, área de interação e outros elementos.

Tabela 1 - Coordenadas das caixas - HSP90A (AutoDock Vina).

PDB ID	Centro da Caixa	Tamanho da Caixa
3WHA	X = -26.917	X = 72
	Y = 25.997	Y = 86
	Z = -21.914	Z = 62
4NH7	X = 20.757	X = 82
	Y = 10.716	Y = 54
	Z = 17.261	Z = 80
6GQ5	X = -14.353	X = 72
	Y = 0.090	Y = 90
	Z = 5.177	Z = 60

Fonte: Autor.

Tabela 2 - Coordenadas das caixas - GRP94 (AutoDock Vina).

PDB ID	Centro da Caixa	Tamanho da Caixa
1YT2	X = 29.123	X = 64
	Y = 18.258	Y = 70
	Z = 22.513	Z = 48
4NH9	X = -13.65	X = 78
	Y = -30.727	Y = 84
	Z = -9.543	Z = 50
7ULL	X = -5.994	X = 60
	Y = 14.353	Y = 104
	Z = -6.554	Z = 108

Fonte: Autor.

Figura 4 - Exemplo de arquivo com configurações.

```
receptor= 7ULL1.pdbqt
ligand= 5FU.pdbqt

center_x= -5.994
center_y= 14.353
center_z= -6.554

size_x= 60
size_y= 104
size_z= 108

energy_range= 4
exhaustiveness= 32
```

Fonte: Autor. A criação de um arquivo de configurações é necessária para que o programa identifique a área onde as interações ocorrerão, caso contrário, proteína e molécula não interagem. O arquivo deve ser salvo em formato .txt e deve ser citado no código para iniciação do programa.

Finalizando os passos de preparação dos elementos para docagem molecular, deve-se preparar o ligante. Deste modo, a molécula no formato .pdb deve ser adicionada ao “AutoDock

Tools” permitindo a visualização da estrutura. Posteriormente, esta é selecionada como ligante, e automaticamente são identificados os possíveis pontos de rotação. Todas as moléculas utilizadas tiveram todos os seus pontos de rotação considerados. Semelhante ao que ocorre com as estruturas proteicas preparadas, o ligante também é salvo automaticamente no formato .pdbqt, possibilitando as análises pelo AutoDock Vina.

Após a preparação de todos as moléculas e parâmetros necessários para o ensaio, as estruturas foram adicionadas em pastas específicas e submetidas ao AutoDock Vina. Abriu-se o Prompt de comando do computador e selecionou-se a pasta utilizando o comando “CD + local da pasta”. Após a seleção do diretório onde os arquivos para análise estavam presentes, utilizou-se o código presente na Figura 5, culminando com a análise e iniciação do ensaio de docagem molecular com as estruturas selecionadas. A figura 6 apresenta os resultados apresentados ainda no Prompt de comando.

Figura 5 – Comandos para iniciação do docagem molecular.

```

Microsoft Windows [versão 10.0.22631.3155]
(c) Microsoft Corporation. Todos os direitos reservados.

C:\Users\yurid> cd C:\Users\yurid\Downloads\5FU-7ULL

C:\Users\yurid\Downloads\5FU-7ULL>"C:\Program Files (x86)\The Scripps Research Institute\Vina\vina.exe" --receptor 7ULL1.pdbqt --ligand 5FU.pdbqt --log log.txt --config config.txt --exhaustiveness=32 --out output.pdbqt

#####
# If you used AutoDock Vina in your work, please cite: #
# #
# O. Trott, A. J. Olson, #
# AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking #
# with a new scoring function, efficient optimization and #
# multithreading, Journal of Computational Chemistry 31 (2010) #
# 455-461 #
# #
# DOI 10.1002/jcc.21334 #
# #
# Please see http://vina.scripps.edu for more information. #
#####

WARNING: The search space volume > 27000 Angstrom^3 (See FAQ)
Detected 8 CPUs
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... |

```

Fonte: Autor. Delimitado pelo retângulo verde, o comando de seleção do diretório utilizado para obtenção dos arquivos. Destacado pelo retângulo azul, o código para início do programa seguido pelos arquivos utilizados e suas respectivas naturezas (proteína, ligante, arquivo de saída, etc). No final da imagem, a análise do sítio de ligação e da função de pontuação.

Figura 6 - Execução de Docagem Molecular com AutoDock Vina.

```

#####
WARNING: The search space volume > 27000 Angstrom^3 (See FAQ)
Detected 8 CPUs
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... done.
Using random seed: -1145204352
Performing search ...
0% 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100%
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
*****
done.
Refining results ... done.

mode |  affinity | dist from best mode
     | (kcal/mol) | rmsd l.b. | rmsd u.b.
-----|-----|-----|-----|
1      -5.2      0.000      0.000
2      -5.1      1.485      2.136
3      -4.8      2.887      4.045
4      -4.7      2.352      3.347
5      -4.6      22.850     23.636
6      -4.5      22.650     23.407
7      -4.5      11.436     12.313
8      -4.4      2.406      3.822
9      -4.4      2.569      3.080
Writing output ... done.

C:\Users\yurid\Downloads\5FU-7ULL>

```

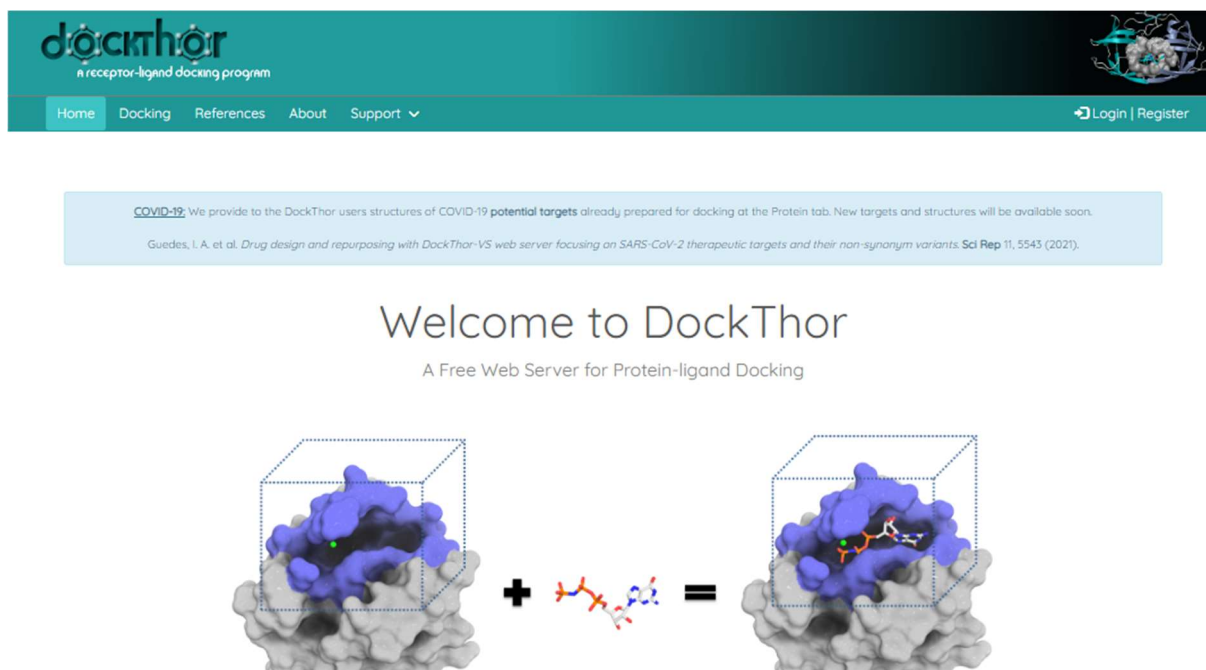
Fonte: Autor. Após a análise do sítio de ligação, determinado pela caixa pré-estabelecida, é possível acompanhar o progresso do experimento ainda no Prompt de comando. Ao finalizar as análises, o *software* apresenta as nove principais poses, seguidas da afinidade de ligação.

Os resultados exibidos no Prompt de comando também são disponibilizados num arquivo de texto, na mesma pasta com os resultados. A processo de análise e formação de imagens será discutido posteriormente, ainda na seção de metodologia.

4.3.3. DockThor

Como outra plataforma para realização de docagem molecular, foi escolhida a plataforma brasileira DockThor (<https://dockthor.lncc.br/v2/>). A figura 7 apresenta a página inicial da ferramenta gratuita, criada e mantida pelo Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC).

Figura 7 - Página inicial do DockThor



Fonte: Autor. Captura de tela da plataforma para docagem molecular, DockThor.

Para utilização do DockThor, deve-se primeiro adicionar a proteína, depois os cofatores e por fim, os ligantes. Neste trabalho, não se considerou a participação de cofatores, de modo que apenas as estruturas proteicas e os quimioterápicos foram adicionados. Após a adição das estruturas, foi definida a caixa onde a interação seria investigada, delimitando-se o sítio de ligação com ATP da subestrutura. As coordenadas das caixas estão disponíveis nas tabelas 3 e 4. Após a adição de todos os componentes e parâmetros do docagem, a plataforma realiza o experimento. Após finalizado, os resultados são disponibilizados via e-mail e podem ser baixados para análise e geração de imagens.

Tabela 3 - Coordenadas das caixas - HSP90A (DockThor).

PDB ID	Centro da Caixa	Tamanho da Caixa
3WHA	X = -26	X = 22
	Y = 26	Y = 22
	Z = -24	Z = 20
4NH7	X = 21	X = 22
	Y = 9	Y = 20
	Z = 16	Z = 23
6GQ6	X = -19	X = 22
	Y = 1	Y = 22
	Z = 7	Z = 22

Fonte: Autor.

Tabela 4 - Coordenadas das caixas - GRP94 (DockThor).

PDB ID	Centro da Caixa	Tamanho da Caixa
1YT2	X = 28	X = 21
	Y = 20	Y = 21
	Z = 21	Z = 21
4NH9	X = -19	X = 22
	Y = -35	Y = 22
	Z = -11	Z = 20
7ULL	X = -10	X = 21
	Y = 15	Y = 21
	Z = -8	Z = 21

Fonte: Autor.

4.4. Comparação e Análise dos resultados

Após a finalização dos ensaios de docagem, as afinidades de ligação foram tabeladas a fim de identificar as interações mais favoráveis. Cada ligante teve sua interação com cada estrutura nas duas plataformas de docagem molecular sobrepostas, permitindo visualizar se a pose do ligante era semelhante entre elas. As poses que se repetiram nas duas plataformas seguiram para análise posterior das interações.

4.5. Geração de imagens

Dois *softwares* foram utilizados para geração das imagens: O Pymol e o BIOVIA Discovery Studio (<https://www.3ds.com/products/biovia/discovery-studio>). O primeiro foi utilizado para visualização da proteína e localização do ligante, bem como para observar mudanças na conformação da proteína (característica denominada RMSD, do inglês “*Root Mean Square Deviation*”) após a interação com o ligante. Além disso, nas poses que se repetiam nas duas plataformas, o uso do Pymol se deu para analisar os resíduos de aminoácidos que interagem com o ligante a uma distância de até 3 angstroms.

O BIOVIA Discovery Studio, por sua vez, foi utilizado para obtenção dos diagramas de interação 2D, permitindo observar com quais resíduos de aminoácidos os ligantes interagem e qual a natureza dessas interações. Tanto as imagens geradas no Pymol, quanto os diagramas obtidos via Discovery Studio estão disponíveis posteriormente, na seção de resultados deste trabalho.

4.6. Cultivo Celular

Foram utilizadas as linhagens celulares MCF7 e MDA-MB-231, ambas linhagens humanas de adenocarcinoma de mama. O cultivo celular foi realizado utilizando o meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 1% de penicilina/estreptomicina 10u/mL (Gibco). O manuseio das linhagens foi realizado em câmara de fluxo laminar vertical e as culturas foram mantidas em incubadora de CO₂ a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. O crescimento celular foi acompanhado com auxílio de microscópio óptico invertido e o repique para meio de cultura novo foi feito quando necessário, respeitando o limite máximo de confluência a 70%. As células aderidas foram desprendidas com o auxílio de uma solução de tripsina-EDTA 0,25% (Gibco).

4.7. Ensaio de Viabilidade Celular

Para investigação do efeitos dos fármacos doxorubicina e estaurosporina na viabilidade e proliferação celular, foi realizado o ensaio calorimétrico do MTT. O ensaio se baseia na redução do sal brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio ou MTT para cristais e formazan de coloração roxa por células metabolicamente ativas. Essa redução é realizada por enzimas oxidorreduzases dependentes de NAD(P)H.

Para o plaqueamento, as células cultivadas nas garrafas, após tripsinizadas, foram contadas com o auxílio de Câmara de Neubauer. A solução com células foi então adicionada em placas de 96 poços (200uL/poço) em uma concentração de 4×10^4 células/mL, e após 24h, tratadas com as substâncias DMSO (controle negativo), doxorubicina e estaurosporina nas concentrações finais de 0,00032 a 5 μ M (estaurosporina) e 0,00064 a 10 μ M (doxorubicina). Após 19h ou 69h de tratamento, a solução do sal MTT (0,5mg/mL) foi adicionada e reincubada durante 3 horas. Ao final da incubação (24h ou 72h), o meio contendo MTT foi removido e os cristais de formazan formados foram solubilizados em DMSO para leitura em espectrofotômetro a 570nm. Os resultados foram obtidos de três experimentos realizados em duplicata e analisados através de regressão não linear pelo programa GraphPad Prism 8.0 para a determinação da concentração média inibitória (CI₅₀) juntamente com seu intervalo de 95%.

4.8. Ensaio de formação de colônias

As células das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 foram adicionadas em placas de Petri de 100mm com concentração de 5×10^4 células em 10mL. Após 24h, as linhagens foram

tratadas de acordo com os seguintes grupos: DMSO, doxorubicina, estaurosporina, Kira6 (inibidor de IRE1 α), kira6 + doxorubicina, kira6 + estaurosporina, GSK2606414 (inibidor de PERK), GSK2606414 + doxorubicina e GSK2606414 + estaurosporina. Os grupos com a presença de inibidores das vias de estresse de retículo foram pré tratados por 1h com os respectivos inibidores e então os fármacos foram adicionados à cultura. As concentrações dos fármacos doxorubicina (4 μ M) e estaurosporina (0,8 μ M) foram determinadas utilizando a CI_{50/2} adquiridas no ensaio do MTT. As concentrações dos inibidores das vias de estresse de retículo IRE1 α e PERK (1 μ M e 5 μ M, respectivamente), foram obtidas de acordo com a literatura.

Após 24h de tratamento, as células aderidas foram tripsinizadas e 1000 delas foram replaqueadas em placas de 35mm com meio de cultura livre de tratamento. As placas foram incubadas por um período de 9-13 dias, com troca de meio a cada 2-3 dias. As células foram fixadas e coradas com solução de 50% metanol e 0,5% de cristal violeta. As imagens foram geradas pelo equipamento G-Box (programa GeneSys) e analisadas por meio do software ImageJ (pacote ColonyArea).

4.9. Western Blotting

Em placas de Petri de 100mm, foram plaqueadas as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231, com concentração de 5×10^4 células em 10mL. Após 24h, realizou-se o tratamento com os seguintes grupos: DMSO, doxorubicina, estaurosporina, kira6, kira6 + doxorubicina, kira6 + estaurosporina, GSK2606414, GSK + doxorubicina e GSK + estaurosporina, de acordo com as concentrações e pré tratamento citados no tópico de ensaio de formação de colônias (sessão 4.8 deste trabalho).

A extração de proteínas totais foi feita pelo pellet proveniente do sobrenadante e de células tratadas. A solução tampão de extração era composta por: 10mM de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), 10% de Triton, 2mM de PMSF (fenilmetilsulfonilfluoreto), 100mM de TRIS-base, 10mM de pirofosfato de sódio, 100mM de fluoreto de sódio, 2,5mM de ortovanadato de sódio e água deionizada. O pellet foi ressuspensionado com solução e incubado por 40 minutos em gelo, seguido de 20 minutos de centrifugação de 14000 rpm, refrigerada a 4°C. O sobrenadante foi recuperado e as proteínas foram quantificadas com o reagente Bradford (Bio-Rad). As leituras das absorvâncias foram feitas pelo espectrofotômetro Multiskan FC (Uniscience) a 595 nm.

Após a quantificação, 30µg de proteínas foram separadas por peso molecular em gel de acrilamida (10%) por eletroforese (tampão Tris/Glycine/SDS – BioRad) e transferidas (tampão Tris/Glycine e 20% de metanol – BioRad) para membrana de nitrocelulose 0,45µm (BioRad). As etapas de bloqueio (1h de agitação) e incubação com anticorpos foram feitos com 5% de albumina (BSA) ou solução de 5% de leite em pó desnatado. A incubação com os anticorpos primários ocorreu em agitação refrigerada *overnight*. A incubação com os anticorpos secundários (*mouse* ou *rabbit*), por sua vez, ocorreu com 2h de agitação. As lavagens de membrana entre as etapas foram realizadas com solução TBS-T (0,8% de NaCl, 0,3% de Tris-base e 0,1% de Tween 20). As leituras das membranas foram realizadas com o equipamento G-Box (Syngene) através da reação com Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific). Para novas marcações, foi utilizado o tampão Stripping Buffer (Thermo Fisher Scientific). A tabela 5 apresenta os anticorpos utilizados para os testes.

Tabela 5 - Anticorpos utilizados para Western Blotting.

Anticorpo	Peso Molecular (KDa)	Origem	Diluição	Marca
HSP90	90	Rabbit	1:1000	Cell Signaling
BiP	78	Rabbit	1:1000	Cell Signaling
HSP70	70	Mouse	1:1000	Cell Signaling
XBP1s	60	Rabbit	1:1000	Cell Signaling
P-eIF2α	38	Mouse	1:1000	Cell Signaling
eIF2α	38	Rabbit	1:1000	Cell Signaling
Tubulina	52	Mouse	1:1000	Cell Signaling
Anti-rabbit IgG (HRP-linked)	-	-	1:3000	Cell Signaling
Anti-mouse IgG (HRP-linked)	-	-	1:3000	Cell Signaling

Fonte: Autor.

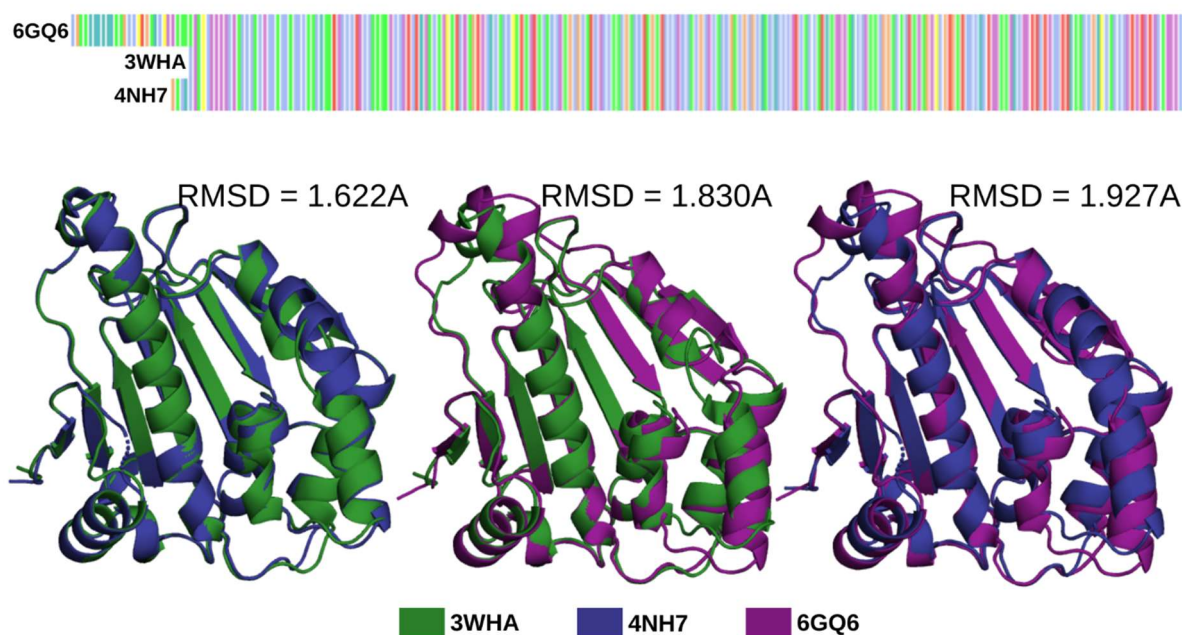
Para quantificação, as bandas obtidas das marcações foram analisadas no software ImageJ. Os pixels foram normalizados com seus respectivos controles internos (alfa-tubulina) e comparados com o controle negativo de cada experimento. Os valores de cada um dos três experimentos foram analisados no programa GraphPad Prism 8.0. Os dados passaram por verificação de normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e foram considerados não paramétricos. Em seguida, foram realizados os testes de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn. Os gráficos plotados são mostrados com os respectivos erros padrão da média (SEM).

5. RESULTADOS

5.1. Alinhamento das estruturas proteicas

As subunidades N-terminal das chaperonas HSP90A e GRP94 foram alinhadas utilizando a plataforma Clustal Omega. Além disso, as estruturas também foram sobrepostas utilizando o software Pymol. A figura 8 apresenta as estruturas alinhadas e sobrepostas das subunidades N-terminal das chaperonas HSP90A. Todas as águas e outras moléculas presentes nas estruturas foram removidas, de modo que apenas a estrutura proteica é ilustrada na imagem. Acima, as sequências alinhadas obtidas no Clustal Omega.

Figura 8 - Estruturas sobrepostas das subunidades N-terminal das chaperonas HSP90A.



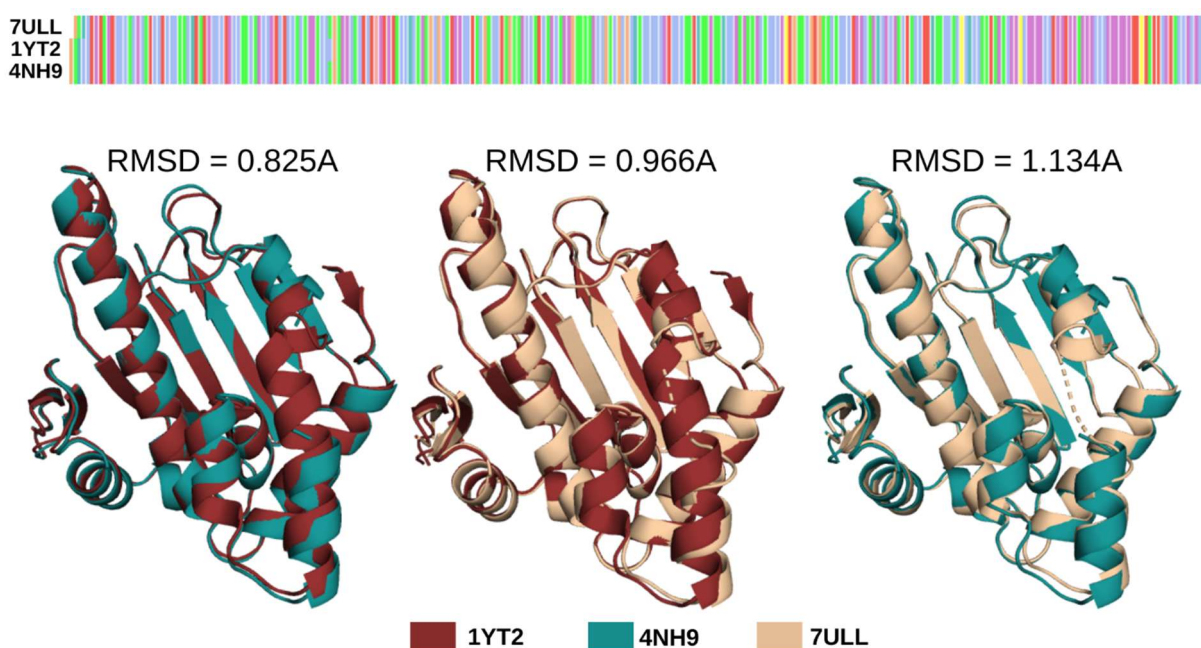
Fonte: Autor. No alinhamento das sequências (acima) foi realizado no Clustal Omega e cores semelhantes se referem ao mesmo resíduo de aminoácido.

A estrutura 3WHA é a menor entre as chaperonas utilizadas, e exceto pelo primeiro resíduo de aminoácido da sequência alinhada, uma metionina, que se assemelha ao quinto aminoácido da estrutura 4NH7, mas difere da sequência 6GQ6, que apresenta uma glutamina, todos os resíduos presentes se assemelham às outras duas sequências. Ao comparar a estrutura 6GQ6, a maior entre as três, com as outras duas, ambas apresentam uma semelhança de 89% entre si. A diferença ocorre justamente nos aminoácidos anteriores ao primeiro aspartato da sequência 3WHA. Quanto à sobreposição, o RMSD entre as estruturas 3WHA e 4NH7 foi igual

a 1.622, entre 3WHA e 6GQ6 igual a 1.830 e entre 4NH7 e 6GQ6 igual a 1.927. As diferenças de alinhamento nas estruturas refletem as condições experimentais nas quais cada uma foi cristalizada, os ligantes utilizados durante a cristalização e a própria análise de difração de raios X. Todavia, um RMSD inferior a 2 indica que, apesar das diferenças de conformação, as proteínas se mantêm semelhantes e podem ser comparadas.

A figura 9 apresenta os alinhamentos e sobreposição das subunidades N-terminal das chaperonas GRP94. As estruturas 4NH9 e 7ULL são chaperonas humanas, enquanto a estrutura 1YT2 está presente no proteoma da espécie *Canis lupus familiaris*, o cão doméstico. Todas as três subunidades foram expressas a partir do vetor bacteriano *Escherichia coli*. O alinhamento das sequências utilizando o *software* Clustal Omega aponta uma similaridade de mais de 99% entre as três sequências. Em relação ao alinhamento das estruturas, foram encontrados os seguintes valores de RMSD: 0.825 entre 1YT2 e 4NH9, 0.966 entre 1YT2 e 7ULL e 1.134 entre 4NH9 e 7ULL.

Figura 9 - Estruturas sobrepostas das subunidades N-terminal da chaperona GRP94.



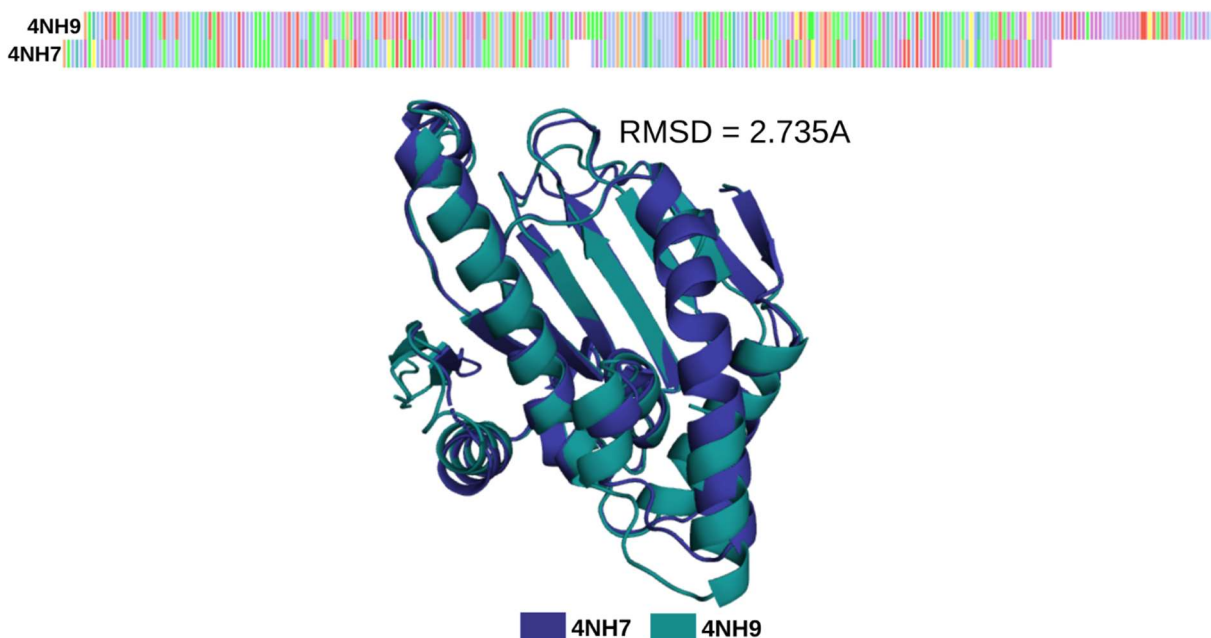
Fonte: Autor. No alinhamento das sequências (acima) foi realizado no Clustal Omega e cores semelhantes se referem ao mesmo resíduo de aminoácido.

O alinhamento entre as subunidades da mesma proteína permitiu a comparação e avaliação da similaridade entre diferentes estruturas. Esse passo permite a seleção de estruturas mais compatíveis e pode auxiliar na compreensão de diferentes interações com o mesmo

ligante, como discutiremos no próximo capítulo deste trabalho. Assim, após esses ensaios, foi possível evidenciar que ambas as estruturas são semelhantes entre si, especialmente as três estruturas da chaperona GRP94, que possuem quase 100% de similaridade na sequência de aminoácidos e RMSD abaixo e ou muito próximos de 1, mesmo que seus arquivos tenham sido obtidos ligados em moléculas diferentes (ou a nenhuma molécula, como ocorre com a estrutura 1YT2).

Por fim, para investigar o quanto as subunidades N-terminal das chaperonas HSP90A e GRP94 diferem entre si, foi realizado o alinhamento entre as sequências e entre as estruturas 4NH7 e 4NH9. Os resultados desta comparação estão disponíveis na figura 10. Diferente do que foi observado quando comparadas as subunidades da mesma proteína, o alinhamento aponta diferentes pontos onde os resíduos de aminoácidos diferem entre si. Além disso, quando levado em consideração o RMSD entre as estruturas, é possível observar um valor de 2.735, superior a 2, enquanto nas análises anteriores o valor máximo encontrado foi de 1.927. Apesar de diferentes, o alinhamento dessas estruturas ainda apresenta uma alta semelhança, de modo que é possível identificar que se tratam de subunidades de proteínas de uma mesma família.

Figura 10 - Alinhamento entre as subunidades N-terminal das chaperonas HSP90A e GRP94.



Fonte: Autor. No alinhamento das sequências (acima) foi realizado no Clustal Omega e cores semelhantes se referem ao mesmo resíduo de aminoácido.

5.2. Docagem Molecular – HSP90A

A tabela 6 apresenta as afinidades preditas entre as estruturas 3WHA, 4NH7 e 6GQ6 e os agentes anticâncer. A fim de aumentar o poder preditivo dos ensaios de docagem molecular, foram utilizadas duas plataformas distintas, o AutoDock Vina e o DockThor. Além da análise das afinidades, a segunda plataforma também apresenta outros resultados, como as energias de interações eletrostáticas e ligações de Van der Waals. Todavia, para a seleção das melhores interações foram consideradas apenas as afinidades. Desse modo, foram destacados na tabela os quatro maiores valores de afinidade em cada uma das plataformas e para cada uma das estruturas utilizadas.

Tabela 6 - Valores de afinidade entre as subunidades N-terminal de HSP90A e alguns quimioterápicos citotóxicos.

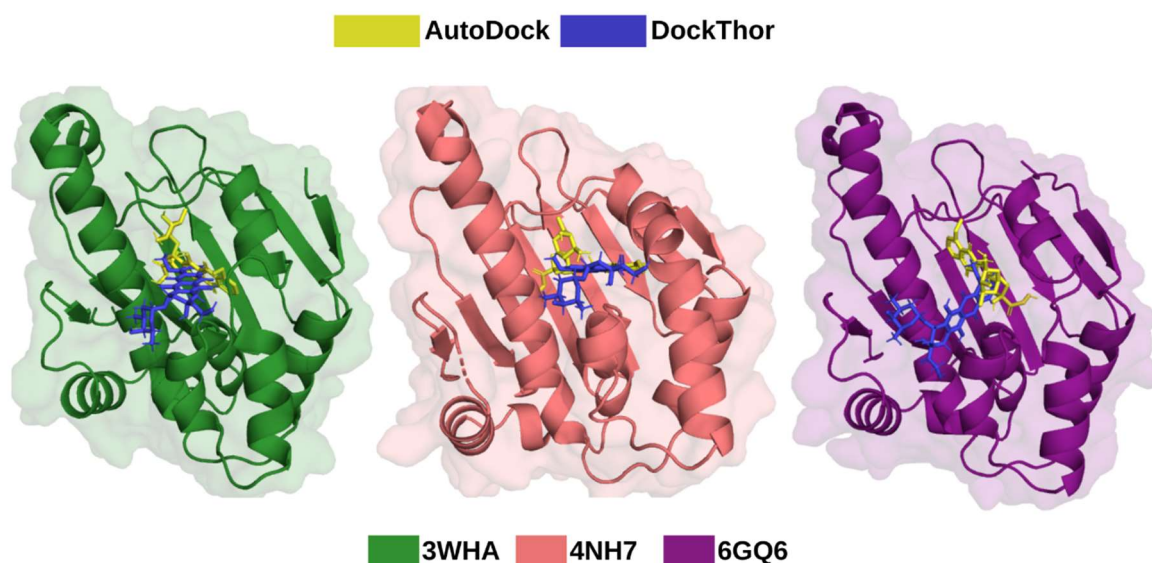
Quimioterápico	3WHA		4NH7		6GQ6	
	Afinidade (kcal/mol)					
	DockThor	AutoDock	DockThor	AutoDock	DockThor	AutoDock
Doxorrubicina	-8.531	-9.3	-8.988	-8.7	-7.541	-8.5
Daunorrubicina	-9.647	-8.3	-9.003	-8.6	-7.131	-8.7
Tanespimicina	-8.564	-7.8	-9.515	-7.8	-8.376	-6.6
Geldanamicina	-9.119	-8.2	-8.772	-6.7	-8.719	-7.1
5FU	-6.692	-5.3	-6.697	-5.1	-6.645	-5.3
Mitoxantrona	-8.966	-7.2	-8.763	-8.7	-7.641	-6.9
Etoposídeo	-8.765	-8.5	-8.760	-8.4	-7.352	-7.9
Estaurosporina	-9.488	-10.0	-9.726	-9.7	-7.223	-7.6

Fonte: Autor. As melhores interações em cada um dos testes estão apresentadas em verde.

Considerando quantas vezes cada um dos quimioterápicos aparecem entre as melhores afinidades em cada um dos testes, foram escolhidos para as análises das interações as antraciclina doxorrubicina (DOX) e daunorrubicina (DAU) e a estaurosporina (STA), cada uma com cinco melhores resultados. As moléculas mitoxantrona (MTX) e etoposídeo (ETO) também seguiram para análise das melhores interações, cada uma com três melhores afinidades.

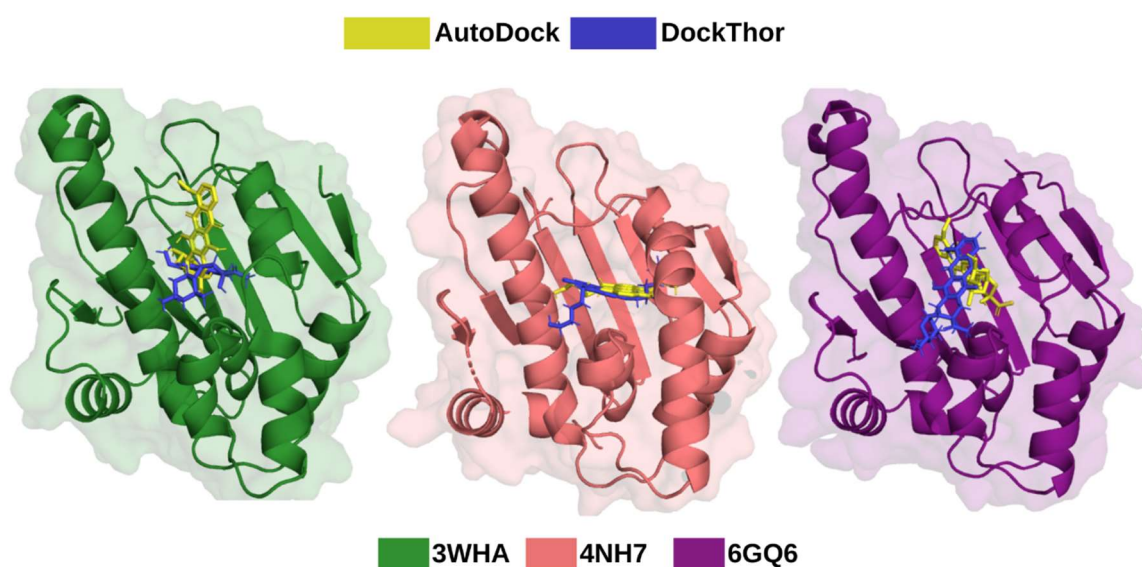
As figuras a seguir apresentam a sobreposição das poses de melhor afinidade predita em cada uma das estruturas. A figura 11 apresenta as interações entre as três estruturas e a DOX, a figura 12 com a DAU, a figura 13 com a MTX, a figura 14 com o ETO e por fim, a figura 15 apresenta as poses das melhores afinidades preditas entre as subestruturas e a STA.

Figura 11 - Poses das melhores afinidades entre doxorubicina e HSP90A.



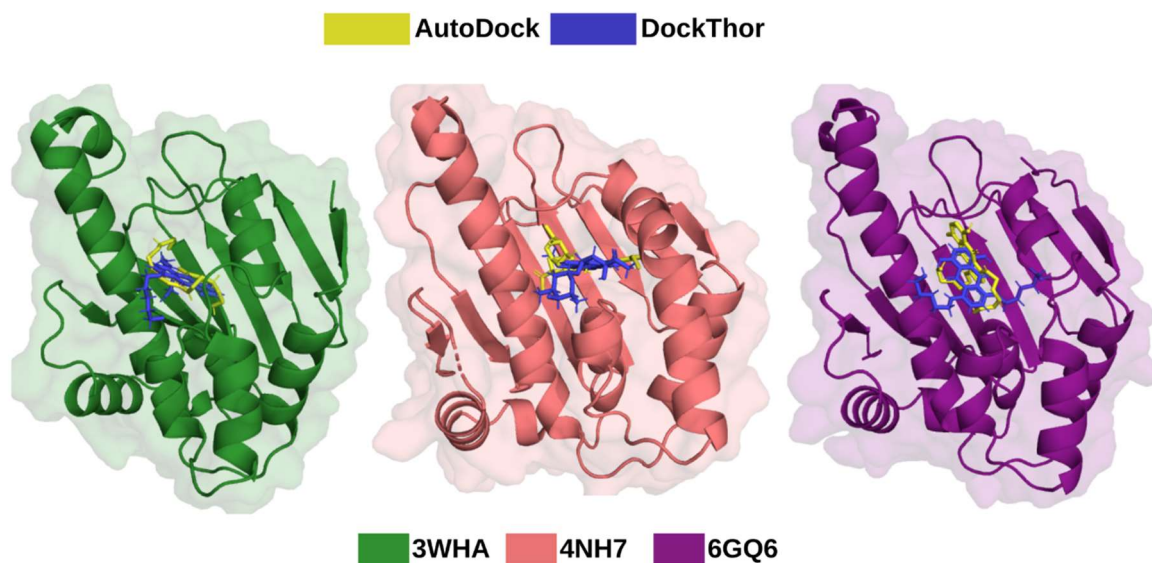
Fonte: Autor. As figuras apresentam as interações entre a doxorubicina e cada uma das estruturas de N-terminal de HSP90. As moléculas em azul se referem à doxorubicina analisada via DockThor, enquanto em amarelo estão as analisadas via AutoDock Vina.

Figura 12 - Poses das melhores interações entre daunorrubicina e HSP90A.



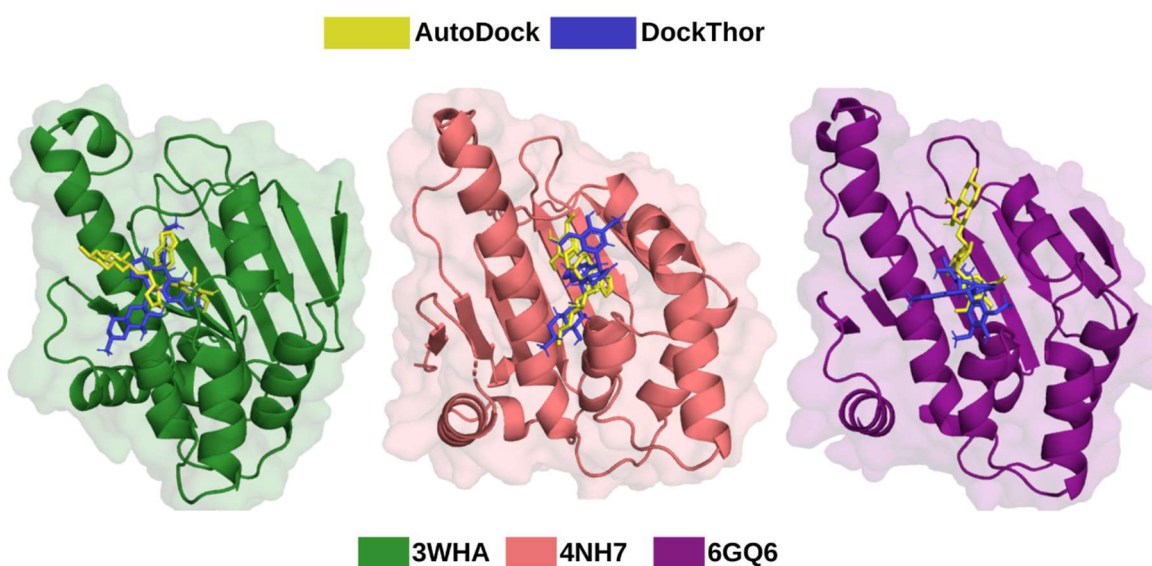
Fonte: Autor. As figuras apresentam as interações entre a antraciclina daunorrubicina e cada uma das estruturas de N-terminal de HSP90. As moléculas em azul se referem à daunorrubicina analisada via DockThor, enquanto em amarelo estão as analisadas via AutoDock Vina.

Figura 13 - Poses das melhores afinidades entre mitoxantrona e HSP90A.



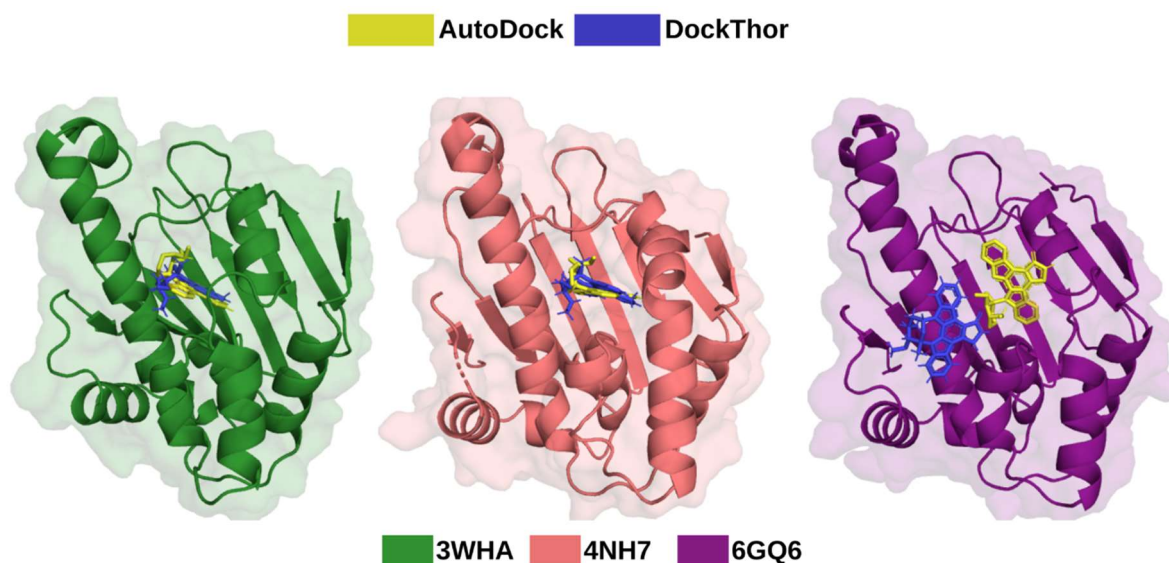
Fonte: Autor. As figuras apresentam as interações entre o produto natural mitoxantrona e cada uma das estruturas de N-terminal de HSP90. As moléculas em azul se referem à mitoxantrona analisada via DockThor, enquanto em amarelo estão as analisadas via AutoDock Vina.

Figura 14 - Poses das melhores afinidades entre etoposídeo e HSP90A.



Fonte: Autor. As figuras apresentam as interações entre o etoposídeo e cada uma das estruturas de N-terminal de HSP90. As moléculas em azul se referem ao etoposídeo analisado via DockThor, enquanto em amarelo estão os analisados via AutoDock Vina.

Figura 15 - Poses das melhores interações entre estaurosporina e HSP90A.



Fonte: Autor. As figuras apresentam as interações entre o inibidor de quinase estaurosporina e cada uma das estruturas de N-terminal de HSP90. As moléculas em azul se referem às estaurosporinas analisadas via DockThor, enquanto em amarelo estão as analisadas via AutoDock Vina.

A fim de aumentar a capacidade preditiva dos estudos de docagem molecular, apenas as poses que se sobrepõem em cada uma das estruturas terão suas interações com a proteína analisadas posteriormente. Assim, apenas a interação entre o quimioterápico estaurosporina e a estrutura 4NH7 será melhor caracterizada no tópico 5.4 deste capítulo.

5.3. Docagem Molecular – GRP94

A tabela 7 apresenta as afinidades entre as estruturas 1YT2, 4NH9 e 7ULL e os quimioterápicos investigados. Semelhante à tabela 6, estão destacados em verde as melhores interações em cada uma das plataformas utilizadas.

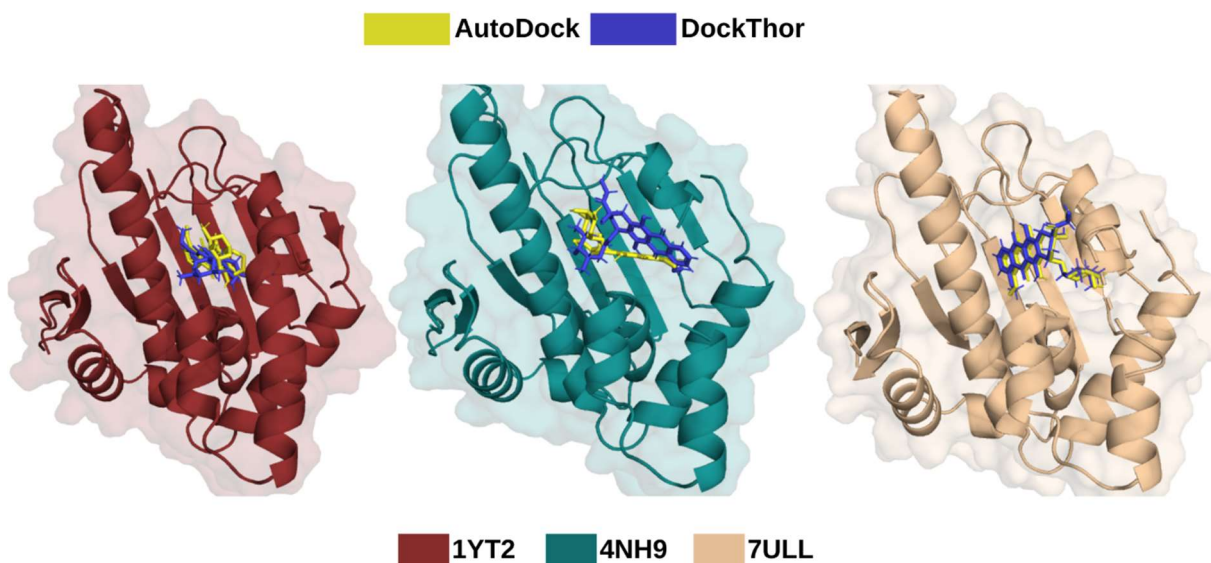
Tabela 7 - Valores de afinidade entre as subunidades N-terminal de GRP94 e alguns quimioterápicos citotóxicos.

Quimioterápico	1YT2		4NH9		7ULL	
	Afinidade (kcal/mol)					
	DockThor	AutoDock	DockThor	AutoDock	DockThor	AutoDock
Doxorrubicina	-9.833	-8.8	-7.708	-7.4	-9.507	-8.7
Daunorrubicina	-9.693	-8.9	-7.799	-8.0	-9.375	-9.0
Tanespimicina	-9.019	-7.6	-9.006	-8.0	-9.637	-8.3
Geldanamicina	-8.650	-7.4	-8.316	-7.4	-8.845	-6.8
5FU	-6.699	-4.9	-6.221	-4.7	-6.612	-5.2
Mitoxantrona	-8.744	-7.5	-8.087	-7.4	-8.451	-7.9
Etoposídeo	-8.388	-8.0	-9.493	-9.3	-9.848	-9.0
Estaurosporina	-9.228	-8.4	-8.663	-8.2	-9.197	-9.0

Fonte: Autor. Destacados em verde estão as quatro melhores interações entre os quimioterápicos e cada uma das estruturas N-terminal de GRP94. A fim de afunilar as análises, foram escolhidas apenas os quimioterápicos que mais se repetem entre os quatro melhores nos seis testes realizados.

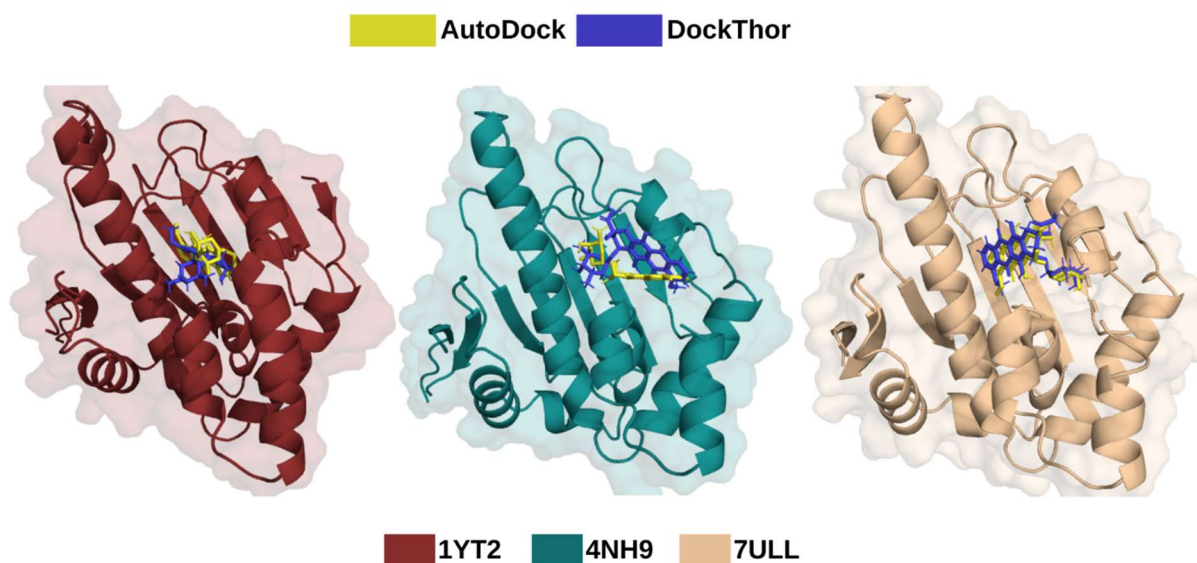
Considerando as moléculas que melhor interagiram com as estruturas utilizadas, estão as antraciclinas DOX e DAU, o inibidor de HSP90 tanespimicina, ETO e STA. Ambos possuíram as melhores afinidades em no mínimo quatro dos seis testes realizados. A fim de observar se as poses das melhores afinidades eram semelhantes nas duas plataformas de docagem, os ligantes foram sobrepostos e estão disponíveis nas figuras 16 (DOX), 17 (DAU), 18 (tanespimicina), 19 (ETO) e 20 (STA).

Figura 16 - Poses das melhores interações entre doxorubicina e GRP94.



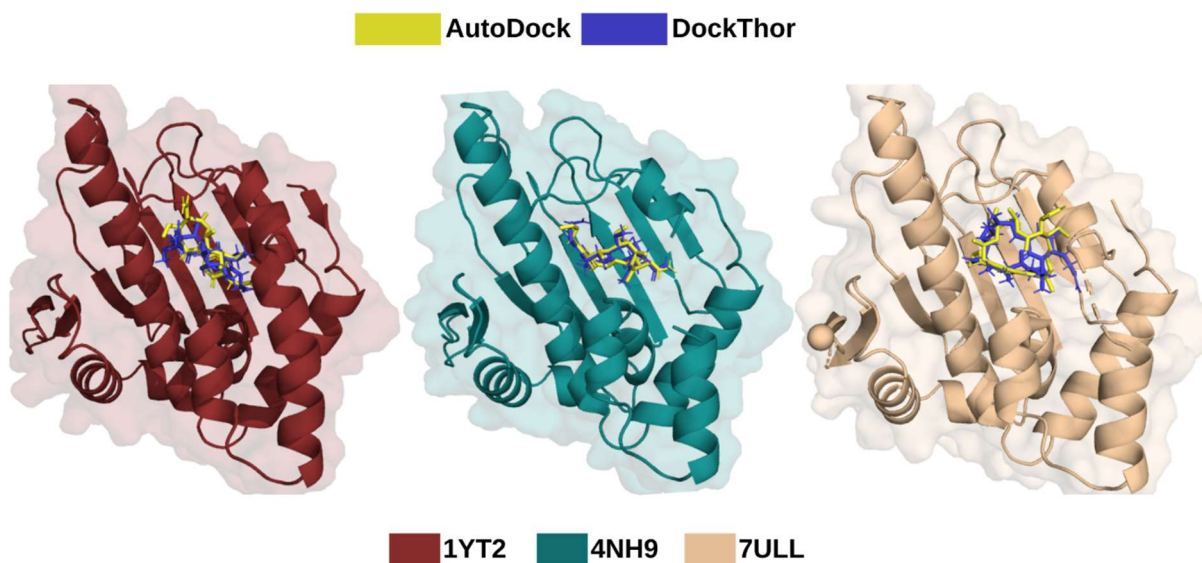
Fonte: Autor. As moléculas em azul referem-se à doxorubicina analisada por meio do DockThor, enquanto em amarelo estão representadas àquelas analisadas com o auxílio do AutoDock Vina. As três estruturas proteicas presentes se referem às três subunidades N-terminal de GRP94 utilizadas neste trabalho.

Figura 17 - Poses das melhores interações entre daunorrubicina e GRP94.



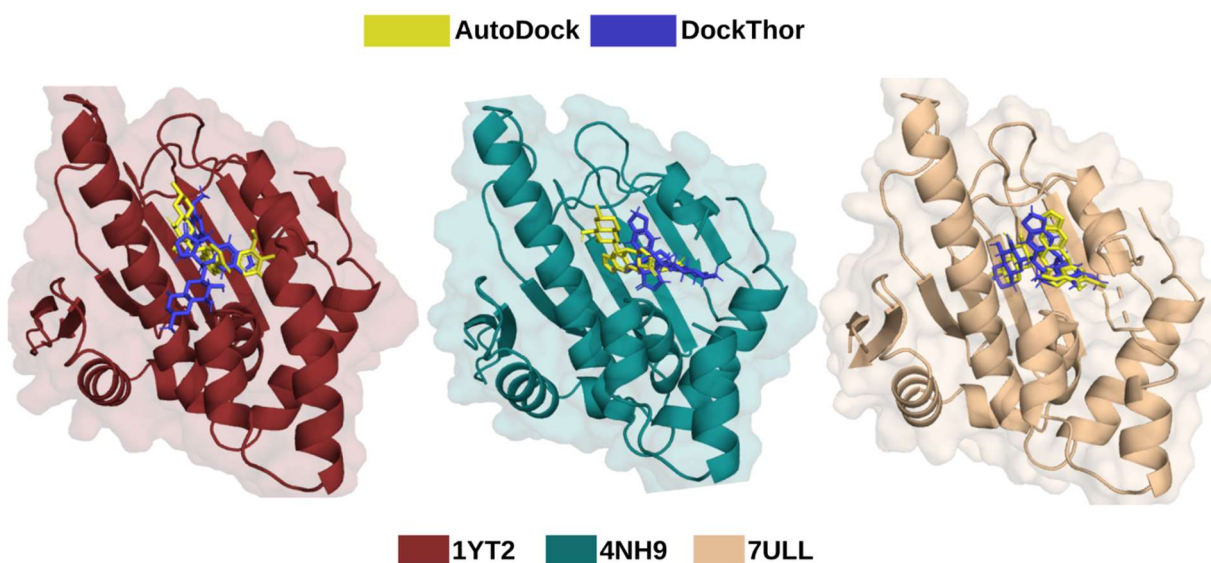
Fonte: Autor. As moléculas em azul referem-se à daunorrubicina analisada por meio do DockThor, enquanto em amarelo estão representadas àquelas analisadas com o auxílio do AutoDock Vina.

Figura 18 - Poses das melhores interações entre tanespimicina e GRP94.



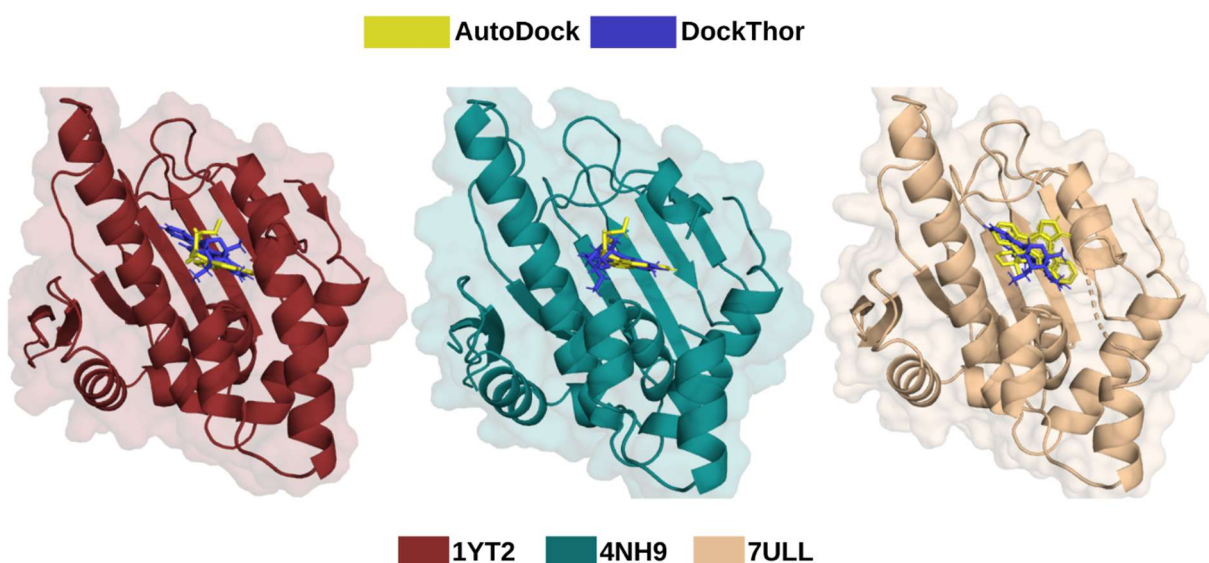
Fonte: Autor. As moléculas em azul referem-se à tanespimicina analisada por meio do DockThor, enquanto em amarelo estão representadas àquelas analisadas com o auxílio do AutoDock Vina.

Figura 19 - Poses das melhores interações entre etoposídeo e GRP94.



Fonte: Autor. As moléculas em azul referem-se à molécula de etoposídeo analisada por meio do DockThor, enquanto em amarelo estão representadas àquelas analisadas com o auxílio do AutoDock Vina.

Figura 20 - Poses das melhores interações entre estaurosporina e GRP94.



Fonte: Autor. As moléculas em azul referem-se à estaurosporina analisada por meio do DockThor, enquanto em amarelo estão representadas àquelas analisadas com o auxílio do AutoDock Vina.

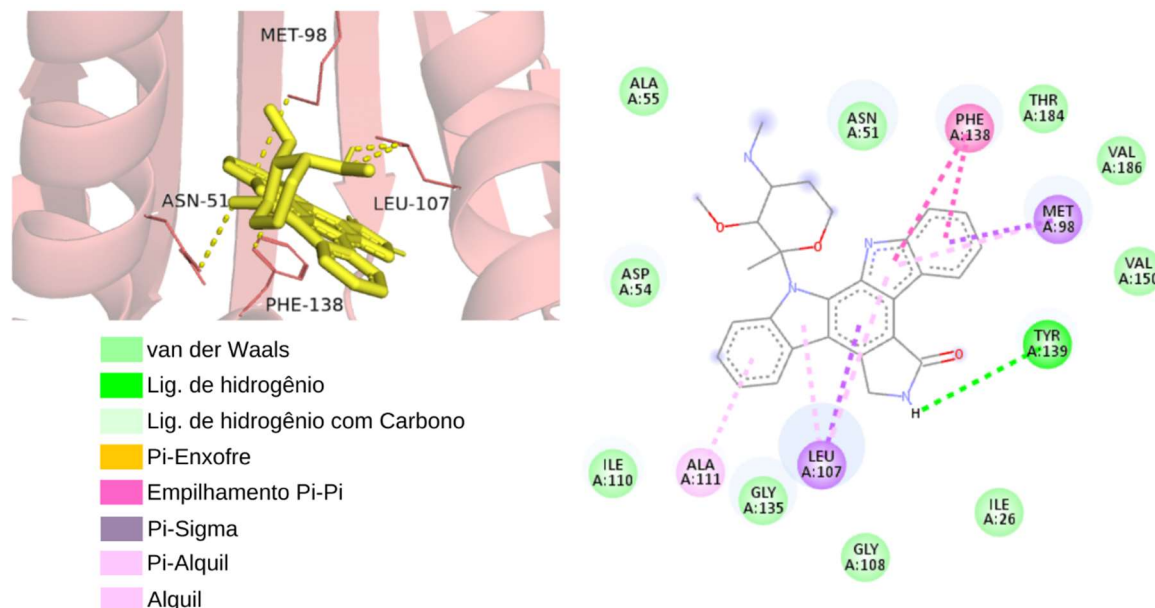
Apesar de todas as poses com melhores afinidades terem se ligado em locais muito próximos e se sobreporem em alguns pontos, apenas o inibidor de HSP90 tanespimicina na estrutura 4NH9 e as antraciclinas doxorubicina e daunorrubicina na estrutura 7ULL ficaram quase completamente sobrepostas. Essas interações serão melhor caracterizadas no próximo tópico.

5.4. Escolha e análise das interações

5.4.1. Interações estaurosporina e 4NH7 (HSP90A)

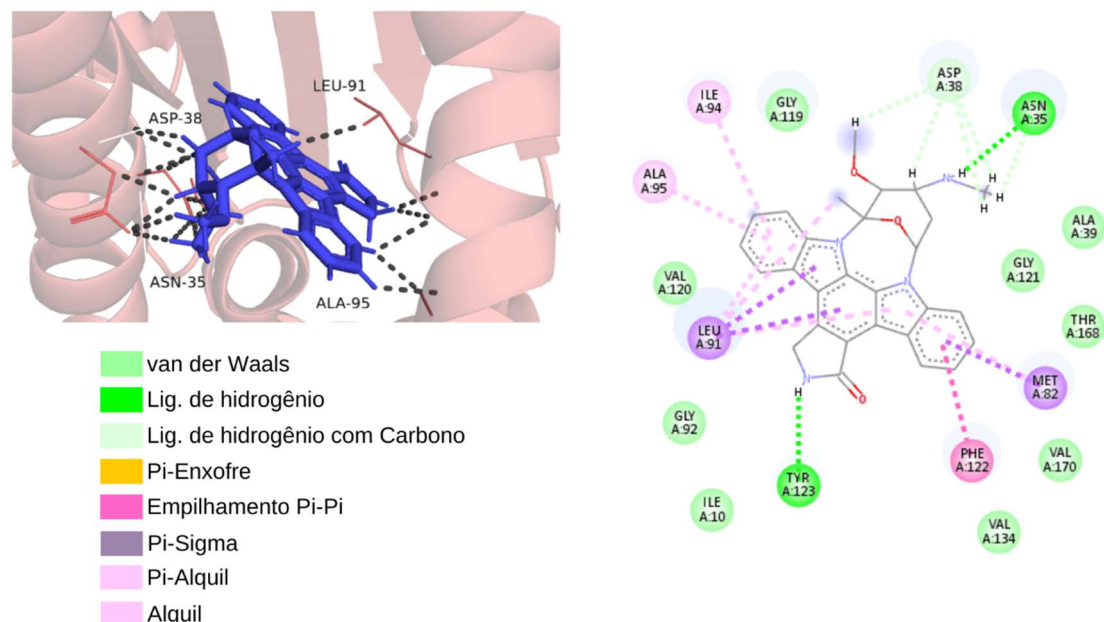
A figura 21 apresenta a interação entre STA e a estrutura 4NH7 obtida no ensaio de docagem molecular utilizando o AutoDock Vina. A figura 22, por sua vez, apresenta as interações entre as mesmas moléculas no ensaio de docagem molecular com o DockThor. Para obtenção das imagens foram utilizadas a plataforma Pymol para visualização 3D e Biovia Discovery Studio para a elaboração do diagrama 2D de interação.

Figura 21 - Interações moleculares entre estaurosporina e 4NH7 (AutoDock Vina).



Fonte: Autor. Na parte superior esquerda é possível observar a conformação tridimensional da molécula de estaurosporina no sítio de ligação com o ATP da estrutura 4NH7. Além disso, estão apresentados na figura os resíduos de aminoácidos que interagem a uma distância de até 3 angstroms do ligante. Ao lado, é possível observar o diagrama 2D de interação, apresentando com quais resíduos de aminoácidos o ligante interage. Por fim, a natureza das interações está apresentada na legenda, na parte inferior esquerda da figura.

Figura 22 - Interações moleculares entre estaurosporina e 4NH7 (DockThor).



Fonte: Autor. Na parte superior esquerda é possível observar a conformação tridimensional da molécula de estaurosporina no sítio de ligação com o ATP da estrutura 4NH7, além da indicação dos resíduos de aminoácidos que interagem a uma distância de até 3 angstroms do ligante. Ao lado, é possível observar o diagrama 2D de interação, apresentando com quais resíduos de aminoácidos o ligante interage. Por fim, a natureza das interações está apresentada na legenda, na parte inferior esquerda da figura.

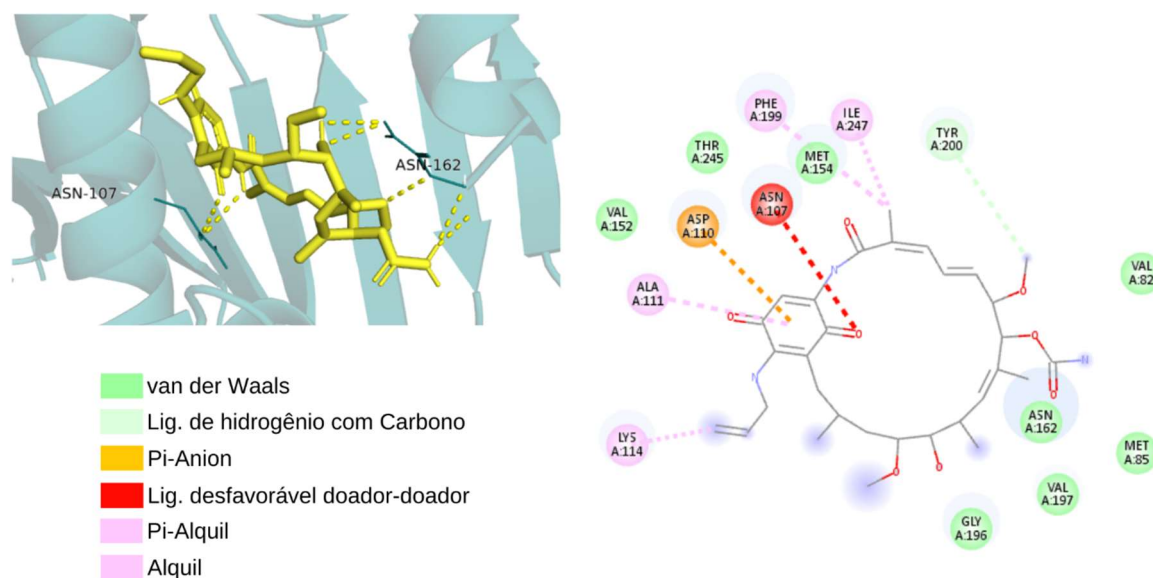
Ambos os softwares obtiveram interações semelhantes entre os mesmos resíduos de aminoácidos. As diferenças entre os números dos resíduos se deram, provavelmente, devido ao fato do DockThor mudar o número da sequência na preparação da molécula. Assim, cada resíduo analisado no AutoDock Vina possui o número do mesmo resíduo do DockThor somado a 16, por exemplo, o resíduo de fenilalanina de número 138 (PHE 138) que interagem com os anéis da estaurosporina na análise do AutoDock é a mesma fenilalanina 122 (PHE 122) na imagem do DockThor, os números apresentam uma diferença de 16 entre si.

Nas figuras 21 e 22 é possível identificar uma diversidade de interações que atuam estabilizando a molécula na manutenção do complexo. Entre essas interações estão ligações de hidrogênio convencionais (especialmente entre moléculas de oxigênio), ligações de hidrogênio com carbono, interações de van der Waals, entre outras.

5.4.2. Interações tanespimicina e 4NH9 (GRP94)

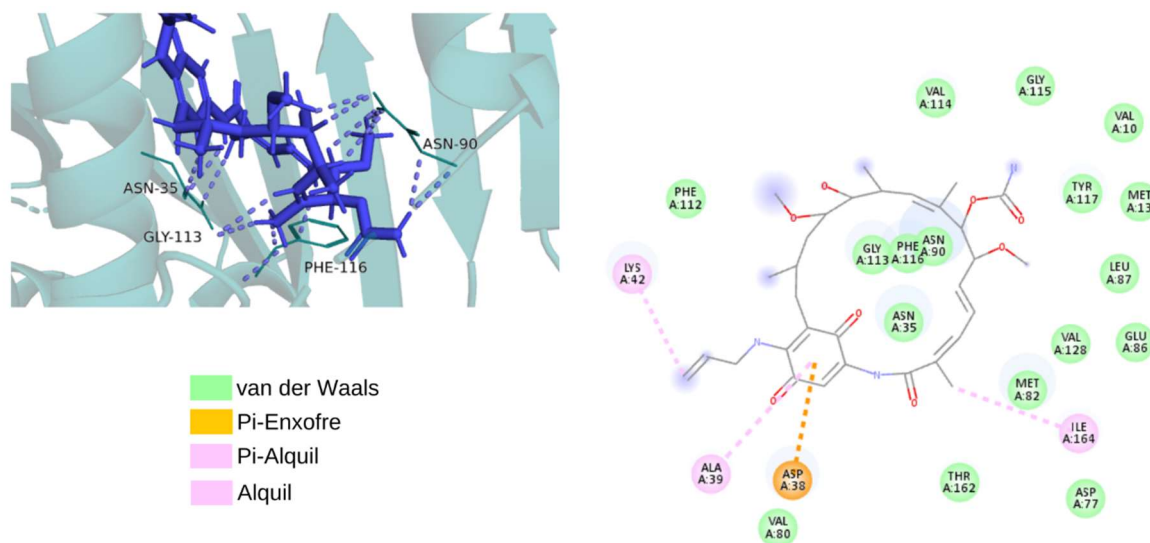
A figura 23 apresenta a interação entre o pan-inibidor de HSP90, tanespimicina e a estrutura 4NH9, obtida no ensaio de docagem molecular utilizando o AutoDock Vina. A figura 24, por sua vez, apresenta as interações encontradas no docagem molecular com o DockThor.

Figura 23 - Interações moleculares entre tanespimicina e 4NH9 (AutoDock Vina).



Fonte: Autor. Na parte superior esquerda é possível observar a conformação tridimensional da molécula de tanespimicina no sítio de ligação com o ATP da estrutura 4NH9, além da indicação dos resíduos de aminoácidos que interagem a uma distância de até 3 angstroms do ligante. Ao lado, é possível observar o diagrama 2D de interação, apresentando com quais resíduos de aminoácidos o ligante interage. Por fim, a natureza das interações está apresentada na legenda, na parte inferior esquerda da figura.

Figura 24 - Interações moleculares entre tanespimicina e 4NH9 (DockThor).



Fonte: Autor. Na parte superior esquerda é apresentada a conformação tridimensional da molécula de tanespimicina no sítio de ligação com o ATP da estrutura 4NH9, indicando os resíduos de aminoácidos que interagem a uma distância de até 3 angstroms do ligante. Ao lado, é possível observar o diagrama 2D de interação, que sumariza com quais resíduos de aminoácidos o ligante interage. Por fim, a natureza das interações está apresentada na legenda, na parte inferior esquerda da figura.

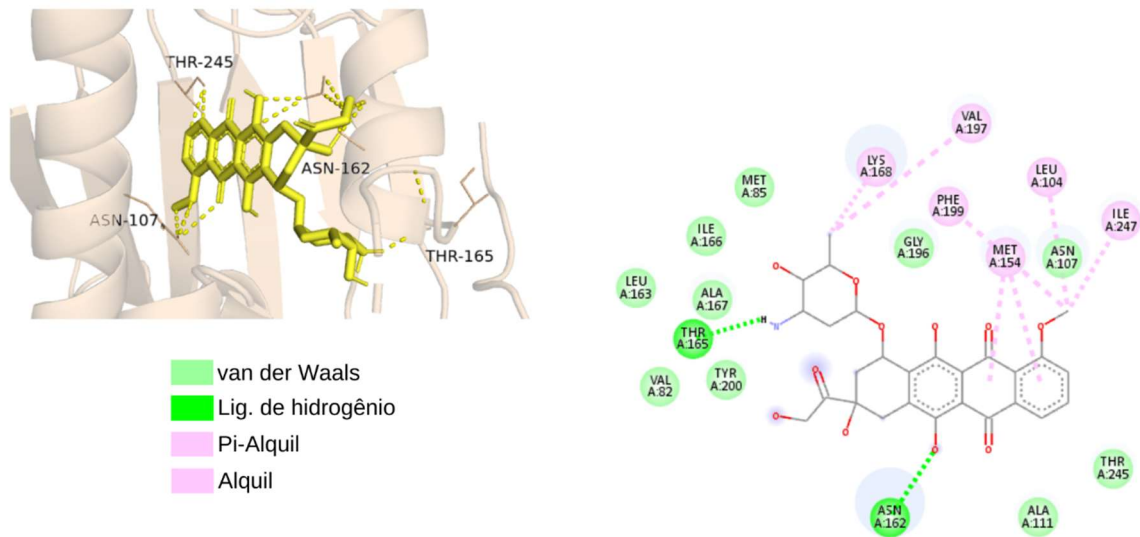
Semelhante ao que ocorreu na análise da STA com a estrutura 4NH7, durante a preparação da estrutura proteica, a plataforma DockThor alterou a numeração dos resíduos de aminoácidos. Assim, embora sejam os mesmos resíduos, quase sempre com as mesmas interações entre as duas plataformas, os resíduos do AutoDock Vina são a numeração presente no DockThor somados a 72. Por exemplo, o resíduo de ácido aspártico número 38 (ASP38) no DockThor, é o mesmo resíduo de ácido aspártico de número 110 na análise do AutoDock Vina.

Analisando os diagramas 2D nas duas imagens, é possível identificar uma variedade de interações que em sua maioria estabilizam a molécula no complexo. Entre essas interações, destacam-se as de van der Waals, presentes em grande quantidade especialmente na figura 24, elaborada a partir do ensaio utilizando o DockThor. No ensaio com o AutoDock Vina (Fig. 23) é possível identificar uma interação desfavorável entre o resíduo ASN 107 e a hidroxila presente no meio da molécula de tanespimicina. Essa interação possivelmente ocorreu devido à exclusão das moléculas de água para realização do docking molecular. No trabalho de IMMORMINO et al. (2009), na interação entre o resíduo de asparagina (ASN107, estrutura PDB: 2EXL), possuía águas estruturais auxiliando na estabilização da estrutura.

5.4.3. Interações doxorrubicina e 7ULL (GRP94)

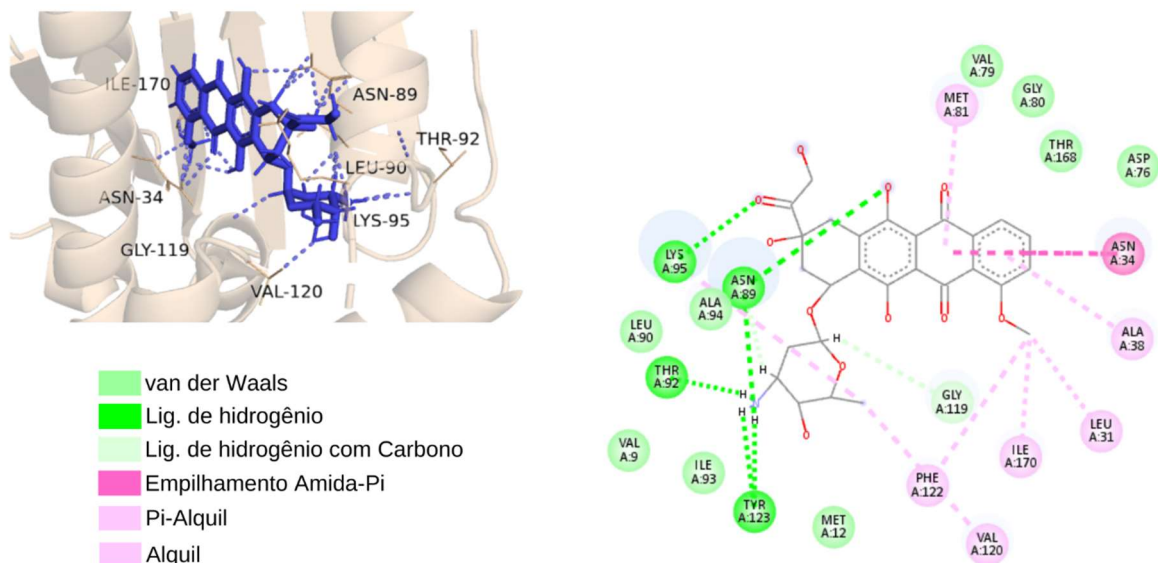
A figura 25 apresenta a interação entre o quimioterápico da classe das antraciclinas doxorrubicina e a estrutura 7ULL, obtida no ensaio de docagem molecular utilizando o AutoDock Vina. A figura 26, por sua vez, apresenta as interações encontradas no docagem molecular com o DockThor.

Figura 25 - Interações moleculares entre doxorrubicina e 7ULL (AutoDock Vina).



Fonte: Autor. Na parte superior esquerda, é possível observar a interação entre ligante e proteína de forma tridimensional, caracterizada no diagrama 2D ao lado. Na parte inferior esquerda, está a legenda do diagrama 2D.

Figura 26 - Interações moleculares entre doxorrubicina e 7ULL (DockThor).



Fonte: Autor. Na parte superior esquerda, é possível observar a interação entre ligante e proteína de forma tridimensional, caracterizada no diagrama 2D ao lado. Na parte inferior esquerda, está a legenda do diagrama 2D.

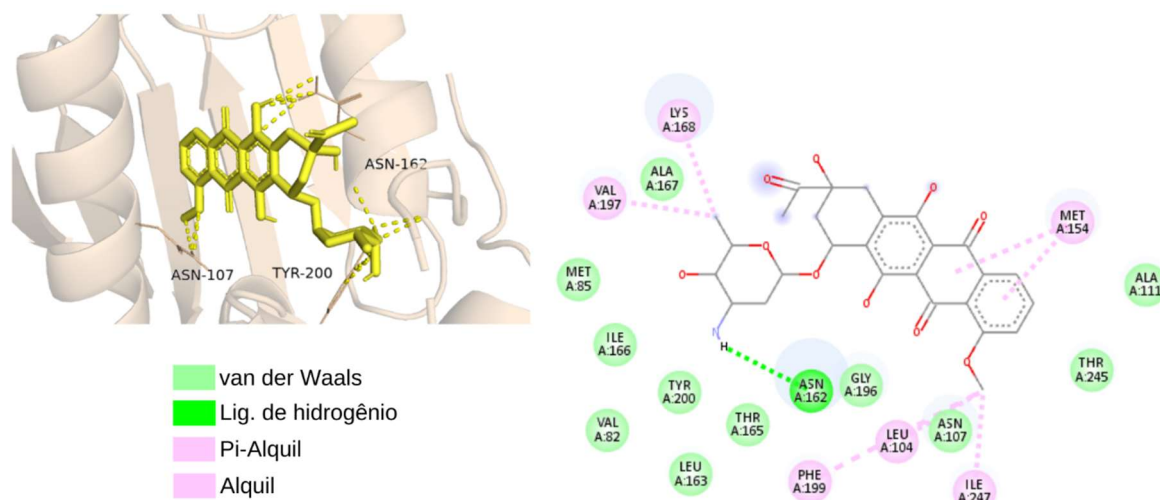
Semelhante ao que ocorre nas interações anteriores, após o preparação da proteína no DockThor, a numeração da sequência de aminoácidos foi modificada. Dessa vez, tanto nos ensaios com a DOX, quanto nos com DAU, o número do resíduo de aminoácido presente na análise do AutoDock Vina é a soma do número presente no mesmo resíduo do DockThor mais 73. Por exemplo, a metionina de número 81 (MET 81) presente na figura 26 é a mesma metionina de número 154 (MET 154) apresentada na figura 25.

Nas análises dos diagramas 2D obtidas nos testes com a DOX, é possível observar inúmeras ligações de hidrogênio, especialmente na interação obtida via DockThor. Além disso, as estruturas interagem bastante por meio de interações de van der Waals, que circundam toda o ligante. Outras interações como pi-alquil (envolvendo o anel aromático do ligante e um agrupamento alquila na proteína) também são encontradas.

5.4.4. Interações daunorrubicina e 7ULL (GRP94)

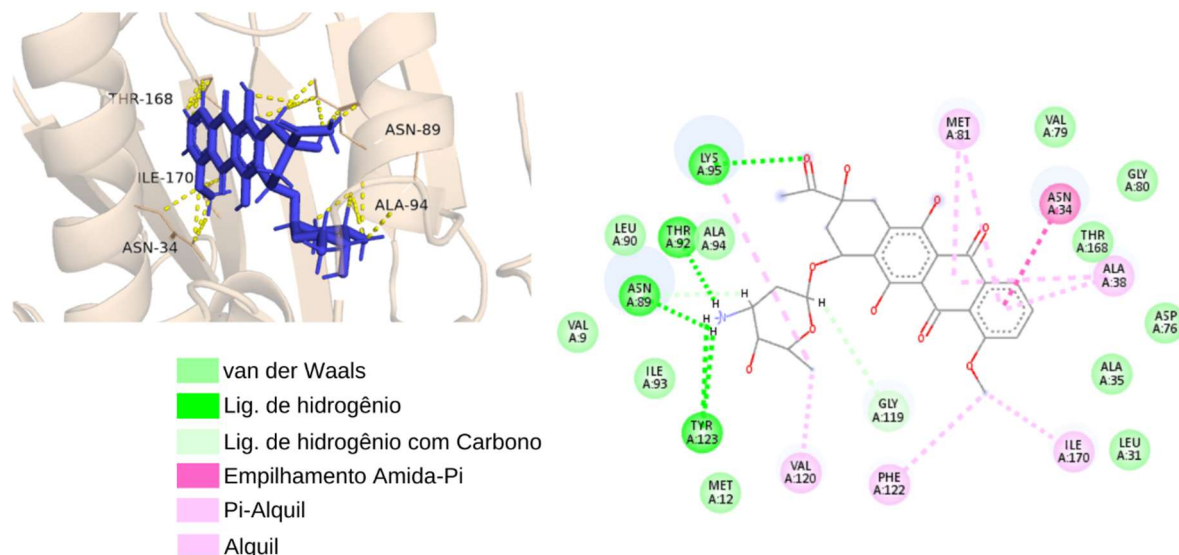
A figura 27 apresenta a interação entre o quimioterápico da classe das antraciclinas daunorrubicina e a estrutura 7ULL, obtida no ensaio de docagem molecular utilizando o AutoDock Vina. A figura 28, por sua vez, apresenta as interações encontradas no docagem molecular com o DockThor.

Figura 27 - Interações moleculares entre daunorrubicina e 7ULL (AutoDock Vina).



Fonte: Autor. Na parte superior esquerda da imagem, é possível observar a conformação tridimensional do ligante no sítio de ligação da proteína. Ao lado, está disponível a caracterização dessa interação via diagrama 2D. As legendas do diagrama estão presentes na parte inferior esquerda da imagem.

Figura 28- Interações moleculares entre daunorrubicina e 7ULL (DockThor).



Fonte: Autor. Na parte superior esquerda da imagem, é possível observar a conformação tridimensional do ligante no sítio de ligação da proteína. Ao lado, está disponível a caracterização dessa interação via diagrama 2D. As legendas do diagrama estão presentes na parte inferior esquerda da imagem.

Por se tratarem de moléculas muito parecidas, as interações presentes nos ensaios com a DOX (Figuras 25 e 26) são bastante semelhantes às que ocorrem com a DAU (Figuras 27 e 28). É possível observar uma grande quantidade de interações de van der Waals, ligações Pi-alquil, ligações alquil e, especialmente no ensaio com o DockThor, muitas ligações de hidrogênio, envolvendo principalmente a porção de açúcar da molécula.

5.5. Comparação entre as estruturas Pré-Docagem e Pós-Docagem

Considerando a relação estrutura-atividade, fator essencial no desenvolvimento da atividade biológica de uma biomolécula, foi realizada a comparação das estruturas proteicas abordadas no tópico anterior antes e depois dos ensaios de docagem molecular utilizando o DockThor. A escolha da plataforma para esses testes ocorreu devido ao grau de flexibilidade que esta permite à proteína, característica nomeada pela plataforma como *soft docagem*. No AutoDock Vina, por sua vez, os ensaios de docagem molecular consideram a proteína como rígida, de modo que apenas alguns resíduos de aminoácidos podem ser selecionados como flexíveis. Utilizar uma proteína inteira como flexível utilizando o AutoDock Vina aumentaria

bastante a complexidade da análise, necessitando de computadores com um grande poder de processamento. Devido a esse motivo, apenas o DockThor foi utilizado e teve seu resultado comparado.

A figura 29 apresenta as estruturas 4NH7 antes (em cinza) e depois (em ciano) do ensaio com a estaurosporina utilizando a plataforma DockThor.

Figura 29 - Sobreposição das estruturas 4NH7 (HSP90A) antes e depois da interação com a estaurosporina.

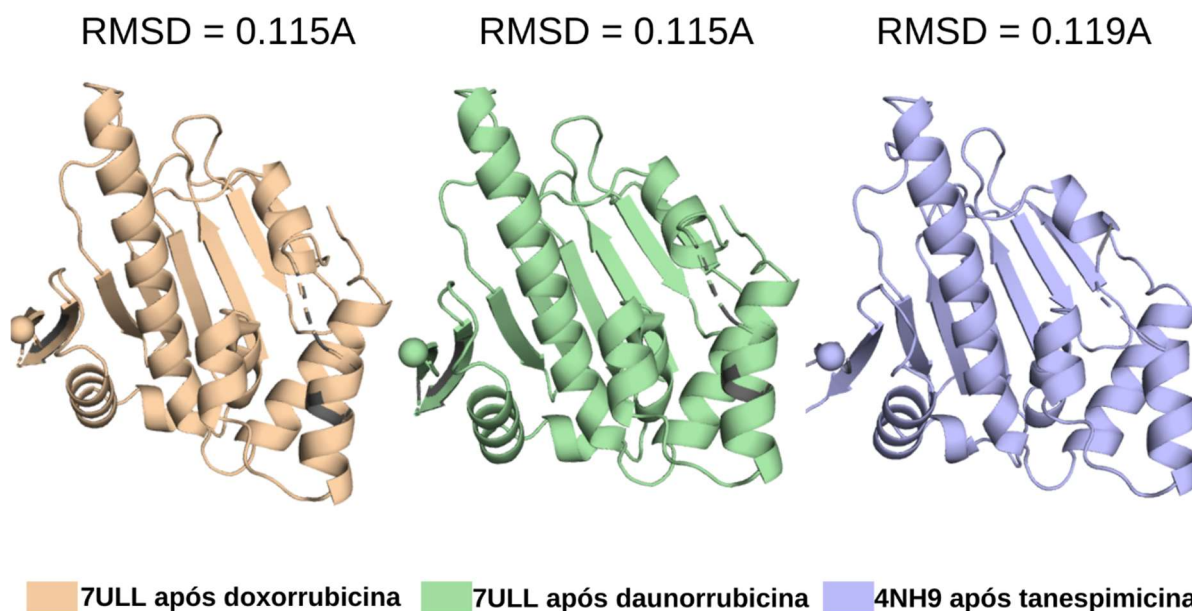


Fonte: Autor. Na imagem, é possível observar a estrutura 4NH7 após a interação com a estaurosporina (em ciano) sobreposta à estrutura utilizada antes dos testes (em cinza). Acima da proteína, o valor do RMSD.

Após a interação com a molécula de STA (Fig. 29), a estrutura 4NH7 sofreu uma pequena modificação de conformação, que pode ser observada por meio do valor de RMSD acima de zero (RMSD = 0.133). Considerando a importância da conformação de uma proteína para o desenvolvimento de sua função biológica, é possível que a interação com outro ligante possa atuar dificultando ou facilitando a interação com o ligante endógeno. Para compreender se a ligação com outra molécula afeta a atividade biológica de uma proteína, é necessária a realização de testes biológicos experimentais.

A figura 30 apresenta a sobreposição das estruturas de GRP94 7ULL e 4NH9 antes e depois da interação com as antraciclinas (7ULL) e tanespimicina (4NH9).

Figura 30 - Sobreposição das estruturas de GRP94 antes e depois da interação com os ligantes.



Fonte: Autor. As duas primeiras imagens representam as estruturas 7ULL antes (em cinza) e depois (em bege e verde) da interação com a doxorubicina e a daunorrubicina. Em azul, está a estrutura 4NH9 após interação com a tanespimicina, sobreposta à estrutura anterior à interação, em cinza. Acima de cada uma das estruturas está o valor de RMSD da sobreposição.

Assim como ocorreu na estrutura 4NH7 após a interação com a STA (Fig. 29), a ligação das estruturas de GRP94 com as antraciclina e com a tanespimicina levaram a uma mudança de conformação na proteína (Fig. 30). As interações entre DOX e DAU e a estrutura 7ULL levaram à mesma mudança de conformação, com um valor de 0.115. A tanespimicina, por sua vez, levou a uma alteração um pouco maior de 0.119 na estrutura 4NH9.

Como citado anteriormente, o estudo de atividade biológica de uma proteína considera a conformação como um fator essencial no desenvolvimento da função fisiológica. Assim, é possível que essa modificação conformacional leve a uma diferença na execução da atividade biológica. Para averiguar se essas interações de fato ocorrem experimentalmente e se são capazes de levar a uma modulação positiva ou negativa na atividade das chaperonas, é necessária a realização de testes biológicos experimentais.

Considerando os resultados obtidos *in silico*, foram realizados ensaios *in vitro* com os fármacos doxorubicina e estaurosporina, a fim de caracterizar a indução de estresse de retículo

causado por ambos, sozinhos e associados a inibidores das duas principais vias de ER, PERK e IRE1 α .

5.6. Determinação da Concentração Inibitória Média (CI₅₀)

Com base no ensaio do MTT, foram determinadas as concentrações inibitórias médias dos fármacos DOX e STA para as linhagens de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7 nos tempos de tratamento de 24h e 72h. Os resultados obtidos estão presentes na tabela 8.

Tabela 8 - Valores de concentração inibitória média (CI₅₀) obtidos no ensaio do MTT (n=3) nas linhagens de câncer de mama.

	MDA-MB-231		MCF-7	
	24h	72h	24h	72h
CI ₅₀	8,10 (DOXO)	0,13 (DOXO)	10,08 (DOXO)	0,37 (DOXO)
(μ M)	1,63 (STAU)	0,10 (STAU)	1,68 (STAU)	0,43 (STAU)
CI	4,51 – 14,55 (DOXO)	0,07 – 0,24 (DOXO)	3,44 – 29,49 (DOXO)	0,26 – 0,55 (DOXO)
95%	0,29 – 9,09 (STAU)	0,001 – 18,9 (STAU)	0,81 – 3,49 (STAU)	0,26 – 0,71 (STAU)
R ²	0,62 (DOXO)	0,8 (DOXO)	0,47 (DOXO)	0,9 (DOXO)
	0,40 (STAU)	0,04 (STAU)	0,64 (STAU)	0,81 (STAU)

Fonte: Autor. Valores de absorbância obtidos a partir do ensaio do MTT e lidos em 570nm em espectrofotômetro. Os valores foram obtidos a partir de regressão não linear no programa GraphPad Prism 8.0. DOXO = doxorubicina, STAU = estaurosporina.

Os valores da $\frac{1}{2}$ CI₅₀ para 24h dos fármacos DOX e STA obtidos a partir do ensaio do MTT foram utilizados nos ensaios de Western Blotting e de formação de colônias. O uso de $\frac{1}{2}$ CI₅₀ foi escolhido devido às altas concentrações obtidas no ensaio, especialmente para DOX.

5.7. Avaliação da expressão de proteínas relacionadas ao estresse de retículo

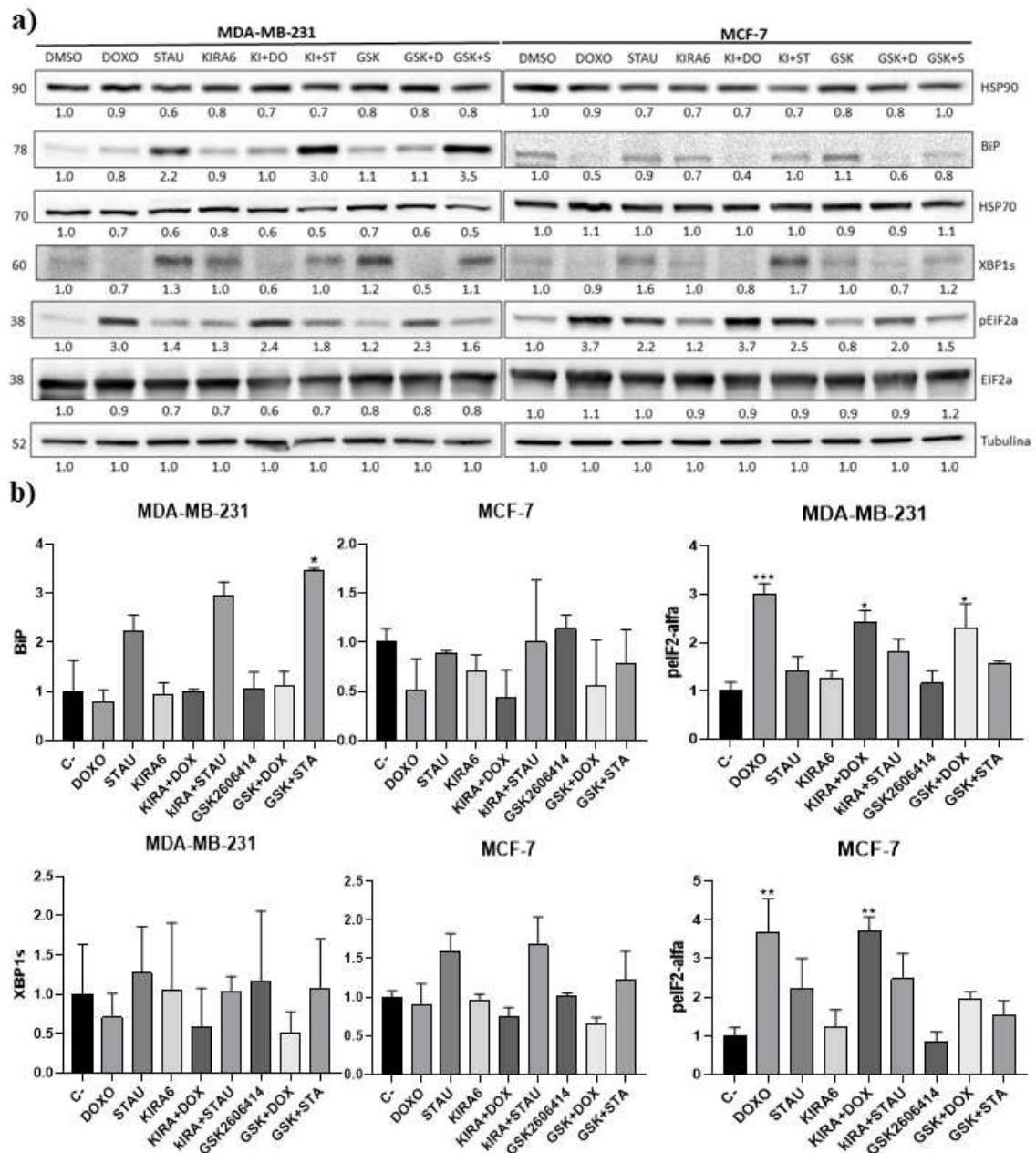
A fim de correlacionar os tratamentos realizados na modificação da expressão de proteínas relacionadas à indução de estresse de retículo, as linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 foram tratadas por 24h com DMSO (controle negativo), DOX (4 μ M) e STA (0,8 μ M). Além dos tratamentos isolados, os dois fármacos foram associados com os inibidores das proteínas IRE1 α (Kira6, 1 μ M) e PERK (GSK2606414, 5 μ M), ambas relacionadas a vias de deflagração de estresse de retículo. A última das três vias, ATF6, não foi modulada com a utilização de

inibidores. Os grupos que se utilizaram dos inibidores foram pré-tratados com estes por 1h antes da adição dos fármacos. A figura 31 apresenta os resultados obtidos nos três experimentos de Western Blotting, bem como os gráficos relacionados aos resultados mais representativos.

A proteína BiP (ou GRP74), chaperona responsável pela sinalização inicial para os estresse de proteínas mal enoveladas (UPR), aumentou de forma estatisticamente relevante no tratamento com STA associada ao inibidor de PERK, GSK2606414 na linhagem MDA-MB-231. Apesar da ausência de relevância estatística nos ensaios realizados, é notória, tanto nas bandas de Western Blotting, quanto nos gráficos, a tendência de aumento da concentração de BiP no tratamento com STA. Na linhagem MCF-7, por sua vez, os tratamentos mantiveram os níveis de BiP semelhantes ao grupo tratado com DMSO. Os tratamentos com DOX, por sua vez, na linhagem MCF-7 diminuíram em cerca de 50% a expressão de BiP, quando comparadas ao tratamento com DMSO.

Em relação às duas vias moduladas com os inibidores Kira6 e GSK2606414, foi analisada a expressão das proteínas XBP1s e da forma fosforilada da proteína eIF2 α , relacionadas às vias da IRE1 α e PERK, respectivamente. Nenhum dos resultados obtidos na quantificação das bandas de XBP1 foi considerado estatisticamente relevante, embora seja possível observar nos gráficos um leve aumento de expressão nos tratamentos com STA na linhagem MCF-7.

Figura 31 - Análises da expressão de proteínas relacionadas ao estresse de retículo em linhagens de câncer de mama.



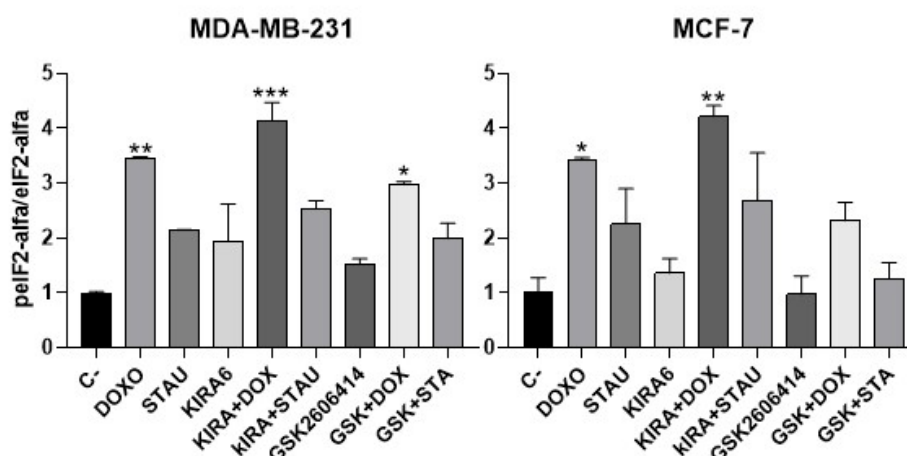
Fonte: Autor. a) Compilação dos resultados de Western Blotting nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-7. Abaixo de cada banda, a média dos valores obtidos nos três experimentos. b) Gráficos relacionados às três principais vias de estresse de retículo: BiP (ou GRP74), proteína iniciadora do estresse de proteínas mal enoveladas, P-eIF2 α , da via da PERK e XBP1s, da via da IRE1 α .

Considerando a forma fosforilada da proteína eIF2 α , todos os tratamentos com DOX tiveram relevância estatística no aumento da expressão em relação ao DMSO na linhagem MDA-MB-231. Na linhagem MCF-7, por sua vez, é possível atestar o aumento da expressão da P-eIF2 α nos tratamentos com DOX sozinha e em combinação com o inibidor de IRE1 α Kira6

em relação ao DMSO. A associação entre o quimioterápico e o inibidor GSK2606414, além de não apresentar diferença estatística quando comparado ao DMSO, diminui além da metade o efeito de DOX na expressão de P-eIF2 α . Embora não apresente relevância estatística, é possível observar nos géis e gráficos, especialmente na linhagem MCF-7, o aumento da fosforilação de eIF2 α nos tratamentos com estaurosporina.

Considerando que a fosforilação de eIF2 α é apontada na literatura como um dos principais sinais para deflagração de morte celular imunogênica, além da quantificação da forma fosforilada da proteína, também foram quantificadas as formas não fosforiladas a fim de calcular a razão entre as formas. A figura 32 apresenta estas razões.

Figura 32 - Razão das formas fosforilada e não fosforilada de eIF2 α .



Fonte: Autor. Razão entre as formas fosforilada e não fosforilada de eIF2 α nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-7. O aumento da fosforilação de eIF2 α é considerado um dos principais acontecimentos para deflagração de morte celular imunogênica.

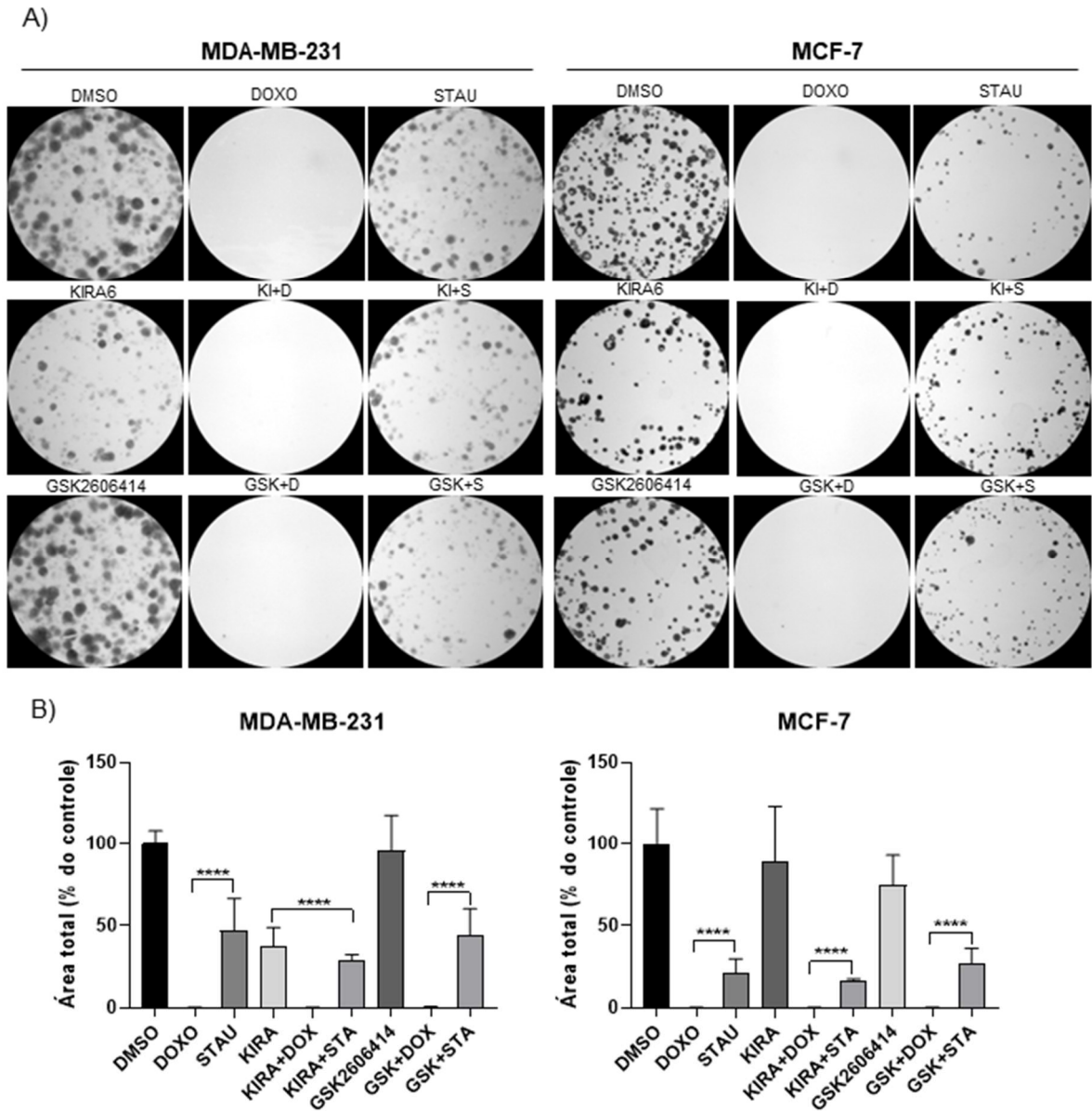
Na linhagem MDA-MB-231, todos os tratamentos com DOX, incluindo com o inibidor da via PERK, tiveram a relação P-eIF2 α /eIF2 α superiores ao controle negativo. Na linhagem MCF-7, por sua vez, apenas os tratamentos com DOX sozinha e associada ao inibidor Kira6 foram significativamente maiores em relação ao controle negativo, enquanto a combinação DOX e GSK2606414 levou à diminuição da razão. Em ambas as linhagens, o aumento da razão entre as formas de eIF2 α foi maior na combinação entre DOX e Kira6. A STA, embora não tenha apresentado nenhuma alteração estatisticamente relevante, possui um aumento de pelo menos duas vezes nas razões em ambas as linhagens. O tratamento com

GSK2606414 também diminuiu pela metade a relação entre as duas formas da proteína no tratamento com STA na linhagem MCF-7.

5.8. Avaliação do efeito do tratamento na formação de colônias

A figura 33 apresenta os resultados dos ensaio de formação de colônias nas linhagens de carcinoma de mama MDA-MB-231 e MCF-7. As células foram tratadas por 24h com os grupos experimentais e após o tratamento, 1000 células foram adicionadas a placas de Petri. As placas foram observadas diariamente e o tempo de incubação foi suspenso quando o controle negativo apresentava 100 colônias. As análises estatísticas comparam o crescimento celular dos grupos experimentais em relação ao controle negativo.

Figura 33 - Efeitos do tratamento com quimioterápicos na formação de colônias.



Fonte: Autor. A) Fotos do ensaio de formação de colônias nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-7. As imagens escolhidas foram escolhidas entre as 6 imagens obtidas em cada grupo (3Ns em duplicata). B) Análise estatística do efeito de cada um dos tratamentos em relação ao controle negativo. Os asteriscos apontam os grupos que apresentaram uma diminuição estatisticamente relevante no crescimento de colônias.

O tratamento com DOX impediu a formação de colônias em ambas as linhagens em mais de 99%, de modo que em alguns placas, não foi possível a contagem de colônias. A STA, por sua vez, levou à diminuição de mais de 50% em ambas as linhagens. O tratamento com o inibidor GSK2606414, que atua na proteína sinalizadora de estresse de retículo PERK, não levou à diminuição da formação de colônias em relação ao DMSO. O inibidor de IRE1 α , Kira6,

por sua vez, levou à diminuição significativa na formação de colônias na linhagem MDA-MB-231, enquanto não diminuiu significativamente o crescimento na linhagem MCF-7.

6. DISCUSSÃO

6.1. Resultados *in silico*

A escolha dos ligantes para a realização de docagem molecular seguiu uma ordem voltada para a capacidade do quimioterápico em gerar uma resposta imune, especialmente provocando morte celular imunogênica.

A estaurosporina (STA), potente indutor de apoptose, mas fraco na indução de estresse de retículo (ER) e não indutor de MCI, foi utilizado como “controle negativo” nos experimentos de docagem molecular. A molécula de 5-FU, embora leve à liberação de alguns DAMPs, a depender do tipo tumoral, também se enquadra entre os não indutores de morte celular imunogênica.

A fim de criar um “gradiente” de moléculas indutoras de MCI, o etoposídeo (ETO) foi escolhido como um fraco indutor, como discutido posteriormente, embora em alguns tipos tumorais o fármaco tenha apresentado ótimos resultados de liberação de DAMPs. Na parte final deste gradiente, estão os indutores efetivos de MCI, antraciclina e mitoxantrona (MTX). Outras moléculas importantes como indutores de MCI são o paclitaxel e a oxaliplatina, que não foram utilizados neste trabalho devido à ausência de estrutura 3D na plataforma PubChem.

Por fim, como “controle positivo” para os ensaios *in silico*, foram utilizadas as moléculas dos inibidores de N-terminal de HSP90, geldanamicina e tanespimicina (17-AAG). Quanto à indução de MCI, esses inibidores podem atuar auxiliando quimioterápicos na indução, mas não são capazes de causar o evento quando utilizados sozinhos.

Ocupando a posição de único fármaco cujas interações em qualquer umas das estruturas utilizadas não levou a resultados importantes (pelo contrário, exibiu as menores interações em todos os ensaios), está o antimetabólito 5-fluoruracil (5-FU). Como citado no parágrafo anterior, embora seja considerado um não indutor de MCI, o tratamento com o 5-FU leva à liberação de DAMPs como o ATP, calreticulina e HMGB1, como mostra o trabalho de XU et. al. (2021) utilizando células de hepatocarcinoma. A deflagração de MCI, todavia, não se completa, provavelmente devido à superexpressão tardia do gene MTIF2, que leva à supressão da liberação de DAMPs. O *knockout* de MTIF2 por meio de shRNA aumentou a taxa de morte celular e permitiu a ocorrência de MCI induzida por 5-FU (XU et. al., 2021). A combinação entre 5-FU e indutores genuínos de MCI se caracteriza como uma abordagem

capaz de potencializar o tratamento oncológico, como é o caso do uso de 5-FU e oxaliplatina (ZHAI et. al., 2023).

Enquanto todas as outras moléculas testadas neste trabalho apareceram entre as quatro melhores interações em pelo menos um dos testes, o 5-FU ocupou a última posição em todos os ensaios (tabelas 5 e 6). O artigo de CHOWDHURY, HOSSAIN e RAFE (2020), aplicando metodologias similares às utilizadas neste trabalho, aponta uma afinidade de -8.1 kcal/mol entre 5-FU e a enzima timidilato sintetase. Embora nenhum trabalho relacione HSP90 e 5-FU como possíveis interações, a timidilato sintetase também é uma proteína cliente da chaperona. Assim, o uso de inibidores de HSP90 tornou células de câncer colorretal resistentes à 5-FU novamente suscetíveis ao quimioterápico (NAGARAJU et. al., 2014).

Embora tenha sido considerada nos ensaios deste trabalho como um “controle negativo”, as interações entre HSP90A e GRP94 e STA estiveram entre as mais com maior afinidade, junto às antraciclínas. A fim de melhor discutir a literatura e os resultados relacionados à STA, optou-se por deixar o tópico como um dos últimos blocos desta discussão. Deste modo, no parágrafo seguinte serão discutidas as análises e comparações relacionadas à geldanamicina e ao 17-AAG.

Tanto a geldanamicina quanto o 17-AAG são inibidores do sítio de ligação com o ATP presentes na subunidade N-terminal das chaperonas. A revisão de Xiao, Lu e Ruden (2006) apontam que a geldanamicina possui uma maior afinidade de ligação pelo sítio quando comparada ao 17-AAG. Isso de fato ocorreu nas análises utilizando a estrutura de HSP90A (Tabela 5). Todavia, quando utilizada a estrutura da proteína GRP94, o 17-AAG obteve melhores resultados, a ponto de ter não apenas ocupado um lugar entre as melhores afinidades pela GRP94, como tendo também poses sobrepostas utilizando as duas metodologias distintas de docagem molecular (Tabela 6, figuras 23 e 24). Nos artigos consultados na literatura, não há comparações entre afinidades das duas moléculas com a GRP94.

A caracterização dos achados de docagem molecular entre o 17-AAG e a estrutura de GRP94 4NH9, aponta uma alta taxa de interações de van der Waals, especialmente nas análises utilizando o DockThor. O anel benzeno presente na subestrutura de benzoquinona apresentou nas duas plataformas uma interação do tipo pi-ânion com o resíduo de aminoácido ácido aspártico ASP38 no teste do DockThor (ASP110 na análise do AutoDock Vina, o mesmo resíduo, como discutido na seção de resultados). As interações do tipo pi-ânion são um tipo considerado especial de interações iônicas ou íon-dipolo onde um sistema aromático deficiente em elétrons interagiria com ânions (FOKOUE et. al., 2020). Outras interações como pi-alquil, consideradas como do tipo hidrofóbicas, também aparecem na análise. No ensaio com o

AutoDock Vina (Fig. 23), uma das hidroxilas presentes na molécula de 17-AAG apresenta uma interação desfavorável entre doador-doador com o resíduo de asparagina ASN107, o que pode ter ocorrido devido à remoção das moléculas de água e/ou adição de apenas hidrogênios polares durante a preparação do docking molecular. Essa hipótese ganha força devido ao ensaio do DockThor, onde o mesmo resíduo interage no mesmo local, desta vez por meio de uma interação de van der Waals (Fig. 24).

Considerando o contexto histórico de desenvolvimento de moléculas inibidoras de N-terminal de HSP90, a geldanamicina – primeiro inibidor descrito - é um composto natural que possui em sua estrutura uma benzoquinona reativa capaz de levar à morte celular independente da inibição de HSP90 (SAMUNI et. al., 2010). Essa toxicidade exacerbada da geldanamicina *in vivo* levou ao desenvolvimento de agentes menos tóxicos, entre eles o 17-AAG. O derivado até chegou a fase II de testes clínicos, mas foi reprovado devido à baixa solubilidade (LI; LUO, 2022).

Diante de um contexto tumoral, a molécula de 17-AAG possui uma maior seletividade quando comparado à geldanamicina, de modo que, como abordado anteriormente, foi testado tanto em monoterapia, quanto em combinação com outros agentes. Outras moléculas derivadas da geldanamicina, como o 17-DMAG, possuem uma maior afinidade que o 17-AAG pela HSP90A e uma melhor solubilidade. Outros agentes inibidores do NTD da HSP90 também oferecem menos toxicidades e têm sido investigados e modificados, como os derivados do radicicol (SHADRACK; SWAI; HASSANALI, 2020). Ainda em relação a geldanamicina e seus derivados, o trabalho de CHIOSIS et. al. (2003) aponta que os inibidores de HSP90 possuem uma baixa afinidade pela chaperona (menor que 1 micromolar), todavia, possuem efeitos inibitórios potentes. Esse fenômeno contraditório é explicado pelos autores da seguinte forma: Devido às propriedades físico-químicas dos quimioterápicos, eles se acumulam no meio intracelular, de modo que a alta concentração compensa a afinidade baixa. Quanto à indução de MCI pelos inibidores de HSP90, o uso de inibidores *per se* não são eficientes na indução de morte celular imunogênica, entretanto, é provado que a combinação desses quimioterápicos com outras moléculas, como fármacos anti PD-L1 levaram à indução do evento (LIU et. al., 2020).

Um fato interessante a se pontuar em relação às moléculas indutoras MCI utilizadas neste trabalho, é que a grande maioria delas são inibidores de Topoisomerase (TPs). Um outro ponto a ser considerado é que as TPs também compartilham um sítio de ligação homólogo com as chaperonas, girases e quinases. Embora a homologia entre HSP90 e TP II seja baixa (cerca

de 16%), o sítio de ligação com o ATP pode ser sobreposto *in silico*, mostrando uma similaridade estrutural (JUN; KWON, 2016; SKOK et. al., 2020).

Semelhante à importância das chaperonas para a proteostase, a Topo II é crucial para o funcionamento correto dos processos que envolvem a informação obtida pelo DNA, participando de processos como transcrição, replicação e separação dos cromossomos (PAN et. al., 2022). Existem duas formas de inibir topoisomerases: Atuando diretamente no sítio catalítico e impedindo que proteína forme o complexo com DNA, ou estabilizando a ligação DNA-Topo II, impedindo que o complexo seja desfeito e conseqüentemente levando à quebra da dupla fita do material genético. Os fármacos DOX e DAU, MTX e ETO atuam na estabilização-quebra da dupla fita de DNA (PAN et. al., 2022).

Entre os inibidores de topoisomerase utilizados neste trabalho, o ETO é o menos eficiente em induzir MCI. Um dos fatores que podem explicar a baixa eficiência do quimioterápico na indução de MCI é a ausência ou baixíssima exposição de calreticulina nas células tratadas (BEZU et. al., 2015). O trabalho de Solari et. al. (2020), utilizando células de adenocarcinoma de pulmão constatou que entre os quimioterápicos utilizados como tratamento padrão da doença (cis e carboplatina, ETO, paclitaxel e gemcitabina), o ETO induziu a liberação dos menores níveis de DAMPs enquanto os níveis de marcadores de autofagia foram dominantes.

Nos ensaios *in silico* deste trabalho, a interação do ETO com as chaperonas ocorreu de forma significativa tanto quando considerada a proteína GRP94 (tabela 6), quanto quando considerada a proteína HSP90A. Todavia, durante os testes para identificar se as poses se repetiam em ensaios nas duas plataformas de docagem utilizadas (Figura 19), não ocorreu uma sobreposição, de modo que as interações não foram caracterizadas nos testes seguintes.

Apesar de Solari et. al. (2020) apresentar o ETO como um fraco indutor da liberação de calreticulina em linhagens de pulmão, trabalhos com a linhagem de leucemia HL-60 apresentam uma liberação acentuada do DAMP após o tratamento com o fármaco. Entre os quatro quimioterápicos utilizados (DAU, citarabina, ETO e fludarabina), apenas a DAU foi capaz de apresentar melhores resultados. Junto com a DAU, o ETO obteve destaque na liberação dos principais DAMPS (Calreticulina, HMGB1 e ATP), maturação de células dendríticas e indução da proliferação de células T (OCADLIKOVA et. al., 2020).

A análise da literatura permite identificar que apesar de ser um fraco indutor de MCI em algumas linhagens oncológicas, entre elas no adenocarcinoma de pulmão, linhagens como a HL-60 não apenas possuem uma alta exposição de DAMPs após a exposição ao ETO, como são capazes de induzir o recrutamento e a maturação de células da imunidade inata e adquirida.

Outro fator importante da atividade do fármaco é a potência na indução de senescência e de autofagia. É provável que esse balanço entre diferentes tipos de destino celular, que diferem entre as diferentes linhagens, seja um determinante para a potência na indução de MCI pelo etoposídeo.

Excetuando o ETO, todos os outros inibidores de TP II utilizados neste trabalho apresentam uma alta taxa de sucesso na indução de MCI, de modo que costumam ser utilizados como controles positivos em ensaios *in vitro* e *in vivo* que investigam esse tipo de morte celular. Considerando os achados da literatura e os resultados deste trabalho, apenas a MTX será explorada neste momento. A discussão das antraciclinas será realizada como último tópico deste capítulo.

Nos ensaios *in silico*, a MTX ficou entre as quatro melhores interações três das seis vezes nos testes com HSP90A, todavia, não se destacou durante os testes com GRP94. Semelhante ao que ocorreu com o ETO, nenhuma das interações entre MTX e HSP90A ficaram sobrepostas nas análises do DockThor e AutoDock Vina, assim, o quimioterápico não teve sua interação analisada.

A MTX é uma antracenediona normalmente usada no tratamento de leucemia mieloide aguda, carcinoma de mama, linfoma não Hodgkin e carcinoma de próstata (BEZU, 2015). Considerando que as antracenedionas são moléculas estruturalmente semelhante às antraciclinas, tanto MTX quanto DOX compartilham semelhanças em mecanismo de ação, capacidade de indução de MCI e também dividem algumas toxicidades, a exemplo da cardiotoxicidade (AMDANI et. al., 2016).

Semelhante às antraciclinas, num contexto de MCI, a MTX leva à exposição da calreticulina, HSPs 70 e 90, liberação do HMGB1 e de ATP. O trabalho de Bezu et. al. (2018) também identificou que o tratamento de células com antraciclinas leva à fosforilação de eIF2 α sem desencadear continuamente outras manifestações de estresse do retículo. A fosforilação de eIF2 α está fortemente associada para a exposição de calreticulina e conseqüentemente da indução de MCI. A revisão de Zhai et. al. (2023) aponta que a MTX foi capaz de induzir MCI em cânceres de próstata, melanoma, osteossarcoma e cólon e teve a fosforilação do eIF2 α como mecanismo principal de indução.

Levando em consideração as moléculas que ocuparam as melhores posições em relação às afinidades, tanto a STA, quanto às antraciclinas obtiveram os três melhores lugares no *ranking* de melhores energias. Partindo das hipóteses do início deste trabalho, em que a provável inibição das chaperonas HSP90, somadas a outros eventos estressores, especialmente relacionados à danos ao DNA/Estresse de retículo poderiam ser importantes na indução de

morte celular imunogênica nas diversas linhagens tumorais, os ensaios de docagem molecular exibem dois resultados, um “positivo” e um “negativo”. Mais especificamente, retomando o gradiente de indução de MCI dos quimioterápicos utilizados nos testes *in silico*, os dois extremos obtiveram os melhores resultados de interação. Esses resultados, aparentemente contraditórios serão discutidos a seguir.

Entre os grupos de quimioterápicos citotóxicos não indutores de MCI estão as estaurosporinas, potentes inibidores de tirosina-quinases cuja atividade citotóxica leva à ocorrência de apoptose, especialmente através de mecanismos dependentes e independentes da via das caspases, além de ativação de algumas vias autofágicas (HA et. al., 2014). Diferente de inibidores para tirosinas quinases específicas, como o Lapatinibe (inibidor potente e reversível das proteínas ErbB1 e ErbB2), a STA é um dos mais potentes inibidores de tirosina quinase e o mais promíscuo entre eles (KARAMAN et. al., 2008; OMURA; ASAMI; CRUMP, 2018). De acordo com a revisão de PETRAZZUOLO et. al. (2022), o único inibidor de quinases que efetivamente leva à deflagração de MCI é o Crizotinib. Ademais, a morte celular induzida por estaurosporina normalmente é acompanhada pelo aumento do número de autofagossomos como ferramenta de citoproteção, opondo-se à maquinaria apoptótica e dano mitocondrial, incluindo à dissipação do potencial de membrana da organela (TOLKOVSK et. al., 2002). O trabalho de Ha et. al. (2014) também observou que a inibição das vias de autofagia e mitofagia em células neuronais dopaminérgicas aumentava a taxa de morte celular induzida por STA.

Apesar do consenso da não indução de MCI pela estaurosporina pela literatura, durante os ensaios de docagem molecular utilizando o sítio de ligação de ATP, tanto nas proteínas GRP94, quanto nas HSP90A, a molécula apresentou as melhores afinidades (Tabelas 5 e 6) dentre os fármacos utilizados, especialmente nas afinidades pela HSP90A, cujos valores de interação ultrapassaram os valores de -9 kcal/mol em quatro dos seis testes realizados. Foi também em um dos ensaios com HSP90A que duas poses se sobrepuseram em duas plataformas, especificamente na estrutura 4NH7 (Figuras 21 e 22).

Entre as interações observadas entre STA e 4NH7 destacam-se as interações de van der Waals circundando toda a molécula, bem como de algumas pontes de hidrogênio, em especial entre os agrupamentos NH e o resíduo de tirosina TYR123 na plataforma DockThor (TYR139 no AutoDock Vina) (Fig. 22). Além disso, duas interações que só ocorreram entre as moléculas de estaurosporina foram as pi-sigma e empilhamento pi-pi, todas na cadeia não flexível da molécula. A interação de empilhamento pi-pi é do tipo dipolo-dipolo e ocorre entre anéis aromáticos e/ou hétero aromáticos devido principalmente à polarização das nuvens eletrônicas ou à atração eletrostática dos elétrons desses anéis (FOKOUÉ et. al., 2020). A

interação pi-sigma, por sua vez, diz respeito à mais de uma interação do resíduo de aminoácido com a estrutura molecular. Nesse caso, a mesma região da molécula faz mais de uma ligação, sendo a principal considerada sigma e as outras denominadas de pi. No caso da interação da STA, os resíduos de metionina MET82 e de leucina LEU91 (ou MET98 e LEU107 no AutoDock Vina) realizam esse tipo de ligação com a cadeia de anéis aromáticos do fármaco.

O domínio catalítico de todas as quinases (não apenas as tirosina-quinases) apresentam uma alta homologia entre si, especialmente no local de ligação com o ATP. Apesar disso, a interação entre ATP e quinases variam a depender da estrutura proteica e de outros fatores. Essas diferenças permitiram que derivados de STA cada vez mais específicos para quinase únicas fossem desenvolvidos (OMURA et. al., 2018). Um outro ponto interessante sobre o domínio de ligação com ATP das quinases, é que esta homologia se mantém não apenas entre quinases, mas entre outras superfamílias, como girases e proteínas de choque térmico (SOMU et. al, 2024).

Considerando a hipótese de que a inibição da chaperona HSP90 é um fator importante para a indução de MCI, a forte interação *in silico* entre STA e HSP90 é um ponto contraditório. Contudo, levando em a altíssima afinidade das STA por proteínas do tipo quinase, inclusive àquelas não tirosina-quinase, somados à alta diversidade e expressão desse grupo de proteínas (518 genes para síntese de quinases estão presentes no genoma humano), especialmente num contexto de oncogênese e progressão tumoral, parece plausível que, apesar de possuir um sítio de ligação com ATP semelhantes, diante de um contexto de superexpressão não apenas de chaperonas, mas de quinases, as moléculas de STA acabariam ligando-se majoritariamente aos seus alvos prioritários, de forma que, mesmo se houvessem interações entre algumas dessas moléculas e as chaperonas (além de girases e outras superfamílias com o sítio de ATP homólogo), a interação não levaria a uma potencialização de estresse de retículo e tampouco, a promoção de MCI (CICENAS et. al., 2018; KROEMER et. al., 2022).

Por fim, entre as melhores interações que se repetiram nos ensaios com a HSP90A e GRP94, estão as antraciclinas e indutoras genuínas de MCI, doxorubicina e daunorrubicina. Considerando que a maioria dos testes relacionados à indução de MCI utilizam a DOX, e que a única diferença entre as duas estruturas é a presença de mais um carbono na DOX, as moléculas serão discutidas num mesmo tópico.

O trabalho de Wang et. al. (2021) identificou, por meio da técnica de *microarray* de proteínas, a ligação entre DOX e GRP94. Todavia, como já citado neste trabalho, a caracterização desta interação não foi realizada. O presente trabalho pretende somar aos achados de Wang et. al. (2021), considerando a hipótese de que as moléculas de DOX e DAU interajam com a subunidade N-terminal de GRP94.

Caracterizando a interação entre as antraciclinas e a estrutura 7ULL (Figuras 25-28), é necessário inicialmente salientar que apesar de se ligarem no mesmo local, e interagirem com aminoácidos próximos, as poses de DOX e DAU não se sobrepõem entre si. Todavia, interações como a ponte de hidrogênio entre os resíduos de lisina LYS95 ocorrem no mesmo local das duas moléculas (Fig. 26 e 28). Ainda em relação à presença de pontes de hidrogênio, entre as moléculas cujas interações foram analisadas, as antraciclinas são as que mais apresentam este tipo de ligação, especialmente nos ensaios utilizando o DockThor. As interações de hidrogênio se concentram especialmente na região do “açúcar” presente na molécula. Além das interações de hidrogênio, as moléculas são circundadas por interações de van der Waals e também possuem interações do tipo pi-alquil e empilhamento amida-pi. O último, caracterizado pela interação não covalente entre a face de um sistema pi rico em elétrons e um agrupamento amida. Alguns estudos definem esta interação como importante para estabilização de um ligante em um sítio de ligação (FOKOUÉ et. al., 2020). As interações do tipo empilhamento amida-pi ocorrem tanto entre DOX-7ULL, quanto no complexo DAU-7ULL, ambas entre a molécula e o resíduo de asparagina ASN34. O aminoácido asparagina possui uma carboxamida como grupo funcional de sua cadeia lateral.

Caracterizar a interação *in silico* entre as antraciclinas e as estruturas utilizadas é um trabalho simples quando comparado à busca na literatura de outros indícios que sustentem a hipótese de que DOX é capaz de inibir HSP90, especialmente à subunidade N-terminal, e que isso tem efeito no potencial do quimioterápico de induzir morte celular imunogênica. O principal desafio destas comparações reside em dois fatos principais: Primeiro, pode parecer desafiador compreender se os sinais relacionados ao estresse de proteínas mal enoveladas relacionados à ação da DOX ocorre devido à interação com as HSP90 ou devido ao próprio mecanismo de toxicidade de molécula; segundo, o próprio papel das chaperonas no contexto do câncer parece dúbio a depender do tipo de tumor e de variáveis espaciais e temporais.

Dentre as formas diretas de caracterizar a interação entre um fármaco e a uma proteína estão a co-cristalização de estruturas e ensaios de ligação mais específicos como a calorimetria de titulação isotérmica, entre outros. Estes ensaios por si são capazes de identificar/caracterizar a ligação, especialmente a cristalografia. Todavia, a caracterização da ligação por si só não permite a observação dos efeitos biológicos e a perturbação desses fatores, assim, uma outra forma de identificar se um fármaco é capaz de inibir HSP são os métodos indiretos (NECKERS et. al., 2018).

O primeiro indício indireto de que um fármaco é capaz de interagir com proteínas de choque térmico é o aumento da expressão do fator de choque térmico 1 (HSF1, do inglês *heat*

shock factor 1), o principal regulador da resposta a proteínas mal enoveladas. Durante a própria oncogênese e diante de estresses causados ou não por quimioterápicos, especialmente o estresse de retículo, ocorre o aumento da concentração do fator de transcrição HSF1, que ao se ligar no DNA, leva ao aumento da síntese de proteínas relacionadas à correção do estresse de retículo, entre elas as próprias HSPs e o aumento da síntese de proteossomas, capazes de diminuir o excesso de proteínas mal dobradas (MENDILLO et. al., 2012).

Tanto inibidores de N-terminal, quanto os de C-terminal de HSP90 são capazes de modular a atividade de HSF1, de maneiras distintas. Enquanto a novobiocina, inibidor de C-terminal leva à modulação de HSF1 sem modificar a interação entre o fator e a chaperona, mas modulando a atividade de HSF1/HSP90 através de modificações na autofosforilação; o inibidor de N-terminal geldanamicina impede a dissociação do trímero de HSF1 (CONDE et. al., 2009). Em suma, o trabalho de Conde et. al. (2009) aponta que, tanto a inibição de C-terminal, quanto de N-terminal levam a alterações na expressão e funcionamento de HSF1. A relação entre HSF1, DOX e paclitaxel é tratada no trabalho de Vydra et. al. (2013), onde células de melanoma tornaram-se resistentes aos dois fármacos após a superexpressão de HSF1. Entretanto, esse mecanismo não dependeu da acumulação de HSPs, mas do aumento da expressão de transportadores do tipo ABC, levando ao efluxo das drogas (VYDRA et. al., 2013). O trabalho de Huang et. al. (2016), considerando a cardiotoxicidade da DOX, identificou que o quimioterápico diminuiu a interação entre HSF1 e a HSP70 CHIP, levando o fator à degradação via proteossoma. A indução de superexpressão de CHIP, por sua vez, diminuiu a toxicidade induzida por DOX e levou ao aumento de HSF1 no núcleo das células, diminuindo a taxa de apoptose (HUANG et. al., 2016). Por fim, o trabalho de Desai et. al. (2013) também aponta o papel da superexpressão de HSF1 na indução de quimiorresistência à cisplatina mediada por autofagia.

De acordo com os parágrafos anteriores, DOX, paclitaxel e cisplatina, os dois últimos capazes de inibir HSP90, possuem uma relação direta entre o fator HSF1 e a resistência ao tratamento quimioterápico. Ao procurar nas bases de dados a relação entre STA e HSF1, o trabalho de Erdos e Lee (1994) aponta que o uso de STA em células da linhagem HT-29 não alteram a expressão de genes para HSPs (ERDOS; LEE, 1994). Outros trabalhos relacionam o fármaco ao aumento da expressão de HSP70, mas de forma indireta, devido à inibição de quinases e a consequente modificação da fosforilação desses fatores, embora haja controvérsias se essas modificações de fato influenciam a função de HSF1 (YADAV et. al., 2015).

Outro método indireto para sustentar a hipótese de um fármaco inibir HSP90 é observar se o uso deste leva à diminuição na expressão de proteínas clientes (NECKERS et. al.,

2018). Um dos principais exemplos de clientes para HSP90 é a tirosina quinase HER2. Utilizando a metodologia de *Western Blot*, Nurhayati et. al. (2020) observou que o uso de DOX 10nM em células da linhagem MCF-7 levou à diminuição da expressão de HER2 quando comparados com o controle negativo. Considerando que o artigo buscava investigar se o uso de DOX com um co-quimioterápico aumentava as taxas de apoptose em células MCF-7, não foi discutido a fundo essa diminuição em HER2 e nem a relação deste fenômeno com chaperonas. O trabalho de Mohammadian et. al. (2020), também utilizou a DOX sozinha e em combinação com o inibidor de HSP90 NVP-AUY922 para comparar a expressão de mRNA de outro cliente de HSP90, VEGF. Nenhum dos fármacos utilizados como monoterapia levou à diminuição dos níveis de mRNA de VEGF nas células MCF-7, mas a combinação dos fármacos potencializou a apoptose e levou também à diminuição nesses níveis (MOHAMMADIAN et. al., 2020). Apesar de interessante pontuar a sinergia entre DOX e NVP-AUY922, os resultados dos experimentos dos fármacos isolados foram bastante semelhantes. Vale lembrar, entretanto, que os testes realizados observaram modificações na concentração de mRNA, podendo relacionar esses efeitos mais na promoção da angiogênese do que como um indício de inibição de HSP90.

Não foram encontrados trabalhos na literatura que utilizem *Western Blot* para avaliar se a DOX é mesmo capaz de diminuir a expressão de proteínas clientes de HSP90, os resultados no trabalho de Nurhayati et. al. (2020) não citam a se existe ligação entre a chaperona e a mudança na expressão de HER2, tampouco relaciona esses eventos à indução de MCI. Essa lacuna de estudos relacionando HSP90, antraciclinas e morte celular imunogênica é um espaço a ser preenchido em pesquisas futuras.

Considerando a natureza *multi-target* dos produtos naturais; a heterogeneidade das células tumorais quando comparadas tanto entre o mesmo tipo celular, e principalmente entre diversas linhagens e tecidos e as modificações na fisiologia celular e tecidual quando alvos são modulados durante o tratamento anticâncer, uma série de novos estudos de ser empregada a fim de melhor compreender a veracidade e a caracterização da interação entre antraciclinas e proteínas de choque térmico. Considerando ainda a possível relação desta interação com o potencial imunogênico dessas moléculas, uma série ainda maior de fatores deve ser considerada, tais como tipos celulares que diferem quanto à expressão proteica, complexidade de microambientes tumorais, testes utilizados, entre outros. Deste modo, os resultados do presente trabalho, somados aos resultados encontrados na literatura, possibilitam novos *insights* na busca da compreensão dos mecanismos de ação das antraciclinas e na caracterização de sua imunogenicidade.

6.2. Resultados *in vitro*

A realização dos ensaios fenotípicos *in vitro* utilizou linhagens de carcinoma de mama humanos MDA-MB-231 e MCF-7. A escolha das linhagens ocorreu pelo fato de DOX ser uma das escolhas farmacológicas para tratamento de câncer de mama, especialmente nos HER-2 negativos em estágios menos avançados e em tumores HER-2 positivos em estágios iniciais como terapia adjuvante (MACKEY et. al., 2016; VON MINCKWITZ et. al., 2018). Embora não usada na clínica, existem trabalhos que utilizam STA nas linhagens escolhidas para este trabalho (CYR; LANGLER; LAVIGNE, 2008).

A determinação da CI_{50} dos fármacos ocorreu através do ensaio do MTT. Para a determinação das concentrações inibitórias médias nos tratamentos de 72h, os fármacos apresentaram valores de CI_{50} abaixo de $1\mu\text{M}$ para ambas as linhagens. Entretanto, nos tratamentos de 24h, os valores para os tratamentos com DOX apresentaram concentrações maiores em relação à literatura (acima de $8\mu\text{M}$ para as duas linhagens). A consulta à literatura aponta uma variação para as CI_{50} da antraciclina nos diversos trabalhos, desde concentrações mais baixas como $0,5\mu\text{M}$ para MCF-7 (AHMED et. al., 2023) até $3,7\mu\text{M}$ para a mesma linhagem (ANDAC et. al., 2023). Considerando que o fármaco é ciclo específico e atua durante a fase S da divisão celular, é possível que os altos valores de CI_{50} tenham ocorrido devido a um maior tempo das linhagens celulares em realizar a duplicação, considerando que os tratamentos duraram 24h. Isso pode explicar os valores de CI_{50} mais uniformes nos tratamentos de 72h. Considerando as altas concentrações de CI_{50} , optou-se por utilizar nos tratamentos a $CI_{50/2}$, a fim de diminuir as quantidades de fármacos utilizados e a consequente citotoxicidade.

Embora seja um teste barato e útil para a triagem de fármacos, o ensaio do MTT é limitado quando comparado a testes mais complexos como o de formação de colônias (também chamado de ensaio clonogênico). O tratamento com DOX, mesmo utilizando a $CI_{50/2}$, levou à diminuição de mais de 99% no crescimento de novas colônias quando comparados ao controle negativo (Fig. 33). O tratamento com STA, por sua vez, levou à diminuição de mais de 50% em todos os tratamentos, embora, diferente da DOX, fosse possível observar a presença de colônias a olho nu. O uso de inibidores nos tratamentos não influenciou na toxicidade dos fármacos utilizados, além disso, na maioria dos tratamentos, as colônias tratadas anteriormente com os inibidores isolados, não sofreram alteração em relação ao controle negativo. A única exceção se deu no tratamento da linhagem MDA-MB-231 com o inibidor de IRE1 α Kira6.

Considerando a origem histológica das duas linhagens, MCF-7 são células do tipo luminal, negativas para HER-2, mas positivas para os receptores de estrogênio e progesterona, enquanto as células MDA-MB-231 são do tipo basal e triplo negativo para os três principais receptores. De modo geral, a linhagem MCF-7 pode ser considerada mais sensível ao tratamento hormonal, enquanto MDA-MB-231 é mais sensível à modulação por quimioterapia. Essas diferenças em relação à sensibilidade a sinais podem explicar o efeito do tratamento com Kira6 isolado na formação de colônias de MDA-MB-231 (GEST et. al., 2013).

O trabalho de Rahman et. al. (2024), após encubar células da linhagem MDA-MB-231 com o derivado de ácido graxo denominado de CTU observou que após o tratamento das células, uma população residual resistia ao tratamento, sendo capaz de crescer nos testes de formação de colônias. Os autores então realizaram a caracterização do estresse de retículo e de marcadores inflamatórios, e observaram que durante o tratamento, a via de ER mediada por IRE1 α se sobressaía em relação às outras duas. O tratamento combinado de CTU com o inibidor de IRE1 α não apenas potencializou a ação do fármaco, como preveniu a formação de novas colônias. Desse modo, é possível que nas linhagens triplo negativas, a via da IRE1 α se sobressaía em relação aos mecanismos de reincidência das células, o que pode explicar a maior sensibilidade da linhagem MDA-MB-231 no tratamento com o inibidor Kira6 em relação à formação de colônias.

Considerando que o estresse de retículo (ER) é o principal evento iniciador para a morte celular imunogênica (MCI), foram realizados os ensaios de Western Blotting com os quimioterápicos DOX e STA, sozinhos e em combinação com inibidores das duas principais vias de ER, PERK e IRE1 α . Trabalhos investigando a modulação de vias de ER após incubação com DOX em linhagens de mama são conhecidos na literatura, todavia, poucos trabalhos relacionam a modulação do estresse reticular causado pela STA. A escolha dos anticorpos utilizados considerou a modulação de proteínas importantes para a ocorrência de ER de modo geral (HSP90, HSP70 e BiP) e relacionadas às vias específicas de estresse, sendo P-eIF2 α /eIF2 α mais relacionadas à ativação de PERK e XBP1s relacionada à ativação de IRE1 α . A figura 31 apresenta os principais resultados.

A BiP ou GRP78 é a proteína sinal para o início da sinalização de proteínas mal enoveladas (UPR). A chaperona é normalmente superexpressa em tumores, de modo a aliviar o UPR basal, além de auxiliar na resistência à apoptose causada por quimioterápicos (LU; LUO; ZHU, 2020). Diversos estímulos estressores podem levar à regulação positiva de GRP78, entre eles, a inibição de quinases (OAKES, 2020). Desse modo, os tratamentos com STA levaram ao aumento da expressão de GRP78/BiP na linhagem MDA-MB-231. Embora apenas o último

grupo experimental (STA+GSK2606414) tenha apresentado relevância estatística, é possível observar graficamente que o uso de STA na linhagem aumentou a expressão de BiP em pelo menos 100%. Enquanto a linhagem MDA-MB-231 apresentou um aumento na expressão da chaperona, os tratamentos com a linhagem MCF-7 não apresentaram modulações significativas de BiP após tratamento com STA. Todavia, os tratamentos com DOX na linhagem MCF-7 levaram à diminuição da expressão da chaperona em pelo menos 50%. O resultado corrobora com os achados da literatura, em que o tratamento com DOX, embora leve ao aumento da expressão de GRP78 na maioria das linhagens oncológicas, causa o efeito oposto em MCF-7 (WANG et. al., 2016).

Após o desligamento do complexo GRP78-IRE1 α , a proteína, após fosforilação, leva ao *splicing* do mRNA XBP1u, formando o mRNA XBP1s, que por sua vez leva à síntese da proteína de mesmo nome. A proteína migra para o núcleo, onde atua regulando a expressão de genes relacionados à síntese de chaperonas, componentes que degradam proteínas mal enoveladas, dentre outros fatores que diminuem o ER. Além disso, XBP1 também atua na regulação de genes relacionados ao metabolismo lipídico e de carboidratos e na resposta imune. Diante de um estresse acentuado e persistente – causado por um quimioterápico, por exemplo – a constante ativação de XBP1s leva à clivagem inespecífica de mRNAs, que culmina com o aumento do estresse e ativação de vias de morte celular (OAKES, 2020; PARK; KANG; SO, 2021). A ativação da via IRE1 α -XBP1s leva à promoção tumoral em modelos pré-clínicos de câncer de mama triplo negativos e ao aumento da progressão tumoral em câncer de próstata, enquanto a depleção da via em gliomas humanos levou à supressão da angiogênese e regressão tumoral em modelos murinos (AUF et. al., 2010; CHEN et. al., 2014; SHENG et. al., 2019).

Nos testes realizados, não foi observada modulação significativa de XBP1s em nenhum dos tratamentos, todavia, foi possível observar um leve aumento na expressão após os tratamentos com STA. O uso do inibidor de IRE1 α Kira6 não levou à diminuição da expressão de XBP1. Embora a concentração do inibidor (1 μ M) tenha seguido outros trabalhos da literatura (TANG et. al, 2022; VO et. al., 2019), e tenha sido realizado o pré-tratamento por 1h antes da adição dos quimioterápicos, a expressão de XBP1s não foi diminuída. De acordo com o trabalho de Jiang et. al. (2016), linhagens de mama (MCF-7), cólon (HCT-116) e pulmão (H1299) possuem uma baixa expressão basal de IRE1 α /XBP1 em comparação a linhagens de mieloma múltiplo (utilizou-se no trabalho às linhagens RPMI 8226 e MM1.R). O trabalho de Jiang et. al. (2016) também identificou que nas linhagens de mieloma múltiplo, ocorre a inibição da via IRE1 α por DOX independente de Topo II, e que esse efeito é mais evidenciado nas linhagens com maior expressão basal da proteína. Apesar do leve aumento da expressão de XBP1s nos

tratamentos com STA, os resultados deste trabalho parecem inconclusivos para o marcador. Novos testes devem ser realizados a fim de melhor evidenciar e compreender essa possível interação.

No contexto de indução de MCI, a proteína XBP1s aparenta ser mais secundária em relação à via da PERK. Todavia, o trabalho de Pozzi et. al. (2016) aponta que a inibição da via IRE1 α /XBP1s aboliu a exposição de calreticulina causada pelo indutor de MCI cetuximab em linhagens de câncer colorretal por mecanismos ainda não explorados. Embora não ocupe uma posição de protagonismo na indução de MCI, a via da proteína IRE1 α é crucial para a manutenção de ER, e pode influenciar no destino celular. Considerando que para ocorrência de MCI é necessária a liberação coordenada de DAMPs, a perturbação desta via pode influenciar nessa liberação e permitir que outros sinais de morte celular se sobressaiam (KROEMER et. al., 2022).

A fosforilação de eIF2 α é considerada por Bezu et. al. (2018) como o principal sinal para ocorrência de morte celular imunogênica (MCI). Essa fosforilação ocorre após a ativação da via da proteína sinalizadora PERK. O tratamento com DOX nas linhagens de câncer de mama levou ao aumento significativo tanto da forma fosforilada de eIF2 α (Fig. 31), quanto da razão entre as formas fosforilada e não fosforilada da proteína (Fig. 32), corroborando com os resultados de Bezu et. al. (2018). Embora não apresentem relevância estatística, os testes com STA levaram ao aumento de P-eIF2 α em pelo menos 100% na linhagem MCF-7. A linhagem MDA-MB-231 aparenta ser menos sensível à modulação de P-eIF2 α por STA, além de reverter de forma menos eficiente a fosforilação durante as combinações de DOX e STA com o inibidor de PERK GSK2606414.

Especialmente em linhagens de câncer de mama triplo negativas, a fosforilação de eIF2 α é um acontecimento importante para a quimiorresistência, visto que a via P-eIF2 α /ATF4 leva à síntese de glutatona, que sequestra espécies reativas de oxigênio, diminuindo os níveis de ER (BAI et. al., 2021). O trabalho de Guo et. al. (2017), aponta que a superexpressão de P-eIF2 α está relacionada ao aumento da sobrevida livre de progressão em pacientes com câncer de mama triplo negativo, embora aponte o papel dúbio da proteína, considerando que diversos fatores, relacionados principalmente a ativação de outras vias e do próprio estresse possam desempenhar papéis opostos para o destino celular.

A expressão aumentada de PERK/P-eIF2 α pode explicar a ausência de diminuição de P-eIF2 α nos tratamentos com DOX+GSK2606414, que pôde ser observada na linhagem MCF-7, mas não foi observada em MDA-MB-231. Além disso, a linhagem pareceu menos sensível ao aumento de P-eIF2 α induzida por STA. Considerando que a mesma concentração de 5 μ M

de GSK2606414 foi utilizada nas duas linhagens, é possível que devido à expressão aumentada da proteína, uma concentração maior do inibidor deveria ser utilizada na linhagem MDA-MB-231, enquanto os resultados em MCF-7 apontam a inibição na fosforilação de eIF2 α nos tratamentos com DOX e STA pelo inibidor de PERK.

A maioria dos indutores de MCI levam à fosforilação de eIF2 α , motivo pelo qual o evento é denominado com sinal patognomônico de morte imunogênica. O aumento de P-eIF2 α está diretamente relacionado tanto à exposição de calreticulina, quanto à infiltração de células da imunidade inata e adaptativa no microambiente tumoral, proporcionando um melhor prognóstico. O bloqueio da fosforilação da proteína é capaz de abolir a liberação de calreticulina e ATP causada pelo tratamento com antraciclinas. Um ponto curioso e ainda não completamente explicado é que durante a terapia fotodinâmica, a ativação de PERK pode promover MCI mesmo diante da inibição da fosforilação de eIF2 α (GARG et. al., 2012; KROEMER et. al., 2022).

Considerando que a expressão de marcadores de MCI como calreticulina, HMGB1 e ATP não foi analisada, não é possível apontar se o uso combinado dos fármacos com os inibidores utilizados é capaz de influenciar na liberação de DAMPs, principalmente na associação entre DOX e GSK2606414, que levou à diminuição de P-eIF2 α , especialmente na linhagem MCF-7. Novos experimentos serão realizados a fim de refinar a análise e corrigir problemas experimentais.

A HSP90A, um dos principais alvos discutidos na sessão *in silico* deste trabalho, não apontou diferença estatística nos tratamentos com DOX ou STA. Entretanto, por se tratar de uma proteína essencial à manutenção celular, estudos de inibição fenotípicos costumam observar a modulação de proteínas dependentes da chaperona, somados a ensaios de ligação. Trabalhos futuros do grupo terão como finalidade investigar a possível inibição das chaperonas HSP90A e GRP94 a partir de ensaios de ligação e fenotípicos.

7. CONCLUSÃO

Foram teorizadas a interação e possível inibição das proteínas de choque térmico HSP90 pelos quimioterápicos doxorubicina (DOX) e daunorrubicina. Os ensaios realizados também apontam uma possibilidade de interação entre a subunidade N-terminal da chaperona e o inibidor de tirosina quinase estaurosporina (STA). Os ensaios *in vitro* apontam uma maior dependência da linhagem MDA-MB-231 à modulação de IRE1 α na formação de colônias e uma menor sensibilidade à modulação de PERK. O uso de DOX corroborou com os resultados da literatura de estresse de retículo. O uso de STA adicionou novos dados relacionados ao estresse de retículo, especialmente ao aumento da fosforilação de eIF2 α .

REFERÊNCIAS

- AHMED, Zahra *et al.* Increasing Chemotherapeutic Efficacy Using pH Modulating and Doxorubicin Releasing Injectable Chitosan-Polyethylene Glycol Hydrogels. **Biorxiv**, [S.L.], p. 1-33, 8 jul. 2023. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/2023.07.06.547993>.
- ALMASRI, Ihab M. *et al.* Exploring polypharmacology of some natural products using similarity search target fishing approach. **International Journal Of Computational Biology And Drug Design**, [S.L.], v. 11, n. 4, p. 295, 2018. Inderscience Publishers. <http://dx.doi.org/10.1504/ijcbdd.2018.096126>.
- ALMEIDA, Sérgio F. de *et al.* Stimulation of an Unfolded Protein Response Impairs MHC Class I Expression. **The Journal Of Immunology**, [S.L.], v. 178, n. 6, p. 3612-3619, 15 mar. 2007. The American Association of Immunologists. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.178.6.3612>.
- AMDANI, Shahnawaz M. *et al.* Cardiovascular Effects of Anthracycline Chemotherapy and Radiation Therapy in Children with Cancer. **Clinical Cardio-Oncology**, [S.L.], p. 397-431, 2016. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-323-44227-5.00019-3>.
- ARIA, Hamid; REZAEI, Marzieh. Immunogenic cell death inducer peptides: a new approach for cancer therapy, current status and future perspectives. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 161, p. 114503-114518, maio 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114503>.
- AUF, Gregor; JABOUILLE, Arnaud; GUÉRIT, Sylvaine; PINEAU, Raphaël; DELUGIN, Maylis; BOUCHECAREILH, Marion; MAGNIN, Noël; FAVEREAUX, Alexandre; MAITRE, Marlène; GAISER, Timo. Inositol-requiring enzyme 1 α is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 107, n. 35, p. 15553-15558, 11 ago. 2010. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0914072107>.
- BEZU, Lucillia *et al.* Combinatorial Strategies for the Induction of Immunogenic Cell Death. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 6, p. 1-11, 24 abr. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2015.00187>.
- BEZU, Lucillia *et al.* EIF2 α phosphorylation is pathognomonic for immunogenic cell death. **Cell Death & Differentiation**, [S.L.], v. 25, n. 8, p. 1375-1393, 22 jan. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41418-017-0044-9>.
- BIRBO, Bereket *et al.* Role of HSP90 in Cancer. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 19, p. 10317-10326, 25 set. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms221910317>.
- CASARES, Noelia *et al.* Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. **The Journal Of Experimental Medicine**, [S.L.], v. 202, n. 12, p. 1691-1701, 19 dez. 2005. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20050915>.

CHEN, Simiao *et al.* Estimates and Projections of the Global Economic Cost of 29 Cancers in 204 Countries and Territories From 2020 to 2050. **Jama Oncology**, [S.L.], v. 9, n. 4, p. 465, 1 abr. 2023. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jamaoncol.2022.7826>.

CHEN, XI *et al.* XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1 α pathway. **Nature**, [S.L.], v. 508, n. 7494, p. 103-107, 23 mar. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature13119>.

CHEN, XI; CUBILLOS-RUIZ, Juan R.. Endoplasmic reticulum stress signals in the tumour and its microenvironment. **Nature Reviews Cancer**, [S.L.], v. 21, n. 2, p. 71-88, 19 nov. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41568-020-00312-2>.

CHOWDHURY, Surid Mohammad; HOSSAIN, Md. Nuruzzaman; RAFF, Md. Rajdoula. In silico design and evaluation of novel 5-fluorouracil analogues as potential anticancer agents. **Heliyon**, [S.L.], v. 6, n. 9, p. 4978, set. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04978>.

CHU, Edward; DEVITA JUNIOR, Vincent T.. **Physicians' Cancer Chemotherapy Drug Manual**. Burlington, Massachusetts: Jones & Bartlett Learning, 2021. 888 p.

CICENAS, Jonas *et al.* Kinases and Cancer. **Cancers**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 63, 1 mar. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cancers10030063>.

CONDE, Renaud *et al.* Modulation of Hsf1 activity by novobiocin and geldanamycin. **Biochemistry And Cell Biology**, [S.L.], v. 87, n. 6, p. 845-851, dez. 2009. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/o09-049>.

CYR, Louis; LANGLER, Richard; LAVIGNE, Carole. Cell Cycle Arrest and Apoptosis Responses of Human Breast Epithelial Cells to the Synthetic Organosulfur Compound p-Methoxyphenyl p-Toluenesulfonate. **Anticancer Research**, [S.L.], v. 28, N. 5A, p. 2753-2764, set. 2008. International Institute of Anticancer Research.

DESAI, Shruti *et al.* Heat Shock Factor 1 (HSF1) Controls Chemoresistance and Autophagy through Transcriptional Regulation of Autophagy-related Protein 7 (ATG7). **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 288, n. 13, p. 9165-9176, mar. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m112.422071>.

ERDOS, G.; LEE, Y.J.. Effect of Staurosporine on the Transcription of HSP70 Heat Shock Gene in HT-29 Cells. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [S.L.], v. 202, n. 1, p. 476-483, jul. 1994. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1994.1953>.

ERNST, Justin T.; LIU, Michael; ZUCCOLA, Harmon; NEUBERT, Timothy; BEAUMONT, Kevin; TURNBULL, Amy; KALLEL, Adam; VOUGHT, Bryan; STAMOS, Dean. Correlation between chemotype-dependent binding conformations of HSP90 α/β and isoform selectivity—Implications for the structure-based design of HSP90 α/β selective inhibitors for treating neurodegenerative diseases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S.L.], v. 24, n. 1, p. 204-208, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.11.036>.

FOKOUE, Harold *et al.* HÁ ALGO NOVO NO RECONHECIMENTO MOLECULAR APLICADO À QUÍMICA MEDICINAL? *Química Nova*, [S.L.], p. 1-12, 2020. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170474>.

FU, Shunli *et al.* Blockage of HSP90 and IDO1 pathway by α -MSH modified nanoelicitator to dual-facilitate mild photothermal therapy. *Pharmaceutical Science Advances*, [S.L.], v. 1, n. 2, p. 100009, dez. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pscia.2023.100009>.

FUCIKOVA, Jitka *et al.* Detection of immunogenic cell death and its relevance for cancer therapy. *Cell Death & Disease*, [S.L.], v. 11, n. 11, p. 1-13, 26 nov. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-020-03221-2>.

GALATI, Salvatore *et al.* Recent Advances in In Silico Target Fishing. *Molecules*, [S.L.], v. 26, n. 17, p. 5124-5132, 24 ago. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26175124>.

GALLUZZI, Lorenzo *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2018. *Cell Death & Differentiation*, [S.L.], v. 25, n. 3, p. 486-541, 23 jan. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>.

GALLUZZI, Lorenzo *et al.* Consensus guidelines for the definition, detection and interpretation of immunogenic cell death. *Journal For Immunotherapy Of Cancer*, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 337-358, mar. 2020. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/jitc-2019-000337>.

GALLUZZI, Lorenzo *et al.* Immunogenic cell death in cancer: concept and therapeutic implications. *Journal Of Translational Medicine*, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 1-8, 2 mar. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12967-023-04017-6>.

GARG, Abhishek D *et al.* A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. *The Embo Journal*, [S.L.], v. 31, n. 5, p. 1062-1079, 17 jan. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2011.497>.

GEST, Caroline *et al.* Rac3 induces a molecular pathway triggering breast cancer cell aggressiveness: differences in mda-mb-231 and mcf-7 breast cancer cell lines. *Bmc Cancer*, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 1-10, 6 fev. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-13-63>.

GIURINI, Eileena F.; GODLA, Aishvarya; GUPTA, Kajal H.. Redefining bioactive small molecules from microbial metabolites as revolutionary anticancer agents. *Cancer Gene Therapy*, [S.L.], v. 31, n. 2, p. 187-206, 10 jan. 2024. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41417-023-00715-x>.

GUO, Liang *et al.* Phosphorylated eIF2 α predicts disease-free survival in triple-negative breast cancer patients. *Scientific Reports*, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1, 15 mar. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep44674>.

HA, Ji-Young *et al.* Simultaneous activation of mitophagy and autophagy by staurosporine protects against dopaminergic neuronal cell death. *Neuroscience Letters*, [S.L.], v. 561, p. 101-106, fev. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.064>.

HANAHAN, Douglas; A WEINBERG, Robert. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, [S.L.], v. 100, n. 1, p. 57-70, jan. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9).

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A.. Hallmarks of Cancer: the next generation. **Cell**, [S.L.], v. 144, n. 5, p. 646-674, mar. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

HANAHAN, Douglas. Hallmarks of Cancer: new dimensions. **Cancer Discovery**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 31-46, 1 jan. 2022. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/2159-8290.cd-21-1059>.

HUANG, Chih-Yang *et al.* Doxorubicin attenuates CHIP-guarded HSF1 nuclear translocation and protein stability to trigger IGF-IIR-dependent cardiomyocyte death. **Cell Death & Disease**, [S.L.], v. 7, n. 11, p. 2455-2455, 3 nov. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2016.356>.

IMMORMINO, Robert M. *et al.* Different Poses for Ligand and Chaperone in Inhibitor-Bound Hsp90 and GRP94: implications for paralog-specific drug design. **Journal Of Molecular Biology**, [S.L.], v. 388, n. 5, p. 1033-1042, maio 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2009.03.071>.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde (org.). **Estimativa 2023**: incidência de câncer no brasil. Incidência de Câncer no Brasil. 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2023.pdf>. Acesso em: 20 mar. 2024.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. **Como surge o câncer**. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/como-surge-o-cancer>. Acesso em: 20 mar. 2024.

International Agency for Research on Cancer - IARC. **Cancer Today**. 2022. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/maps-heatmap?mode=population>. Acesso em: 20 mar. 2024.

International Agency for Research on Cancer - IARC. **Cancer Today**. 2024. Disponível em: https://gco.iarc.who.int/today/en/dataviz/bars?mode=cancer&group_populations=1&types=1&sexes=2&sort_by=value0&cancers=0&populations=76&nb_items=-1&key=total. Acesso em: 01 jun. 2024.

JIANG, Dadi *et al.* Identification of Doxorubicin as an Inhibitor of the IRE1 α -XBP1 Axis of the Unfolded Protein Response. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1, 16 set. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep33353>.

JUN, Kyu-Yeon; KWON, Youngjoo. Proposal of Dual Inhibitor Targeting ATPase Domains of Topoisomerase II and Heat Shock Protein 90. **Biomolecules & Therapeutics**, [S.L.], v. 24, n. 5, p. 453-468, 1 set. 2016. The Korean Society of Applied Pharmacology. <http://dx.doi.org/10.4062/biomolther.2016.168>.

KARAMAN, Mazen W *et al.* A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. **Nature Biotechnology**, [S.L.], v. 26, n. 1, p. 127-132, jan. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1358>.

- KROEMER, Guido *et al.* Immunogenic cell stress and death. **Nature Immunology**, [S.L.], v. 23, n. 4, p. 487-500, 10 fev. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41590-022-01132-2>.
- KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul K.; ASTER, Jon C. **Robbins, Patologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. 928 p. Tradução de Claudia Coana et.al.
- LEE, Kyung-Hun *et al.* Antitumor activity of NVP-AUY922, a novel heat shock protein 90 inhibitor, in human gastric cancer cells is mediated through proteasomal degradation of client proteins. **Cancer Science**, [S.L.], v. 102, n. 7, p. 1388-1395, 3 maio 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.01944.x>.
- LI, Zhilin *et al.* Immunogenic Cell Death Activates the Tumor Immune Microenvironment to Boost the Immunotherapy Efficiency. **Advanced Science**, [S.L.], v. 9, n. 22, p. 1-37, 2 jun. 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/advs.202201734>.
- LI, Zi-Nan; LUO, Ying. HSP90 inhibitors and cancer: prospects for use in targeted therapies (review). **Oncology Reports**, [S.L.], v. 49, n. 1, p. 1-13, 9 nov. 2022. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/or.2022.8443>.
- LIU, Yun *et al.* Nanocarrier-mediated immunogenic chemotherapy for triple negative breast cancer. **Journal Of Controlled Release**, [S.L.], v. 323, p. 431-441, jul. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.04.040>.
- LU, Guanhua; LUO, Hui; ZHU, Xiao. Targeting the GRP78 Pathway for Cancer Therapy. **Frontiers In Medicine**, [S.L.], v. 7, p. 1-6, 30 jul. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmed.2020.00351>.
- MACKEY, J.R. *et al.* Long-term outcomes after adjuvant treatment of sequential versus combination docetaxel with doxorubicin and cyclophosphamide in node-positive breast cancer: bcirg-005 randomized trial. **Annals Of Oncology**, [S.L.], v. 27, n. 6, p. 1041-1047, jun. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdw098>.
- MARDAN-NIK, Maryam *et al.* Association of heat shock protein70-2 (HSP70-2) gene polymorphism with coronary artery disease in an Iranian population. **Gene**, [S.L.], v. 550, n. 2, p. 180-184, out. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.08.012>.
- MENDILLO, Marc L. *et al.* HSF1 Drives a Transcriptional Program Distinct from Heat Shock to Support Highly Malignant Human Cancers. **Cell**, [S.L.], v. 150, n. 3, p. 549-562, ago. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.031>.
- MILLER, Kimberly D. *et al.* Cancer treatment and survivorship statistics, 2022. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians**, [S.L.], v. 72, n. 5, p. 409-436, 23 jun. 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21731>.
- MOHAMMADIAN, Mahshid *et al.* Hsp90 Inhibitor; NVP-AUY922 in Combination with Doxorubicin Induces Apoptosis and Downregulates VEGF in MCF-7 Breast Cancer Cell Line. **Asian Pacific Journal Of Cancer Prevention**, [S.L.], v. 21, n. 6, p. 1773-1778, 1 jun. 2020. EpiSmart Science Vector Ltd. <http://dx.doi.org/10.31557/apjcp.2020.21.6.1773>.

NAGARAJU, Ganji Purnachandra *et al.* HSP90 inhibition downregulates thymidylate synthase and sensitizes colorectal cancer cell lines to the effect of 5FU-based chemotherapy. **Oncotarget**, [S.L.], v. 5, n. 20, p. 9980-9991, 16 set. 2014. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.2484>.

NECKERS, Len *et al.* Methods to validate Hsp90 inhibitor specificity, to identify off-target effects, and to rethink approaches for further clinical development. **Cell Stress And Chaperones**, [S.L.], v. 23, n. 4, p. 467-482, jul. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1007/s12192-018-0877-2>.

NURHAYATI, Ika Putri *et al.* Cytotoxic and Antimetastatic Activity of Hesperetin and Doxorubicin Combination Toward Her2 Expressing Breast Cancer Cells. **Asian Pacific Journal Of Cancer Prevention**, [S.L.], v. 21, n. 5, p. 1259-1267, 1 maio 2020. EpiSmart Science Vector Ltd. <http://dx.doi.org/10.31557/apjcp.2020.21.5.1259>.

OAKES, Scott A.. Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Cancer Cells. **The American Journal Of Pathology**, [S.L.], v. 190, n. 5, p. 934-946, maio 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.01.010>.

O'DONNELL, Jake S.; TENG, Michele W. L.; SMYTH, Mark J.. Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [S.L.], v. 16, n. 3, p. 151-167, 6 dez. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41571-018-0142-8>.

OCADLIKOVA, Darina *et al.* A Screening of Antineoplastic Drugs for Acute Myeloid Leukemia Reveals Contrasting Immunogenic Effects of Etoposide and Fludarabine. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 21, n. 18, p. 6802, 16 set. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21186802>.

ŌMURA, Satoshi; ASAMI, Yukihiro; CRUMP, Andy. Staurosporine: new lease of life for parent compound of today's novel and highly successful anti-cancer drugs. **The Journal Of Antibiotics**, [S.L.], v. 71, n. 8, p. 688-701, 22 jun. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41429-018-0029-z>.

PAN, Xin *et al.* Discovery of Quinacrine as a Potent Topo II and Hsp90 Dual-Target Inhibitor, Repurposing for Cancer Therapy. **Molecules**, [S.L.], v. 27, n. 17, p. 5561, 29 ago. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules27175561>.

PARK, Sung-Min; KANG, Tae-II; SO, Jae-Seon. Roles of XBP1s in Transcriptional Regulation of Target Genes. **Biomedicines**, [S.L.], v. 9, n. 7, p. 791, 8 jul. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines9070791>.

PETRAZZUOLO, Adriana *et al.* Trial Watch: combination of tyrosine kinase inhibitors (tkis) and immunotherapy. **Oncoimmunology**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-27, 26 maio 2022. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/2162402x.2022.2077898>.

PINZI, Luca; RASTELLI, Giulio. Molecular Docagem: shifting paradigms in drug discovery. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 20, n. 18, p. 4331, 4 set. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20184331>.

POZZI, Chiara *et al.* The EGFR-specific antibody cetuximab combined with chemotherapy triggers immunogenic cell death. **Nature Medicine**, [S.L.], v. 22, n. 6, p. 624-631, 2 maio 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4078>.

QUINTÃO, Nara Lins Meira *et al.* Pharmacological Treatment of Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain: ppar γ agonists as a promising tool. **Frontiers In Neuroscience**, [S.L.], v. 13, p. 1-17, 28 ago. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2019.00907>.

RAHMAN, Md Khalilur *et al.* The inositol-requiring enzyme 1 (IRE1) endoplasmic reticulum stress pathway promotes MDA-MB-231 cell survival and renewal in response to the aryl-ureido fatty acid CTU. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, [S.L.], v. 171, p. 106571, jun. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2024.106571>.

REN, Xiufang *et al.* Immunological Classification of Tumor Types and Advances in Precision Combination Immunotherapy. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 13, p. 1-11, 28 fev. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2022.790113>.

RODRIGUES, Mosar Corrêa *et al.* An Overview on Immunogenic Cell Death in Cancer Biology and Therapy. **Pharmaceutics**, [S.L.], v. 14, n. 8, p. 1564-1581, 27 jul. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics14081564>.

SHADRACK, Daniel M.; SWAI, Hulda S.; HASSANALI, Ali. A computational study on the role of water and conformational fluctuations in Hsp90 in response to inhibitors. **Journal Of Molecular Graphics And Modelling**, [S.L.], v. 96, p. 107510-107521, maio 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmgm.2019.107510>.

SHENG, Xia *et al.* IRE1 α -XBP1s pathway promotes prostate cancer by activating c-MYC signaling. **Nature Communications**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-10, 24 jan. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-08152-3>.

SKOK, Žiga *et al.* Dual Inhibitors of Human DNA Topoisomerase II and Other Cancer-Related Targets. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 63, n. 3, p. 884-904, 8 out. 2019. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00726>.

SOLARI, José Ignacio Gonzalez *et al.* Damage-associated molecular patterns (DAMPs) related to immunogenic cell death are differentially triggered by clinically relevant chemotherapeutics in lung adenocarcinoma cells. **Bmc Cancer**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 1-14, 26 maio 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-020-06964-5>.

SOMU, Prathap *et al.* The Interplay between Heat Shock Proteins and Cancer Pathogenesis: a novel strategy for cancer therapeutics. **Cancers**, [S.L.], v. 16, n. 3, p. 638-669, 1 fev. 2024. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cancers16030638>.

SPROOTEN, Jenny *et al.* Trial watch: chemotherapy-induced immunogenic cell death in oncology. **Oncoimmunology**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 1-18, 3 jun. 2023. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/2162402x.2023.2219591>.

SREEDHAR, Amere Subbarao *et al.* Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. **Febs Letters**, [S.L.], v. 562, n. 1-3, p. 11-15, 5 mar. 2004. Wiley.
[http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793\(04\)00229-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793(04)00229-7).

VAN DER ZANDEN, Sabina Y; QIAO, Xiaohang; NEEFJES, Jacques. New insights into the activities and toxicities of the old anticancer drug doxorubicin. **The Febs Journal**, [S.L.], v. 288, n. 21, p. 6095-6111, 19 out. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/febs.15583>.

VO, Diep-Khanh Ho *et al.* G-Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER)-Specific Agonist G1 Induces ER Stress Leading to Cell Death in MCF-7 Cells. **Biomolecules**, [S.L.], v. 9, n. 9, p. 503, 18 set. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biom9090503>.

VON MINCKWITZ, Gunter *et al.* Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 380, n. 7, p. 617-628, 14 fev. 2019. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa1814017>.

VYDRA, Natalia *et al.* Overexpression of heat shock transcription factor 1 enhances the resistance of melanoma cells to doxorubicin and paclitaxel. **Bmc Cancer**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 1-11, 29 out. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-13-504>.

TAN, Shuzhen; LI, Dongpei; ZHU, Xiao. Cancer immunotherapy: pros, cons and beyond. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 124, p. 109821, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2020.109821>.

TANG, Xiao *et al.* The IRE1 α Inhibitor KIRA6 Blocks Leukotriene Biosynthesis in Human Phagocytes. **Frontiers In Pharmacology**, [S.L.], v. 13, p. 1, 22 mar. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2022.806240>.

TENG, Michele W.L. *et al.* Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. **Cancer Research**, [S.L.], v. 75, n. 11, p. 2139-2145, 31 maio 2015. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-15-0255>.

TOLKOVSKY, *et al.* Mitochondrial disappearance from cells: a clue to the role of autophagy in programmed cell death and disease?. **Biochimie**, [S.L.], v. 84, n. 2-3, p. 233-240, fev. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0300-9084\(02\)01371-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0300-9084(02)01371-8).

TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J.. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal Of Computational Chemistry**, [S.L.], v. 31, n. 2, p. 455-461, 4 jun. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.21334>.

WALTER, Peter; RON, David. The Unfolded Protein Response: from stress pathway to homeostatic regulation. **Science**, [S.L.], v. 334, n. 6059, p. 1081-1086, 25 nov. 2011. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1209038>.

WANG, Liang *et al.* A Novel Agent Enhances the Chemotherapeutic Efficacy of Doxorubicin in MCF-7 Breast Cancer Cells. **Frontiers In Pharmacology**, [S.L.], v. 7, p. 1-9, 10 ago. 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2016.00249>.

WANG, Xu *et al.* A comprehensive screening method for investigating the potential binding targets of doxorubicin based on protein microarray. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 896, p. 173896, abr. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.173896>.

XU, Dafeng *et al.* MTIF2 impairs 5 fluorouracil-mediated immunogenic cell death in hepatocellular carcinoma in vivo: molecular mechanisms and therapeutic significance. **Pharmacological Research**, [S.L.], v. 163, p. 105265, jan. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105265>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 20 mar. 2024.

WU, Jianming *et al.* Heat Shock Proteins and Cancer. **Trends In Pharmacological Sciences**, [S.L.], v. 38, n. 3, p. 226-256, mar. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2016.11.009>.

XIAO, Li; LU, Xiangyi; RUDEN, Douglas M.. Effectiveness of Hsp90 Inhibitors as Anti-Cancer Drugs. **Mini-Reviews In Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 6, n. 10, p. 1137-1143, 1 out. 2006. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/138955706778560166>.

YADAV, Suresh Singh *et al.* Anti-tumor activity of staurosporine in the tumor microenvironment of cervical cancer: an in vitro study. **Life Sciences**, [S.L.], v. 133, p. 21-28, jul. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2015.04.019>.

ZHAI, Jiaqi *et al.* Chemotherapeutic and targeted drugs-induced immunogenic cell death in cancer models and antitumor therapy: an update review. **Frontiers In Pharmacology**, [S.L.], v. 14, p. 1-15, 21 abr. 2023. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2023.1152934>.

ZHOU, Yixuan *et al.* Activation of NF- κ B and p300/CBP potentiates cancer chemoimmunotherapy through induction of MHC-I antigen presentation. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 118, n. 8, p. 1-12, 18 fev. 2021. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.2025840118>.