

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS  
BIOATIVOS**

**DAIANA KARLA FRADE SILVA**

**Efeito antitumoral e toxicidade de um novo derivado acridínico (AMTAC-17) em  
modelos *in vitro* e *in vivo***

**JOÃO PESSOA - PB**

**2020**

**DAIANA KARLA FRADE SILVA**

**Efeito antitumoral e toxicidade de um novo derivado acridínico (AMTAC-17) em  
modelos *in vitro* e *in vivo***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, para obtenção do título de doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Área de concentração: FARMACOLOGIA

**ORIENTADORA:**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marianna Vieira Sobral**

**JOÃO PESSOA – PB**

**2020**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

S586e Silva, Daiana Karla Frade.

Efeito antitumoral e toxicidade de um novo derivado acridínico (AMTAC-17) em modelos in vitro e in vivo / Daiana Karla Frade Silva. - João Pessoa, 2020.  
183 f. : il.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Derivados acridínicos. 2. Carcinoma colorretal humano. 3. Carcinoma Ascítico de Ehrlich. 4. Atividade antitumoral. 5. Toxicidade. I. Título

UFPB/BC

**DAIANA KARLA FRADE SILVA**

**Efeito antitumoral e toxicidade de um novo derivado acridínico (AMTAC-17) em  
modelos *in vitro* e *in vivo***

**APROVADA EM - 28 / 02 / 2020**

**COMISSÃO EXAMINADORA**



---

**Prof.ª Dr.ª Marianna Vieira Sobral**  
Orientadora



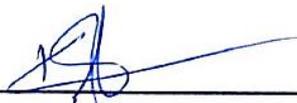
---

**Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros**  
Examinador interno



---

**Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhaes**  
Examinador interno



---

**Prof. Dr. Klinger Antonio da Franca Rodrigues**  
Examinador externo



---

**Prof. Dr. Juan Carlos Ramos Gonçalves**  
Examinador externo

Aos meus pais, **Silene e José Frade**, pelo amor  
incondicional e toda a *dedicação*.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus** pelo dom da vida e por sempre iluminar meus passos.

Aos meus pais, **Antônia Silene Gomes Frade** e **José Frade**, por todo an. cuidado e dedicação, que sempre me incentivaram, apesar das dificuldades, nunca mediram esforços para ajudar a seguir meus sonhos, e por conta disso estou aqui hoje. Serei eternamente grata por tudo que fizeram e fazem por mim. Amo vocês!

Aos meus irmãos, **Rosimira** e **Luciano** que, apesar de distantes, sempre demonstraram carinho e me incentivaram a continuar. Sou muito grata a Deus por ter vocês como irmãos. Amo vocês!

A minha amiga **Sâmia Duarte**, que foi muito mais do que uma colega de doutorado, dos inúmeros experimentos juntas, mas sim uma amiga incrível, companheira, divertida, guerreira e dedicada, o que fez com que cultivássemos uma linda amizade.

A minha amiga **Thaís Lisboa**, companheira de muitas lutas, que sempre teve palavras de incentivo, para a vida de uma maneira geral, e sempre demonstrou muito carinho nos dias de convivência.

Aos meus amigos do Laboratório de Oncofarmacologia (OncoFar), que tive o prazer de conviver diariamente e compartilhar muitos momentos de alegria, de dificuldades e desafios nos últimos anos: **Valgrícia, Rawny, Camyla, Ana Luíza, Tati Mota, Renata, Taty Kélvia, Vivianne, Paulo, Ramon e Moisés**. Muito obrigada por toda a ajuda e apoio que foram primordiais para concluir esse trabalho, bem como pela paciência e pelo carinho. Agradeço em especial a **Rafael** e **Ana Paula**, que se mostraram essenciais por seu companheirismo e dedicação, sempre dispostos a ajudar.

A minha orientadora **Marianna Vieira Sobral** pela confiança em mim depositada mesmo sem me conhecer e por acreditar que conseguiríamos concluir este trabalho. Agradeço a você como orientadora e como pessoa, que sempre me servirá como exemplo.

Ao professor **Ricardo Olímpio de Moura** pelo fornecimento das substâncias para serem testadas no meu doutorado, pela paciência e por inúmeras vezes se dispor a tirar dúvidas.

Aos professores **Davi Farias, Mirella Scardua, Juan Gonçalves, Karina Medeiros e Sandra Mascarenhas** pela colaboração na análise dos resultados e por transmitir tantos ensinamentos.

Aos professores **Isac de Medeiros, Hemerson Magalhaes, Klinger Rodrigues e Juan Gonçalves** pela gentileza de participar da avaliação deste trabalho.

Aos **professores do PPgPNSB** por todos os conhecimentos repassados, bem como a **turma de doutorado** pelos momentos compartilhados.

Ao funcionário **Seu Josué** pela alegria de todas as manhãs e pela ajuda prestada em diferentes momentos.

Aos funcionários do IPeFarM, especialmente as secretárias da pós-graduação **Caroline e Nilmar**, que sempre estiveram dispostas a ajudar.

A **Fátima de Lourdes Azevedo** por sempre se disponibilizar a ajudar e acompanhar durante os experimentos no citômetro de fluxo.

Aos funcionários do **Biotério** Prof. Dr. Thomas George do IPeFarM, **Crispim e Roberta**, pela ajuda e fornecimento dos animais.

A **Universidade Federal da Paraíba**, onde desenvolvi toda a minha carreira profissional.

A **CAPES** pelo apoio financeiro.

E a todos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização desse trabalho.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Meu agradecimento mais profundo teria que ser para uma pessoa, o amor da minha vida, meu esposo **Erick Frade Silva**, que sempre ficou ao meu lado, desde os momentos mais felizes, quanto os mais difíceis – que não foram poucos – sempre me fazendo acreditar que eu conseguiria concluir esta difícil e gratificante etapa da minha vida. Seu valioso e incansável apoio foi definitivo em todos os momentos desse trabalho. Nesse período pude perceber o quanto você é essencial em minha vida e o quanto sou grata por ter você ao meu lado, onde quero estar para sempre. Obrigada por tudo, meu amor.

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”*

*José de Alencar*

## RESUMO

O câncer é um termo que se refere a um conjunto de doenças caracterizadas pela proliferação descontrolada de células, com capacidade de invasão e metástase. Apesar dos avanços nas pesquisas no ramo da oncologia, ainda existem muitos problemas nas terapias empregadas, como a alta toxicidade e o desenvolvimento de resistência ao tratamento. Considerando os relatos na literatura de atividade anticâncer de derivados acridínicos, o presente trabalho objetivou investigar a toxicidade e a atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* de um novo composto espiroacridínico, o (*E*)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxi-benzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10*H*-espiro [acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-17), selecionado após triagem farmacológica. A atividade antitumoral *in vitro* foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio), obtendo-se um valor de concentração inibitória de 50% (CI<sub>50</sub>) de 27,19 µM sobre a linhagem de câncer de cólon HCT-116. A toxicidade *in vitro* foi avaliada em células HaCaT, L929 e Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC) (CI<sub>50</sub>: 31,40 µM, 103,50 µM e 18,62 µM, respectivamente). Nas concentrações de 30 e 60 µM em células HCT-116, AMTAC-17 alterou a progressão do ciclo celular, induzindo aumento no pico sub-G1, indicativo de morte celular por apoptose, confirmada pela externalização da fosfatidilserina e alterações morfológicas como formação de prolongamentos na membrana celular, condensação da cromatina e fragmentação nuclear, além de reduzir o nível de espécies reativas de oxigênio (EROs). No teste de toxicidade em embriões de peixe (teste FET), a concentração letal média (CL<sub>50</sub>) do AMTAC-17 foi superior a 300 µM. No ensaio de toxicidade não clínica aguda em camundongos, AMTAC-17 (2000 mg/kg; via intraperitoneal, i.p.) não induziu morte dos animais experimentais, sendo a dose letal 50% (DL<sub>50</sub>) estimada como maior que 5000 mg/kg. Para a avaliação da genotoxicidade foi realizado o teste do micronúcleo em sangue periférico de camundongos, sendo observado que AMTAC-17 (2000 mg/kg, i.p.) não induziu aumento no número de eritrócitos micronucleados. Na avaliação da atividade antitumoral *in vivo*, em modelo de Carcinoma Ascítico de Ehrlich (CAE), observou-se que AMTAC-17 (12,5; 25 ou 50 mg/kg, i.p., sete dias de tratamento) reduziu a viabilidade e o total de células tumorais peritoneais. Foi observado que AMTAC-17 (12,5 mg/kg) induziu aumento no pico sub-G1, relacionado a apoptose, reduziu a microdensidade vascular peritumoral, o que indica ação antiangiogênica, bem como aumentou os níveis das citocinas IL-1β, TNF-α, e IL-12, o que está associado à capacidade imunomoduladora. *In vivo*, AMTAC-17 não induziu alterações nos níveis de EROs. Em relação a toxicidade após tratamento antitumoral, entre todos os parâmetros avaliados (parâmetros metabólicos, bioquímicos, hematológicos e histológicos), foi observado que AMTAC-17 (12,5 mg/kg) não induziu alterações significativas. Os dados apresentados indicam que AMTAC-17 possui atividade antitumoral em células HCT-116, por induzir apoptose e promover efeito antioxidante, e *in vivo* por promover ação antiangiogênica e imunomoduladora, associado a uma baixa toxicidade não clínica.

**Palavras-chave:** Derivados acridínicos. Carcinoma colorretal humano. Carcinoma Ascítico de Ehrlich. Atividade antitumoral. Toxicidade.

## ABSTRACT

Cancer is a term that refers to a set of diseases characterized by the uncontrolled proliferation of cells, capable of invasion and metastasis. Despite the progress in oncology's researches, there are still many issues in the therapies employed, such as high toxicity and the development of resistance to current treatments. Considering the reports in the literature of antitumor activity of acridine derivatives, the present work aimed to investigate the toxicity and antitumor activity *in vitro* and *in vivo* of a new spiro-acridine compound, the (*E*)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimethoxy-benzylidene)amino)-1',5'-dihydro-10*H*-spiro[acridine-9,2'-pyrrole]-4'-carbonitrile (AMTAC-17), selected after pharmacological screening. The *in vitro* antitumor activity was evaluated by the MTT reduction test (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), obtaining a 50% inhibitory concentration value (IC<sub>50</sub>) of 27.19 μM against the colon cancer strain HCT-116. *In vitro* toxicity was assessed in HaCaT, L929 cells and Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) (IC<sub>50</sub>: 31.40 μM, 103.50 μM, and 18.62 μM, respectively). At concentrations of 30 and 60 μM in HCT-116 cells, AMTAC-17 altered the progression of the cell cycle, inducing an increase in the sub-G1 peak, indicative of cell death due to apoptosis, confirmed by the externalization of phosphatidylserine and morphological changes such as the formation of prolongations in the cell membrane, chromatin condensation, and nuclear fragmentation, as also by inducing a reduction in the level of reactive oxygen species (ROS). In the fish embryo toxicity test (FET test), the average lethal concentration (LC<sub>50</sub>) of AMTAC-17 was greater than 300 μM. In the acute non-clinical toxicity test in mice, AMTAC-17 (2000 mg/kg; intraperitoneal route, i.p.) did not induce death of the experimental animals, with 50% lethal dose (LD<sub>50</sub>) being estimated as greater than 5000 mg/kg. The micronucleus test was performed in mouse peripheral blood, and it was observed that AMTAC-17 (2000 mg/kg, i.p.) did not cause an increase in the number of micronucleated erythrocytes, indicating low genotoxicity. In the antitumor activity *in vivo*, in a model of Ehrlich's Ascitic Carcinoma (CAE), it was observed that AMTAC-17 (12.5; 25 or 50 mg/kg, i.p., seven days of treatment) reduced the viability and the total peritoneal tumor cells. AMTAC-17 (12.5 mg/kg) induced an increase in the sub-G1 peak, related to apoptosis, reduced peritumoral vascular microdensity, indicating antiangiogenic action, as well as increased levels of IL-1β, TNF-α, and IL-12 cytokines, which is associated with immunomodulatory capacity. *In vivo*, AMTAC-17 did not change ROS levels. Regarding toxicity after antitumor treatment, among all the parameters evaluated (metabolic, biochemical, hematological and histological parameters), it was observed that AMTAC-17 (12.5 mg/kg) did not induce significant changes. The data presented indicate that AMTAC-17 has antitumor activity in HCT-116 cells, by inducing apoptosis and promoting antioxidant effect, and promoting antiangiogenic and immunomodulatory action *in vivo*, associated with low non-clinical toxicity.

**Keywords:** Acridine derivatives. Human colorectal carcinoma. Ehrlich's ascitic carcinoma. Antitumor activity. Toxicity.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Características gerais das células cancerígenas .....	28
<b>Figura 2</b> - Regulação do ciclo celular .....	33
<b>Figura 3</b> - Angiogênese tumoral .....	40
<b>Figura 4</b> - Imunoedição tumoral.....	43
<b>Figura 5</b> - Estrutura dos novos compostos espiro-acridínicos .....	56
<b>Figura 6</b> - Efeito do AMTAC-17* e DXR** sobre a progressão do ciclo celular em células HCT-116 após 48 horas de tratamento .....	84
<b>Figura 7</b> - Efeito de AMTAC-17* e DXR** sobre a marcação com Anexina V/IP em células HCT-116 após 48 horas de tratamento .....	86
<b>Figura 8</b> - Efeito de AMTAC-17* e DXR** sobre a marcação com LA/IP em células HCT-116 após 48 horas de tratamento .....	87
<b>Figura 9</b> - Efeito do AMTAC-17* sobre produção de EROs após 48 horas de tratamento .....	89
<b>Figura 10</b> - Larvas de peixe-zebra expostas ao AMTAC-17* na concentração de 300 µM, ou aos controles meio E3 e DMSO a 0,5% em 96 horas .....	90
<b>Figura 11</b> - Efeitos do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-17* e 5-FU** em camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich .....	93
<b>Figura 12</b> - Efeito do tratamento de sete dias com AMTAC-17* e 5-FU** na distribuição de células de carcinoma ascítico de Ehrlich nas diferentes fases do ciclo celular ....	95
<b>Figura 13</b> - Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-17* e 5-FU** na microdensidade dos vasos peritoneais de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.....	96
<b>Figura 14</b> - Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-17* e 5-FU** na concentração de citocinas no lavado peritoneal de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.....	98
<b>Figura 15</b> - Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-17* na produção de EROs em modelo de tumor de Ehrlich .....	99

**Figura 16** - Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-17\* (12,5 mg/kg) e 5-FU\*\* (25 mg/kg) na histologia do fígado de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich..... 105

**Figura 17** - Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-17\* (12,5 mg/kg) e 5-FU\*\* (25 mg/kg) na histologia dos rins de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich..... 110

## LISTA DE FLUXOGRAMA

<b>Fluxograma 1</b> - Representação esquemática dos métodos utilizados no estudo da toxicidade e atividade antitumoral do novo composto espiro-acridínico.....	68
--	----

## LISTA DE ESQUEMA

<b>Esquema 1</b> - Via sintética para obter compostos espiro-acridínicos.....	62
<b>Esquema 2</b> - Tratamento dos animais em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich.....	74

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Citotoxicidade dos compostos espiro-acridínicos, frente linhagens tumorais e não tumoral pelo ensaio de MTT, após 72 horas de exposição .....	81
<b>Tabela 2</b> - Efeito do AMTAC-17* e DXR** sobre a viabilidade da linhagem tumoral HCT-116 e de células não tumorais .....	83
<b>Tabela 3</b> - Efeitos da administração de dose única (i.p.) de AMTAC-17* em camundongos.....	91
<b>Tabela 4</b> - Efeito da administração de dose única (i.p.) de AMTAC-17* e ciclofosfamida no número de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos após 48 horas do tratamento .....	92
<b>Tabela 5</b> - Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-17* (12,5 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) no consumo de água e de ração, e evolução ponderal de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich .....	100
<b>Tabela 6</b> - Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-17* e 5-FU** nos parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.....	101
<b>Tabela 7</b> - Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-17* (12,5 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.....	102
<b>Tabela 8</b> - Índices dos órgãos de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich após tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-17* (12,5 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) .....	103

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>5-FU</b>	5-fluorouracila
<b>ALT</b>	Alanina Aminotransferase
<b>AMTAC-17</b>	( <i>E</i> )-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxi-benzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10 <i>H</i> -espiro[acridina- 9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila
<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>APAF1</b>	Fator de ativação de protease associada à apoptose 1
<b>AST</b>	Aspartato Aminotransferase
<b>ATP</b>	Adenosina Trifosfato
<b>CAE</b>	Carcinoma Ascítico de Ehrlich
<b>CCEN</b>	Centro de Ciências Exatas e da Natureza
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>CCS</b>	Centro de Ciências da Saúde
<b>CDK</b>	Cinase Ciclina-Dependentes
<b>CDKI</b>	Inibidores de Cinase Ciclina-Dependentes
<b>CHCM</b>	Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média
<b>Cl<sub>50</sub></b>	Concentração que produz 50% de inibição no crescimento celular
<b>CL<sub>50</sub></b>	Concentração que causa 50% de letalidade nos animais
<b>CPQBA</b>	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
<b>DBM</b>	Departamento de Biologia Molecular
<b>DCFH-DA</b>	fluoróforo 2',7'-diacetato diclorofluoresceína
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dose que causa 50% de letalidade nos animais
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>DXR</b>	Doxorrubicina
<b>EGF</b>	Fator de crescimento epidérmico
<b>EGFR</b>	Receptor do fator de crescimento epidérmico
<b>e.p.m.</b>	Erro padrão da média
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>FET</b>	Teste de toxicidade em embriões de peixe

<b>GHS</b>	<i>Globally Harmonized Classification System</i>
<b>HaCaT</b>	Linhagem celular não tumoral de queratinócito humano
<b>HCM</b>	Hemoglobina corpuscular média
<b>HCT</b>	Hematócrito
<b>HCT-116</b>	Linhagem celular de carcinoma colorretal humano
<b>HE</b>	Hematoxilina-eosina
<b>HeLa</b>	Linhagem celular de colo do útero humano
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IL</b>	Interleucina
<b>i.m.</b>	Via intramuscular
<b>INCA</b>	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
<b>i.p.</b>	Via intraperitoneal
<b>IP</b>	Iodeto de propídio
<b>IPeFarM</b>	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
<b>IS</b>	Índice de seletividade
<b>L929</b>	Linhagem celular não tumoral de fibroblastos murinos
<b>LA</b>	Laranja de acridina
<b>LabRisco</b>	Laboratório de Avaliação de Risco de Novas Tecnologias
<b>m-AMSA</b>	Amsacrina
<b>mAb</b>	Anticorpos monoclonais
<b>MCF-7</b>	Linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano
<b>MDA-MB-231</b>	Linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano
<b>MMPs</b>	Metaloproteinases da matriz
<b>MTT</b>	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio
<b>NF-κB</b>	Fator de transcrição nuclear kappa B
<b>NK</b>	<i>Natural killer</i>
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>OECD</b>	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
<b>PBMC</b>	Células mononucleares do sangue periférico humano
<b>PBS</b>	Solução tampão fostato
<b>PBST</b>	PBS contendo tween 20 a 0,05%
<b>PC-3</b>	Linhagem celular de carcinoma de próstata humano

<b>PPgPNSB</b>	Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
<b>Rb</b>	Retinoblastoma
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>SK-MEL-28</b>	Linhagem celular de melanoma humano
<b>SNA</b>	Sistema Nervoso Autônomo
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>TGF</b>	Fator de crescimento transformante
<b>Th</b>	Linfócito T auxiliar
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>Treg</b>	Células T reguladoras
<b>UFPB</b>	Universidade Federal da Paraíba
<b>UFRN</b>	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
<b>VCM</b>	Volume corpuscular médio
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento do endotélio vascular
<b>VEGFR</b>	Receptor do fator de crescimento do endotélio vascular

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>22</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>25</b>
2.1	Aspectos gerais do câncer	25
2.2	Ciclo celular e apoptose	30
2.3	Angiogênese e microambiente tumoral	39
2.4	Estresse oxidativo e o câncer	47
2.5	Farmacoterapia do câncer	49
2.6	Acridina e seus derivados	53
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>58</b>
3.1	Objetivo geral	58
3.2	Objetivos específicos	58
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>61</b>
4.1	Local da pesquisa	61
4.2	Material	61
4.2.1	Amostras teste	61
4.2.2	Cultivo celular	62
4.2.3	Obtenção das células mononucleares de sangue periférico (PBMCs)	64
4.2.4	Embriões de peixe-zebra	65
4.2.5	Animais e condições experimentais	66
4.3	Métodos	67
4.3.1	<b>Estudos <i>in vitro</i></b>	<b>68</b>
4.3.1.1	Avaliação da citotoxicidade em células tumorais e não tumorais <i>in vitro</i>	68
4.3.1.2	Investigação de mecanismos de ação antitumoral <i>in vitro</i>	69
4.3.1.2.1	Avaliação do ciclo celular	69

4.3.1.2.2	Avaliação do mecanismo de morte celular (apoptose/necrose)	70
4.3.1.2.2.1	Avaliação dos efeitos de AMTAC-17 sobre a externalização da fosfatidilserina	70
4.3.1.2.2.2	Análise morfológica da apoptose	70
4.3.1.2.3	Quantificação de espécies reativas de oxigênio	71
4.3.2	<b>Estudos <i>in vivo</i></b>	<b>72</b>
4.3.2.1	Estudos toxicológicos	72
4.3.2.1.1	Avaliação da toxicidade aguda em embriões/larvas de peixe-zebra	72
4.3.2.1.2	Avaliação da toxicidade não clínica aguda	72
4.3.2.1.3	Avaliação da genotoxicidade	73
4.3.2.2	Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich	74
4.3.2.2.1	Volume do tumor, massa tumoral, viabilidade e total celular	75
4.3.2.2.2	Investigação do mecanismo de ação antitumoral <i>in vivo</i>	75
4.3.2.2.2.1	Análise do ciclo celular	76
4.3.2.2.2.2	Investigação do efeito antiangiogênico	76
4.3.2.2.2.3	Quantificação das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-4 e TNF- $\alpha$	76
4.3.2.2.2.4	Quantificação de espécies reativas de oxigênio	77
4.3.2.3	Avaliação da toxicidade em animais transplantados com células de carcinoma ascítico de Ehrlich	77
4.3.2.3.1	Avaliação ponderal e do consumo de água e de ração	77
4.3.2.3.2	Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos	77
4.3.2.3.3	Avaliação dos índices dos órgãos	78
4.3.2.3.4	Análises histológicas	78
4.4	Análise estatística	79
5	<b>RESULTADOS</b>	<b>81</b>
5.1	<b>Estudos <i>in vitro</i></b>	<b>81</b>

5.1.1	Avaliação da citotoxicidade em células tumorais e não tumoral	81
5.1.2	Avaliação dos efeitos do AMTAC-17 sobre a viabilidade celular	82
5.1.3	Investigação do mecanismo de ação antitumoral <i>in vitro</i>	83
5.1.3.1	Avaliação do ciclo celular	84
5.1.3.2	Avaliação do mecanismo de morte celular	85
5.1.3.2.1	Avaliação dos efeitos de AMTAC-17 sobre a externalização da fosfatidilserina	85
5.1.3.2.2	Análise morfológica da apoptose	86
5.1.3.3	Quantificação de espécies reativas de oxigênio	88
5.2	<b>Estudos <i>in vivo</i></b>	<b>89</b>
5.2.1	Estudos toxicológicos	89
5.2.1.1	Avaliação da toxicidade aguda em embriões/larvas de peixe-zebra	89
5.2.1.2	Avaliação da toxicidade não clínica aguda	90
5.2.1.3	Avaliação da genotoxicidade	91
5.2.2	Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich	92
5.2.2.1	Volume do tumor, massa tumoral, viabilidade e total celular	92
5.2.3	Investigação do mecanismo de ação antitumoral <i>in vivo</i>	94
5.2.3.1	Análise do ciclo celular	94
5.2.3.2	Avaliação do efeito antiangiogênico	95
5.2.3.3	Quantificação das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-4 e TNF- $\alpha$	97
5.2.3.4	Quantificação de espécies reativas de oxigênio	98
5.2.4	Avaliação da toxicidade em animais transplantados com células de carcinoma ascítico de Ehrlich	99
5.2.4.1	Avaliação ponderal e do consumo de água e de ração	99
5.2.4.2	Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos	100
5.2.4.3	Avaliação dos índices dos órgãos	103

<b>5.2.4.4</b>	Análises histológicas	<b>103</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>115</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>132</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>134</b>
	<b>ANEXO</b>	<b>161</b>
	<b>APÊNDICE</b>	<b>168</b>

# Introdução

## 1 INTRODUÇÃO

O termo câncer é designado para definir um grupo de doenças caracterizadas pela proliferação celular descontrolada, pela sua capacidade de disseminação pelo organismo, por meio da invasão de vasos sanguíneos ou linfáticos, e por induzir o processo de angiogênese e metástase (HU et al., 2015; ZAVYALOVA et al., 2019).

Os tumores malignos podem se desenvolver por diferentes fatores (ambientais ou genéticos), em um processo gradual e cumulativo conhecido como carcinogênese (LIU, 2018; PETERS; GONZALEZ, 2018), que envolve alterações genéticas como a ativação de proto-oncogenes, inativação de genes supressores de tumor e/ou de genes reparadores de DNA (EGGERT, 2011).

Essa doença é um grande problema de saúde pública em nível mundial, o que afeta milhões de pessoas anualmente (WHO | Cancer, 2018). No contexto da probleática e a diversidade dessas doenças, diversas abordagens podem ser utilizadas em seu tratamento, incluindo a quimioterapia, a radioterapia, a cirurgia, a terapia alvo, a imunoterapia, entre outras. Em muitos casos, é necessário combinar mais de uma modalidade e, mesmo assim, podem aparecer efeitos secundários graves, que comprometem a saúde e a qualidade de vida dos pacientes, sem, muitas vezes, resultados clínicos satisfatórios (SAFARZADEH; SHOTORBANI; BARADARAN, 2014). Diante disso, a pesquisa e o desenvolvimento de novas alternativas para o tratamento desta enfermidade se fazem necessários, com o objetivo de proporcionar maior resposta do tumor ao tratamento, com menor toxicidade e baixo desenvolvimento de resistência por parte das células tumorais.

Compostos derivados da acridina são amplamente estudados como potenciais agentes no tratamento do câncer (ZHANG et al., 2014). As acridinas são compostos policíclicos de nitrogênio relacionado ao antraceno (LAFAYETTE et al., 2013). Modificações químicas na estrutura da acridina podem produzir compostos com diferentes atividades biológicas, como antimicrobiana, antiviral, antiprotozoária, antitumoral, entre outras (BOSCH et al., 2019; MAZZUCCO et al., 2015; OTHMAN; KOZURKOVA, 2018; SERAFIM et al., 2018).

Compostos espiro-acridínicos são uma promissora classe de derivados da acridina (VILKOVÁ; PROKAIIOVÁ; IMRICH, 2014), obtidos por reações de espiro-

ciclização, produzindo um anel espiro de cinco ou seis membros ligado ao carbono C-9 da acridina (ALMEIDA et al., 2016), que já demonstraram capacidade de se ligar ao DNA, inibir as enzimas topoisomerase e tirosinase, bem como apresentaram atividade antiproliferativa em diferentes linhagens de células tumorais (DE ALMEIDA et al., 2015; GOUVEIA et al., 2018; MENEZES et al., 2018; SALEM et al., 2016).

Vislumbrando o potencial farmacológico de derivados espiro-acridínicos, foi sintetizado o novo composto (*E*)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxi-benzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10*H*-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-17), o qual não possui dados na literatura a respeito da sua química ou atividade farmacológica/toxicológica.

Neste contexto, por meio de métodos *in vitro* e *in vivo*, este trabalho apresenta o estudo da toxicidade e da atividade antitumoral de AMTAC-17, e demonstra seus efeitos no ciclo celular, na angiogênese, no estresse oxidativo e na modulação de mediadores do microambiente tumoral.

Fundamentação teórica

## **2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1 Aspectos gerais do câncer**

O crescimento celular é um processo altamente regulado e fundamental para que o organismo permaneça em homeostase. Esta regulação ocorre por meio da produção e transmissão de sinais de crescimento, os quais podem iniciar cascatas de sinalização, que culminam na ativação de genes necessários para o processo de divisão celular. Por outro lado, determinados estímulos podem ativar genes que induzem a parada do crescimento (MATSON; COOK, 2017; YANG et al., 2017).

Contudo, podem ocorrer problemas com esse processo de regulação da divisão celular, o que leva ao aparecimento das neoplasias, caracterizadas pela proliferação anormal de células, que não estão sob o controle fisiológico do organismo, persistindo com o crescimento desordenado mesmo que cesse o estímulo inicial. As neoplasias comumente são referidas como tumores, que pode se apresentar como uma proliferação de caráter benigno ou maligno (DE OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2014; KUMAR et al., 2015).

O tumor benigno apresenta algumas características principais: células diferenciadas, crescimento lento, com massa tumoral circunscrita, que forma uma cápsula de tecido fibroso que envolve o tumor, e se apresenta de maneira localizada, que não se propaga entre os tecidos vizinhos, isto é, apresenta-se como um tumor não invasivo. Por outro lado, o tumor maligno apresenta comportamento mais agressivo, com células indiferenciadas, crescimento rápido e ilimitado, não ocorre a formação de cápsula fibrosa, ou seja, tem a capacidade de invadir os tecidos adjacentes, que pode desenvolver metástases (DE OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2014; TALMADGE; FIDLER, 2010).

A neoplasia maligna também é conhecida como câncer, que é um termo genérico utilizado para definir um grande grupo de doenças complexas caracterizadas pela rápida multiplicação de células anormais e pela sua capacidade de disseminação pelo organismo, por meio da invasão de vasos sanguíneos ou linfáticos, processo conhecido como metástase (ISRAEL et al., 2016; ZAVYALOVA et al., 2019).

Os tumores malignos apresentam um espectro de tipos e subtipos (HANAHAN, 2014), classificados de acordo com o tecido que lhes deu origem. Carcinomas se originam de células epiteliais, como os adenocarcinomas (quando o epitélio é de origem glandular) (SHIELDS, 2017). Sarcomas são originários de tecidos conjuntivos, sendo classificados como sarcomas ósseos (como osteossarcoma e condrosarcoma), sarcomas de tecidos moles (como lipossarcoma e fibrossarcoma), além de músculo (rabdmiossarcoma) (HATINA et al., 2019; PAPPO; DIRKSEN, 2018). Cânceres do sistema hematopoiético abrangem vários tipos de Linfomas (MUGNAINI; GHOSH, 2016), Leucemias (JULIUSSON; HOUGH, 2016) e Mielomas (CHAVDA; YONG, 2017), derivados de glóbulos brancos, como células B e T e células plasmáticas (SHIELDS, 2017).

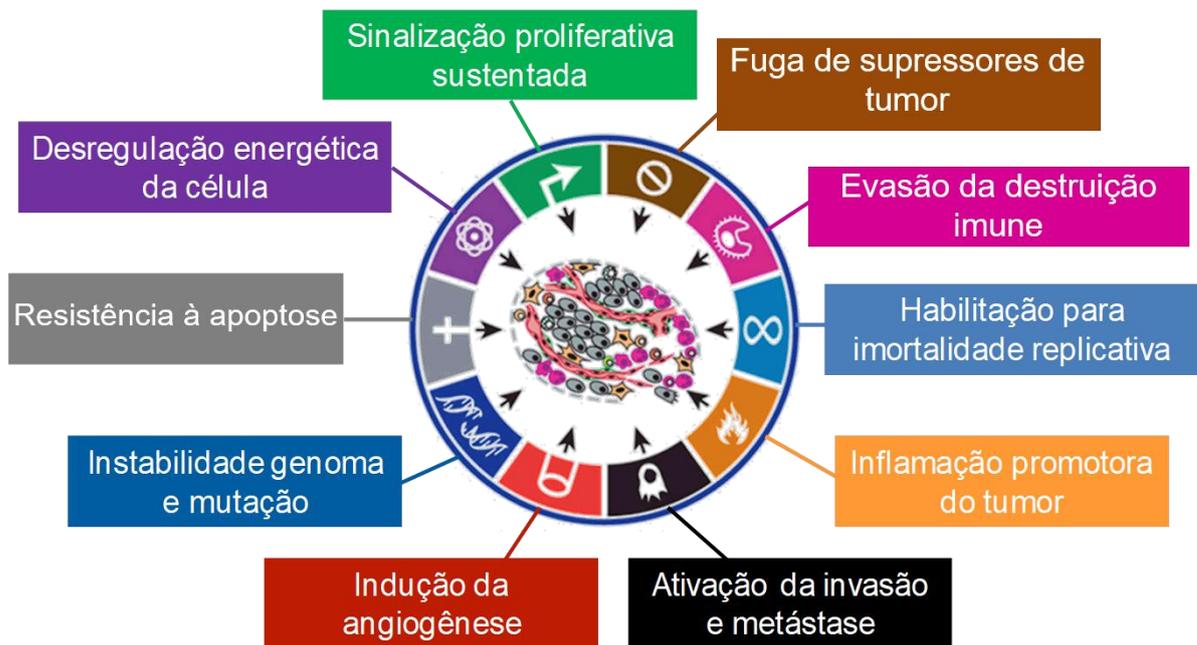
O câncer pode se desenvolver por um processo gradual e cumulativo, o qual pode acontecer em decorrência de alterações simultâneas em genes geralmente relacionados à proliferação, diferenciação e morte celular, bem como em consequência de alterações epigenéticas, como alterações na metilação do DNA. Esse processo que leva a formação do câncer é conhecido como carcinogênese (ERDEM et al., 2014; HANAHAN, 2014; INCA, 2011).

A carcinogênese se inicia a partir de uma ou algumas células cancerosas que proliferam até formar um tumor visível (SAFARZADEH; SHOTORBANI; BARADARAN, 2014). Esse processo pode ser dividido em três diferentes fases, denominadas de iniciação, promoção e progressão. No primeiro estágio, as células sofrem mutações que promovem alterações em seu material genético, em consequência da ação de fatores ou agentes cancerígenos endógenos ou exógenos. Na fase de promoção, as células “iniciadas” desenvolvem capacidade proliferativa maior que as células vizinhas, transformando-se em células malignas, as quais podem evoluir para a terceira e última fase, que é a progressão. Nesta fase, ocorre a multiplicação descontrolada e irreversível das células, que torna o tumor cada vez mais agressivo, o que está associado ao acúmulo diferentes alterações genéticas e epigenéticas (HYNDMAN, 2016; PETERS; GONZALEZ, 2018).

Determinadas características estão presentes nas células cancerígenas que as tornam diferentes das células normais, dentre elas estão: i) sinalização proliferativa sustentada – relacionada a fatores como a sinalização proliferativa autócrina,

estimulação da liberação de fatores de crescimento pelas células do estroma associado ao tumor, hiperresponsividade celular, ativação constitutiva de componentes relacionados a vias de sinalização proliferativas, e interrupção de mecanismos de *feedback* negativo (BAHRAMI et al., 2018; HANAHAN; WEINBERG, 2011; LIN et al., 2017; WANG et al., 2017c; ZHAO et al., 2015); ii) fuga de sinais supressores de tumor – como as proteínas Rb (Retinoblastoma) (JOHNSON et al., 2016) e *p53* (HERRERO et al., 2016), responsáveis por conter a proliferação descontrolada ou, alternativamente, ativar processos de morte celular; iii) inflamação promotora do tumor – as células tumorais e células inflamatórias do estroma fornecem moléculas bioativas ao microambiente do tumor para favorecer sua proliferação, sobrevivência e migração (BONDAR; MEDZHITOV, 2013; HANAHAN; WEINBERG, 2011; SHALAPOUR; KARIN, 2015); iv) evasão da destruição imune – caracterizada pelo escape das células da vigilância imunológica (HANAHAN; WEINBERG, 2011; YARCHOAN et al., 2017); v) indução de angiogênese – desequilíbrio entre fatores pró-angiogênicos e antiangiogênicos produzidos pelas células tumorais e pelas células do estroma para favorecer o surgimento de novos vasos (AL-ABD et al., 2017; HANAHAN; WEINBERG, 2011; YADAV et al., 2015); vi) resistência à morte celular – por conta do aumento da expressão de reguladores antiapoptóticos e de sinais de sobrevivência, diminuição da produção de fatores pró-apoptóticos e inibição de genes supressores de tumor (DAI et al., 2016; HANAHAN; WEINBERG, 2011; MORRIS; CHAN, 2015); vii) ativação de invasão e metástase – processos que induzem a perda da adesão célula-célula, invasão local, transporte das células por vasos e colonização em um novo local (FALTAS, 2012; HANAHAN; WEINBERG, 2011; TALMADGE; FIDLER, 2010); viii) instabilidade do genoma e mutação – defeitos na maquinaria de manutenção do genoma promovem heterogeneidade genética em tumores, que preserva genótipos favoráveis ao seu desenvolvimento (BAKHOUM; LANDAU, 2017; HANAHAN; WEINBERG, 2011; HERRERO et al., 2016); ix) reprogramação do metabolismo energético – metabolismo aberrante e a acelerada absorção da glicose para permitir a constante proliferação celular (BAGHDADI, 2017; BOSE; LE, 2018; HANAHAN; WEINBERG, 2011); x) imortalidade replicativa – a imortalização da célula tumoral por elevar a expressão e ativação da enzima telomerase (CLEAL; NORRIS; BAIRD, 2018; HANAHAN; WEINBERG, 2011; JAFRI et al., 2016) (Figura 1).

**Figura 1.** Características gerais das células cancerígenas



**Fonte:** Adaptado de Hanahan; Weinberg, 2011.

Devido a diversidade de doenças neoplásicas existentes, é compreensível que o câncer seja considerado um processo de origem multifatorial, que pode surgir por conta de fatores ambientais e genéticos, que podem estar inter-relacionados para provocar o aparecimento de uma determinada neoplasia (LIU, 2018). A grande maioria dos casos de câncer está associada a fatores ambientais, constituindo cerca de 80-90% dos casos. Dentre estes, podem ser citados fatores físicos (como radiação ultravioleta – UV), químicos (como componentes do fumo do tabaco) ou biológicos (como infecções causadas por vírus) (HU et al., 2015; RILEY et al., 2012). A exposição progressiva desses fatores pode levar ao aumento da susceptibilidade da célula em sofrer transformação maligna e, dessa forma, gerar o câncer (SANKPAL et al., 2012). Além dos fatores ambientais, estima-se que 10-20% dos cânceres ocorrem por fatores hereditários, ou seja, quando as alterações capazes de induzir o câncer são herdadas geneticamente (CAMPBELL-SALOME; RAUSCHER, 2020; RILEY et al., 2012).

Independente dos fatores iniciadores, seja por fatores ambientais ou hereditários, o processo de carcinogênese envolve alterações genéticas como a

ativação de proto-oncogenes, inativação de genes supressores de tumor e/ou de genes reparadores de DNA (EGGERT, 2011).

Os proto-oncogenes são genes que normalmente codificam proteínas que controlam os processos de divisão, apoptose e diferenciação celular, que, sob determinadas circunstâncias, podem sofrer mutações e se transformar em oncogenes, que codifica de maneira descontrolada proteínas estimuladoras do crescimento, contribuindo para a desregulação do ciclo celular associada ao câncer. Como exemplos de proto-oncogenes estão: RAS (PAPKE; DER, 2017), BRAF (DAVIES et al., 2002), MYC (POOLE; VAN RIGGELEN, 2017), MET (ZHANG; BABIC, 2015), que guiam principalmente processos de progressão do ciclo celular e proliferação, por meio da ativação da via de sinalização da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK).

Adicionalmente, mutações que provocam a inativação ou ausência de genes de supressão tumoral, tais como o Rb (JOHNSON et al., 2016), *p53* (TP53) (HERRERO et al., 2016), TGF- $\beta$  (Fator de Crescimento Tumoral- $\beta$ ) (FABREGAT et al., 2013), e PCA (Polipose Coli Adenomatosa), podem ser críticas no processo de carcinogênese, visto que mutações nesses genes os tornam indisponíveis para que possam parar a proliferação celular quando necessário, que permite, dessa forma, que as células se dividam além do limite normal (WÄSCH; ROBBINS; CROSS, 2010; ZHANG; SHAY, 2017).

O processo de replicação do DNA é essencial para a célula, por isso ela possui uma maquinaria para que se mantenha a fidelidade nesse processo. Quando ocorrem erros durante a replicação do material genético, algumas enzimas são responsáveis por realizar a detecção e o reparo de qualquer dano no DNA, para manter a integridade do mesmo. No entanto, podem ocorrer alterações em genes reparadores de DNA, como por exemplo o BRCA1/2 (WU et al., 2017), ATM (BERNSTEIN et al., 2017), XPA (SUGITANI et al., 2016), que leva a permanência de erros induzidos durante a replicação do DNA ou por exposição a agentes mutagênicos, causando instabilidade genômica, que favorece o aparecimento de mutações e o surgimento do tumor (ROMERO-LAORDEN; CASTRO, 2017).

Do ponto de vista epidemiológico, o câncer aparece como um grande problema de saúde pública em nível mundial, responsável por 9,6 milhões de mortes em 2018.

As estimativas são de que em 2040 surgirão 29,5 milhões de novos casos de câncer e cerca de 16,4 milhões de mortes por ano no mundo (FERLAY et al., 2018; WHO | Cancer, 2018).

O Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) estima para cada ano do triênio 2020-2022 o surgimento de cerca de 625 mil casos novos de câncer no Brasil, sendo o câncer de pele não melanoma o mais comum na população brasileira (177 mil novos casos). Depois deste tipo de câncer, as taxas de incidência para mulheres demonstram que o câncer de mama segue como o mais comum, com estimativa de 66.280 mil novos casos para o ano de 2020, enquanto que para homens, o câncer de próstata engloba a maior porcentagem de casos estimados, representando um total de 65.840 mil novos casos (INCA, 2020).

O número de casos de câncer em todo o mundo pode crescer, especialmente se não forem aplicadas medidas preventivas, bem como é necessário que se busquem terapias mais eficazes para o tratamento dos mais diversos tipos de câncer, visto que a terapia convencional apresenta toxicidade não seletiva e o desenvolvimento de resistência ao tratamento (SAFARZADEH; SHOTORBANI; BARADARAN, 2014).

## **2.2 Ciclo celular e apoptose**

O processo de divisão celular apresenta uma série de eventos altamente coordenados que permitem que o ciclo celular progrida normalmente, sem falhas na divisão do genoma e da célula (WIMAN; ZHIVOTOVSKY, 2017). É dividido em dois grandes momentos, a intérfase (G1, S e G2), em que a célula conta com uma maquinaria de processos para que ocorra o correto crescimento celular e a duplicação do seu material genético, e a fase M (mitose/meiose) onde ocorre a divisão celular, para formar duas células filhas (TAN; DUNCAN; SLAWSON, 2017).

Durante a progressão do ciclo celular, existem pontos de checagem (*checkpoints*) que irão verificar se a célula está apta a iniciar a próxima etapa do ciclo, para impedir que as células filhas sejam formadas com danos em seu material genético. Os *checkpoints* evitam que a célula prossiga pelas diferentes fases do ciclo sem que a fase anterior esteja completa e corretamente concluída, que visa garantir

que as células filhas irão apresentar cópias fiéis do genoma (LIM; KALDIS, 2013; WIMAN; ZHIVOTOVSKY, 2017).

Na fase G1 ocorre o crescimento da célula, inicia-se a transcrição de genes envolvidos no controle do ciclo, bem como a síntese de diversas proteínas que serão necessárias para a duplicação do DNA, que ocorre durante a fase S. Um dos pontos de checagem está presente entre as fases G1 e S, em que a transição só ocorre caso não sejam detectados danos no material genético da célula e se a célula estiver com o tamanho adequado (VISCANTI; DELLA MONICA; GRIECO, 2016).

Após a duplicação do DNA durante a fase S se inicia a fase G2, na qual a célula completa o seu crescimento e se prepara para a divisão. Do mesmo modo, caso ocorram problemas na conclusão da duplicação do DNA, a célula se manterá no ponto de verificação em G2/M para iniciar processos de reparo do DNA ou mesmo de morte celular, caso o dano encontrado não possa ser resolvido. Em situações onde ocorre a permanência do dano ao DNA, podem surgir várias doenças, como é o caso do câncer (MATSON; COOK, 2017; OTTO; SICINSKI, 2017).

Os componentes centrais do sistema de controle do ciclo celular são os membros da família de cinases dependentes de ciclinas (CDKs - *Cyclin-Dependent Kinases*), que se acoplam a proteínas reguladoras correspondentes, chamadas de ciclinas, em sua forma ativa, que têm sua atividade de cinase regulada pela ligação às diferentes ciclinas (LIM; KALDIS, 2013).

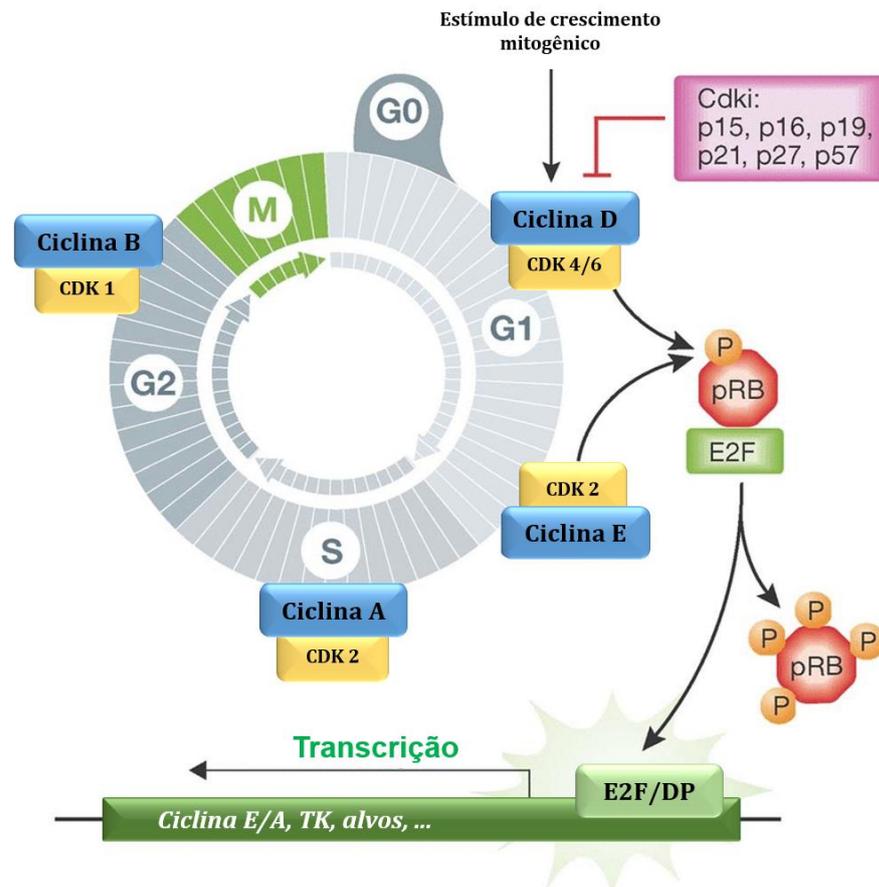
As ciclinas e as CDKs podem ser de diferentes tipos, tendo como principais representantes as ciclinas A, B, D e E, que formam muitos complexos com as CDKs, tais como CDK1, CDK2, CDK4 e CDK6. Os níveis do complexo ciclina-CDK podem variar nas diferentes fases do ciclo, que enviam sinais para diversas moléculas que irão guiar o processo de crescimento e divisão celular (WIMAN; ZHIVOTOVSKY, 2017). As CDKs são cinases de serina/treonina que apresentam uma subunidade de cinase catalítica e uma subunidade reguladora capaz de formar diferentes complexos com as ciclinas, que levam a mudanças cíclicas na fosforilação de diferentes proteínas intracelulares responsáveis por iniciar ou regular eventos primordiais do ciclo celular, isto porque a produção de ciclinas não é constante ao longo do ciclo (MATSON; COOK, 2017; ZHOU et al., 2016).

Pelo fato de os complexos ciclina-CDKs serem essenciais para a progressão do ciclo celular, para que ocorra a conclusão do ciclo é preciso que se tenha a inativação desses complexos, que são degradados no interior da célula, impedindo que se inicie um novo ciclo. Esta degradação ocorre entre a metáfase e a anáfase, realizada pelo complexo promotor da anáfase (APC/C), que catalisa a ubiquitinação e a degradação proteolítica de proteínas específicas (DE BOER; GUERRERO LLOBET; VAN VUGT, 2016; WÄSCH; ROBBINS; CROSS, 2010). Ainda, em condições desfavoráveis para a proliferação celular, pode ocorrer a interrupção do ciclo pela atividade dos inibidores de CDK (CKIs), como p21, p27, p19, entre outros, que inibem a atividade de cinase dos complexos ciclina-CDKs (Figura 2) (OTTO; SICINSKI, 2017).

As proteínas E2F constituem uma conservada família de fatores de transcrição, que estimulam a produção de proteínas necessárias para que o ciclo celular progrida. Este fator é inibido por sua ligação à proteína Rb, que atua impedindo a passagem para a fase S do ciclo. Ocorrendo a fosforilação da pRb, o E2F será liberado para mediar a expressão gênica (Figura 2). Alterações no gene Rb provocam a constante ativação de E2F e conseqüentemente a proliferação celular excessiva (JOHNSON et al., 2016).

Em resposta a danos no genoma, a célula ainda utiliza proteínas específicas, tais como a p53 (CHEN, 2016) e Chk1 e Chk2 (*Checkpoint kinase*), que fazem a checagem do material genético da célula, impedindo a progressão do ciclo celular de células que não apresentam integridade do DNA (VISCANTI; DELLA MONICA; GRIECO, 2016).

**Figura 2.** Regulação do ciclo celular



**Fonte:** Adaptado de Aguilar; Fajas, 2010.

**Legenda:** As vias de transdução de sinal induzidas por estímulo mitogênico ativam o complexo ciclina D-CDK 4/6 no início da fase G1. A ativação desses complexos leva fosforilação da pRb, que libera o fator de transcrição E2F, que permite a expressão de ciclinas do tipo E/A, necessárias para a transição G1/S. Ciclina A-CDK 2 são ativadas durante o ciclo celular para conduzir a transição da fase S para a fase G2, e, por fim, o complexo Ciclina B-CDK 1 guia a transição da fase G2 para a mitose. As atividades e funções dos complexos ciclina/CDK são reguladas pelos CDKis (inibidores de CDK), em condições normais ou extremas, como estresse, danos ao DNA e outros.

A *p53* é responsável por regular diversos processos que controlam a fidelidade do genoma frente a danos ou alterações cromossômicas, ativação de oncogenes e em resposta a muitas outras condições de estresse, ativando genes que levam a parada no ciclo celular e apoptose. Quando danos no material genético são identificados ainda no período G1, os níveis de *p53* se elevam, que media a ativação transcrricional de *p21*, um inibidor de CDK, impedindo a progressão do ciclo (ROMERO-LAORDEN; CASTRO, 2017; WIMAN; ZHIVOTOVSKY, 2017).

As Chk1 identificam danos que ocorrem durante a replicação do DNA na fase S, que bloqueia a progressão do ciclo, bem como atuam como ponto de checagem da passagem G2/M, para prevenir que as células com danos entrem em mitose. Por outro lado, as Chk2 constituem um importante ponto de checagem da fase G1, e são responsáveis por impedir que as células progridam para a fase S caso sejam encontrados erros no material genético, que apresenta papel predominantemente supressor de tumor (OTTO; SICINSKI, 2017; ROMERO-LAORDEN; CASTRO, 2017; VISCONTI; DELLA MONICA; GRIECO, 2016).

Portanto, em células normais, na ausência de estímulos para a proliferação celular, pode ocorrer a permanência da inibição das CDKs necessárias para a progressão do ciclo em G1, que direciona as células a retornar ao estado G0 (MATSON; COOK, 2017). Na maioria dos tecidos, as células se apresentam no estado G0, que pode ser transitório (quiescente) ou permanente (senescência). As células quiescentes podem ser ativadas por meio da estimulação com fatores mitogênicos e entrar novamente no ciclo celular (OTTO; SICINSKI, 2017).

No contexto do câncer, a célula tumoral não finaliza o ciclo celular com um retorno à fase G0, passando da fase M novamente para a fase G1, por conta de sua capacidade de manter a sinalização proliferativa, que exibe potencial replicativo ilimitado, o que representa a essência do crescimento tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Nas células tumorais, devido a defeitos genéticos e epigenéticos, podem ocorrer alterações na expressão das CDKs, frequentemente se tornando superexpressas e/ou hiperativas, que provoca perda de integridade dos pontos de controle do ciclo celular e, finalmente, resulta em uma proliferação celular descontrolada (ZHOU et al., 2016).

Além dos antineoplásicos bem estabelecidos que atuam no ciclo, tais como os antimetabólitos e os produtos naturais antimitóticos, outras classes de fármacos que interferem com o ciclo estão sendo estudadas. Nessa perspectiva, por exercerem papel chave na regulação da divisão celular e por normalmente estarem desreguladas em células tumorais, as CDKs são cada vez mais estudadas como alvos para inibição da proliferação celular. O palbociclibe, ribociclibe e abemaciclibe são o primeiro grupo de compostos inibidores específicos de CDK 4 e CDK 6 que vêm sendo testados na

clínica, que mostram potencial antitumoral contra câncer de mama (OTTO; SICINSKI, 2017; WIMAN; ZHIVOTOVSKY, 2017).

Outro mecanismo que exerce papel fisiológico imprescindível é a apoptose, que consiste em um processo de morte celular programada, sendo necessária não somente para induzir a morte de células anormais, como também é crucial para a homeostase celular, que exerce ação primordial em processos fisiológicos e patológicos (D'ARCY, 2019; GALIMBERTI; ROTHLIN; GHOSH, 2019).

Durante o processo de apoptose, algumas características morfológicas e bioquímicas marcantes podem ser observadas, como a formação de prolongamentos na membrana celular (*blebs* de membrana), com conseqüente formação de corpos apoptóticos, a fragmentação da membrana nuclear, a condensação da cromatina e fragmentação do DNA em um padrão característico, a despolarização do potencial de membrana mitocondrial, bem como ativação de caspases e alterações na distribuição de fosfolípidos de membrana (MAJTNEROVÁ; ROUŠAR, 2018; SARASTE; PULKKI, 2000).

A maquinaria intracelular responsável por coordenar o processo de apoptose é a família de proteases chamadas de caspases, as quais são sintetizadas na célula como precursores inativos, ou procaspases, ativadas por meio de clivagem proteolítica (BIRKINSHAW; CZABOTAR, 2017; PISTRITTO et al., 2016). As caspases podem ser divididas em iniciadoras (caspase-2, -8, -9 e -10), que dão início a cascata proteolítica, que ativam mais procaspases, e executoras (caspase-3, -6 e -7), ativadas pelas caspases iniciadoras e exercem papel fundamental na execução da apoptose, como na ativação das endonucleases responsáveis pela fragmentação do material genético da célula (IORGA; DARA; KAPLOWITZ, 2017; PROKHOROVA et al., 2018).

A caspase-3 é a maior mediadora do processo apoptótico, pois é capaz de inativar proteínas cruciais para a manutenção da integridade do citoesqueleto celular, do reparo do DNA e do controle do ciclo celular (CHOUDHARY; AL-HARBI; ALMASAN, 2014).

No processo de apoptose, o fosfolípido fosfatidilserina, que normalmente é localizado exclusivamente na monocamada interna da membrana celular, passa a ser externalizado, que servem como um marcador que permite o rápido reconhecimento das células em apoptose por macrófagos, que resulta em fagocitose sem que ocorra

extravasamento de componentes celulares pró-inflamatórios, uma vez que não ocorre ruptura de membrana (GALIMBERTI; ROTHLIN; GHOSH, 2019). Um importante marcador utilizado na detecção da fosfatidilserina extracelular é a Anexina V, que se liga especificamente a esse fosfolípídeo na presença de  $Ca^{2+}$  (MAJTNEROVÁ; ROUŠAR, 2018).

Duas vias de sinalização são conhecidas no processo de apoptose, chamadas de via extrínseca – que consiste na ligação de proteínas de sinalização extracelular com receptores de morte da célula que sofrerá apoptose – e via intrínseca – indução de morte por mecanismos intracelulares em resposta a injúrias ou outros estresses (TOMPKINS; THORBURN, 2019; VAKIFAHMETOGLU-NORBERG; OUCHIDA; NORBERG, 2017).

Na via extrínseca, proteínas transmembranares com domínios de ligação externos e internos, são ativadas. A família de receptores de morte inclui o TNF-R1 (receptor do fator de necrose tumoral), o TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionada ao TNF) e o Fas (também conhecido como CD95 e APO1) (ICHIM; TAIT, 2016; TAIT; GREEN, 2010). Quando ativados, os domínios intracelulares dos receptores de morte recrutam proteínas que apresentam domínios de morte, como a proteína com domínio de morte associada ao TNF-1 (TRADD) e proteína com domínio de morte associada a Fas (FADD), responsáveis pelo recrutamento de caspases iniciadoras, que formam o complexo de sinalização indutor de morte (DISC). A partir disso, ocorre a ativação de procaspases executoras, principalmente caspases-3 e -7, culminando na rápida morte celular (MUKHOPADHYAY et al., 2014; PISTRITTO et al., 2016; POBEZINSKAYA; LIU, 2012).

O principal mediador da via intrínseca é a mitocôndria, uma vez que esta libera fatores apoptóticos em resposta a diferentes processos, como danos ao DNA, estresse oxidativo, hipóxia, aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular, entre outros, que estimulam a abertura da membrana mitocondrial externa (BIRKINSHAW; CZABOTAR, 2017; MARCHI et al., 2018; NEGRONI; CUCCHIARA; STRONATI, 2015).

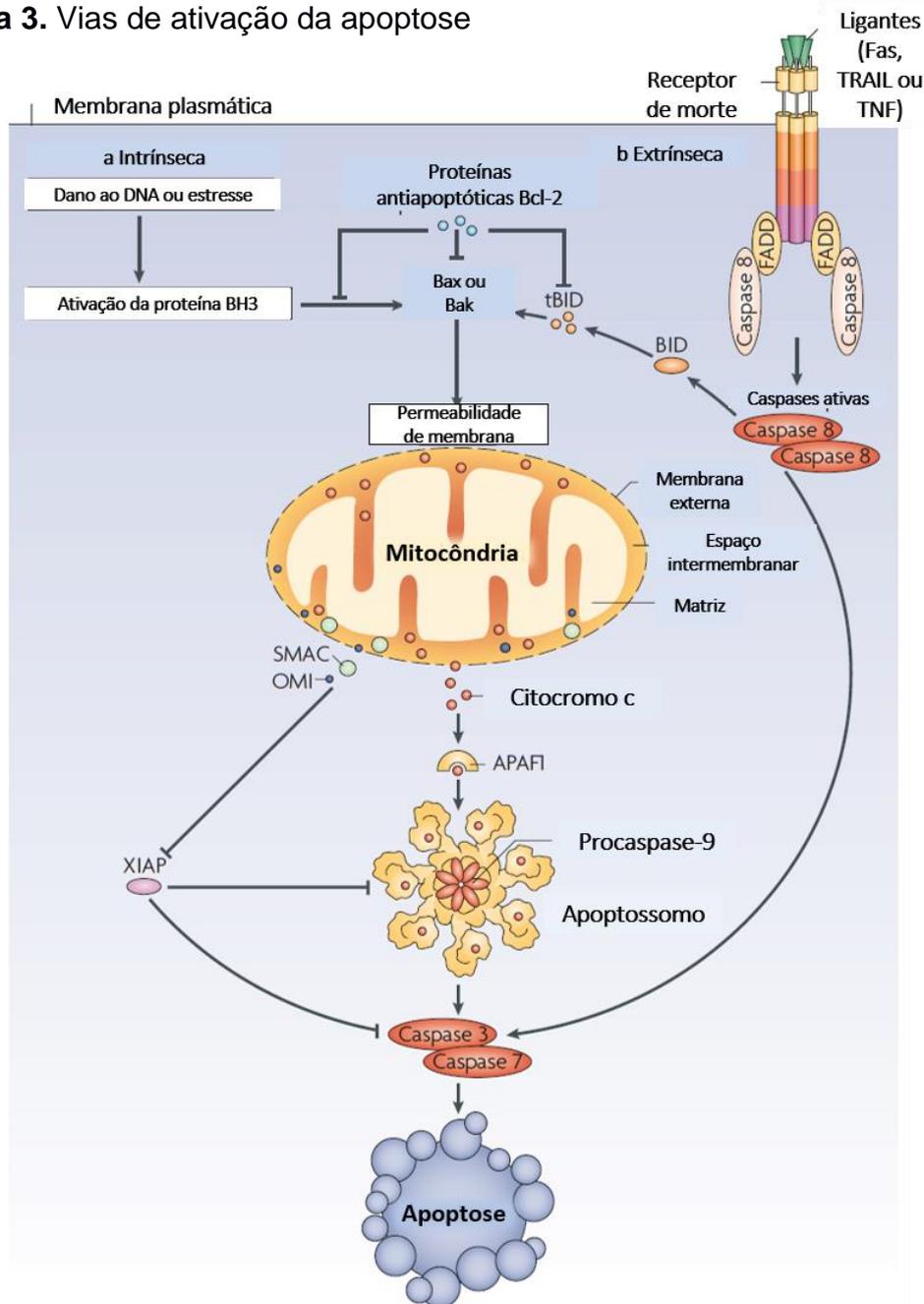
Um dos principais fatores apoptóticos liberados pela mitocôndria, que tem papel crucial na via intrínseca da apoptose, é o citocromo c (BURKE, 2017). Quando presente no citoplasma da célula, essa proteína se liga à proteína adaptadora de ativação da procaspase, o APAF1 (fator de ativação de protease associada à

apoptose 1), que inicia a formação do apoptossomo, um complexo proteico responsável pelo recrutamento e ativação da procaspase-9. Quando ativa, a caspase-9 irá promover a ativação das caspases efetoras (-3 e -7), que desencadeia a morte celular (Figura 3) (HINZ; LAGARES, 2020; JIANG; WANG, 2004; TAN et al., 2018).

Além do citocromo c, as proteínas apoptóticas SMAC/DIABLO e a OMI/ HTRA2 são responsáveis por bloqueiar a atividade de inibidores de proteínas da apoptose ligadas ao cromossomo X (XIAPs) (Figura 3) (ROOS; THOMAS; KAINA, 2016; TAIT; GREEN, 2010). Quando a célula já está em processo de morte, ocorre a liberação das proteínas proapoptóticas como o fator indutor de apoptose (AIF), a endonuclease G, e a DNase ativada por caspase (CAD), que estão relacionadas com processos de fragmentação de DNA e condensação da cromatina (BAJT et al., 2006; MAJTNEROVÁ; ROUŠAR, 2018; PROKHOROVA et al., 2018).

A via intrínseca da apoptose é altamente regulada para garantir que as células entrem em processo de morte celular programada apenas quando for necessário. A principal classe de reguladores da apoptose é a família de proteínas Bcl-2, responsáveis por controlar a permeabilidade da membrana mitocondrial (Figura 3) (BIRKINSHAW; CZABOTAR, 2017). Algumas proteínas Bcl-2 são pró-apoptóticas, como Bax, Bak, Bad, Bid, Bim, Noxa e PUMA, responsáveis por estimular a apoptose pela liberação do citocromo c e outros fatores pró-apoptóticos, enquanto outras são antiapoptóticas, como Bcl-xL, Bcl-2, Mcl-1, A1, Bcl-B, Bcl-w, que bloqueiam a apoptose por inibir essa liberação. O balanço entre a atividade dessas duas classes é crucial para a ocorrência ou não da apoptose (KALKAVAN; GREEN, 2018; NAGATA; TANAKA, 2017; PIHÁN; CARRERAS-SUREDA; HETZ, 2017).

**Figura 3.** Vias de ativação da apoptose



**Fonte:** Adaptado de Tait; Green, 2010.

**Legenda:** **a:** Estímulos apoptóticos intrínsecos ativam vias que levam a permeabilização da membrana externa mitocondrial e a liberação do citocromo c, que se liga ao APAF1, induz a formação do apoptossomo, além de recrutar e ativar a caspase 9. Esta ativa as caspases executoras (caspase -3 e -7), que inicia a apoptose. **b:** A via apoptótica extrínseca é iniciada pela ligação dos receptores da morte com seus ligantes cognatos, que leva ao recrutamento de moléculas adaptadoras (como FADD) e, em seguida, a caspase 8, para resultar em sua dimerização e ativação, que permite a ativação das caspases -3 e -7, para provocar a apoptose.

A indução da apoptose é o tipo mais comum de mecanismo de morte induzido por radioterapias (FABBRIZI et al., 2018) e quimioterapias (WANG et al., 2018b). Dessa maneira, muitos fármacos favorecem esse tipo de morte celular por provocar danos ao DNA, alterações nos microtúbulos, ou atuar em alvos específicos da apoptose, como a inibição de membros antiapoptóticos da família Bcl-2 e a inibição de caspases (CHEN et al., 2008; FAUZEE; DONG; WANG, 2011; GOLDAR et al., 2015; KACZANOWSKI, 2016).

### **2.3 Angiogênese e microambiente tumoral**

Um dos processos imprescindíveis para que ocorra a proliferação e o desenvolvimento das células nos tecidos é o adequado fornecimento de nutrientes e oxigênio para o seu metabolismo, assim como a liberação de resíduos e CO<sub>2</sub>. A angiogênese envolve uma cascata de eventos que descrevem o processo normal e vital no crescimento e desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, primordial para o desenvolvimento de novos órgãos, na cicatrização e no ciclo reprodutivo feminino, bem como em muitas condições patológicas, como processos inflamatórios, infecções e algumas doenças (FLEGG et al., 2020; GACCHE; MESHRAM, 2013).

Diferentemente da angiogênese fisiológica, que é um processo controlado e ordenado, a angiogênese patológica é desordenada, leva a formação de vasos tortuosos, irregulares, mal ramificados e altamente permeáveis, que apresenta-se como característica de muitas doenças, como o câncer (FUS; GÓRNICKA, 2016; MUZ et al., 2015).

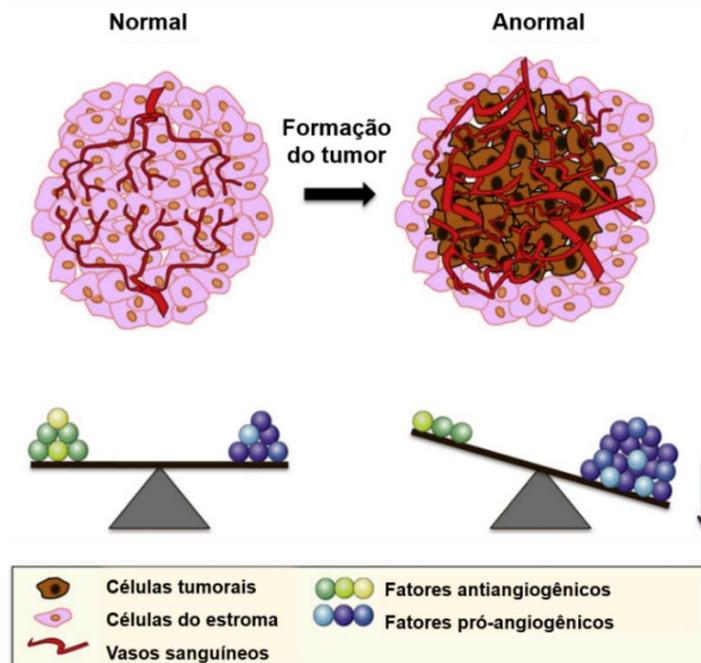
O processo de angiogênese ocorre por meio de um balanço entre a produção de moléculas pró-angiogênicas e antiangiogênicas liberadas pelas células tumorais e por outras células presentes no estroma do tumor (Figura 4). Dentre as moléculas que atuam como pró-angiogênicas estão o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF); o fator de crescimento de fibroblastos (FGF); o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF); o fator de crescimento epidérmico (EGF); o fator de crescimento transformante (TGF); a angiopoietina-2 (Ang-2); as metaloproteinases da matriz (MMPs); além de outros fatores de crescimento derivados de plaquetas, como a

prostaglandina e a heparina. A liberação destes fatores pelas células tumorais para os tecidos circundantes ativa determinados genes que estimulam o crescimento de novos vasos sanguíneos (LUGANO; RAMACHANDRAN; DIMBERG, 2019; MARÇOLA; RODRIGUES, 2015; YADAV et al., 2015).

Os fatores pró-angiogênicos podem ser inibidos por vários antiangiogênicos endógenos, como os interferons (INF  $\alpha/\beta/\gamma$ ), interleucinas (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12), inibidor tecidual das metaloproteinases (Timp), angiostatina e endostatina (STRATIGOS et al., 2016; YADAV et al., 2015).

Dentre os fatores pró-angiogênicos, um dos mais importantes é o VEGF, que é um poderoso indutor da angiogênese, visto que a sua ligação ao receptor tirosina cinase (VEGFR) estimula o crescimento e proliferação das células endoteliais, inibição da apoptose, bem como regula a permeabilidade vascular e a diminuição da expressão de fatores antiangiogênicos, como a angiostatina (MELINCOVICI et al., 2018; YADAV et al., 2015).

**Figura 3.** Angiogênese tumoral



**Fonte:** Adaptado de Giuliano; Pagès, 2013.

**Legenda:** Nos tecidos normais, ocorre um equilíbrio entre a ação dos fatores pró-angiogênicos e antiangiogênicos. Esse equilíbrio é quebrado em condições patológicas, como o câncer, principalmente devido ao aumento dos fatores pró-angiogênicos, como acontece em tumores com vasculatura anormal.

A angiogênese ocorre por uma série de etapas, que se inicia com a liberação de fatores pró-angiogênicos, que promove a degradação da membrana basal e da matriz extracelular dos capilares, pela ação de proteases liberadas pelo endotélio, seguida da migração e proliferação dessas células pela matriz extracelular. Na sequência, se inicia o brotamento capilar e desenvolvimento da lâmina basal em direção ao estímulo angiogênico, que expressa moléculas de adesão celular para a formação de contatos entre as células, para que ocorra a reconstituição da membrana basal e o estabelecimento do fluxo sanguíneo (BERRETTA et al., 2016; TREPS; GAVARD, 2015; VIALARD; LARRIVÉE, 2017).

No processo de formação do câncer, depois que o tumor atinge cerca de 2 a 3 mm ele induz o processo de angiogênese para que a massa tumoral possa continuar a crescer, bem como favorecer o aparecimento de uma via que possibilita o surgimento de metástase (AGUILAR-CAZARES et al., 2019; YADAV et al., 2015). Para que a angiogênese ocorra, as células tumorais e do estroma do tumor (macrófagos, mastócitos, células endoteliais, fibroblastos, pericitos, células do sistema imune, entre outras) irão promover o desequilíbrio dos fatores pró-angiogênicos e antiangiogênicos, com predominância de fatores ativadores da angiogênese, que favorece um estímulo contínuo ao aparecimento de novos vasos (CASTAÑEDA-GILL; VISHWANATHA, 2016; HANAHAN; WEINBERG, 2011; LOIZZI et al., 2017; YADAV et al., 2015).

É notório que a angiogênese é considerada um evento crítico para o desenvolvimento do câncer, a terapia antiangiogênica se apresenta como uma alternativa para inibir o crescimento e a metástase tumoral. Contudo, quando utilizada como monoterapia ela exibe efeito citostático, sendo eficaz em combinação com a quimioterapia citotóxica (RIECHELMANN; GROTHEY, 2017; VIALARD; LARRIVÉE, 2017; YADAV et al., 2015). Esta eficácia se deve ao fato de terapias antiangiogênicas promoverem a “normalização” de vasos tumorais anormais, que reduz a pressão do fluido intersticial e facilita a penetração da droga (STURROCK et al., 2018).

O efeito citostático exibido pela utilização de fármacos antiangiogênicos se deve aos diferentes mecanismos de resistência apresentados pelas células tumorais, como indução de vias alternativas para a angiogênese e pela pressão seletiva da hipóxia (envolve a estimulação de fatores pró-angiogênicos alternativos, indução de

autofagia ou dormência das células tumorais, recrutamento de células derivadas da medula óssea – BMDCs, e a seleção de células tumorais capazes de sobreviver em ambiente hostil – *Cancer Stem-like Cells*) (GIULIANO; PAGÈS, 2013; LUGANO; RAMACHANDRAN; DIMBERG, 2019).

Desse modo, um dos principais desafios é buscar fármacos que atuem não somente na angiogênese, mas em vias que bloqueiam a proliferação celular e diferentes processos favoráveis ao desenvolvimento do tumor. Atualmente, os fármacos sunitinibe e sorafenibe são utilizados na clínica para casos de câncer de células renais metastático e de carcinoma hepatocelular, os quais têm como mecanismo de ação a inibição de diferentes proteínas tirosinocinases, pela ligação competitiva ao sítio de ligação ao ATP, que bloqueiam processos de angiogênese, invasão e metástase, como também vias que levam a proliferação e sobrevivência da célula tumoral (SIMONE et al., 2017; STRATIGOS et al., 2016).

O anticorpo monoclonal bevacizumab também é utilizado na clínica, em associação com quimioterapia citotóxica, para casos de cânceres de pulmão, colorretal e mama (BERRETTA et al., 2016; GHERMAN et al., 2017).

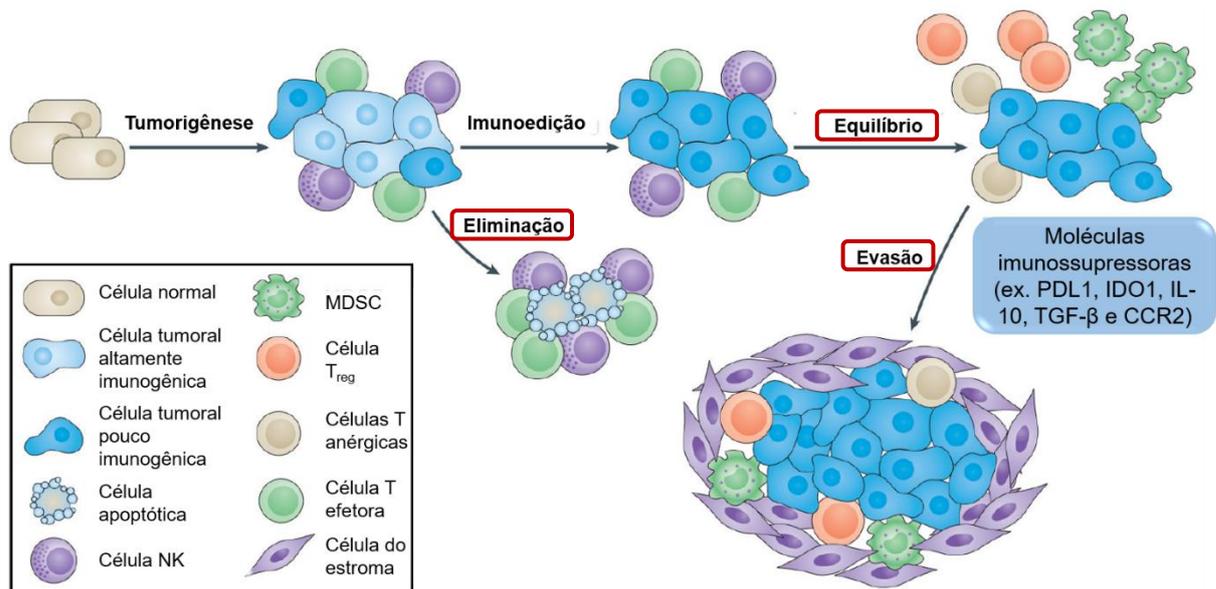
Ainda em relação ao desenvolvimento tumoral, sabe-se que, para que o tumor se estabeleça em um determinado local, ele necessita escapar da defesa imune do organismo, uma vez que o sistema imune é responsável por reconhecer e destruir células transformadas antes que se transformem em tumores (ENDERLING; HLATKY; HAHNFELDT, 2012; RIBEIRO FRANCO et al., 2020).

A resposta imune antitumoral envolve mecanismos de defesa inata e adaptativa, um processo chamado de teoria da imunoedição tumoral (Figura 5) (ABBOTT; USTOYEV, 2019), o qual está dividido em três fases: a primeira é chamada de eliminação, a qual envolve a participação principalmente de células da imunidade inata (como células *Natural Killer* e macrófagos), que irão fazer o reconhecimento de antígenos tumorais, que buscam eliminar as células do tumor muito antes de serem detectadas clinicamente (EFREMOVA et al., 2018; MALMBERG et al., 2017; NICHOLSON; KEATING; BELZ, 2017).

No entanto, se este tumor não for eliminado, ocorrerá a segunda fase, chamada de equilíbrio, que envolve principalmente células da imunidade adaptativa (linfócitos T e B) para combater o tumor (Figura 5). Nesta fase, o aparecimento de células menos

imunogênicas, que dificilmente são reconhecidas pelo sistema imunológico, irão tornar as células tumorais resistentes aos mecanismos antitumorais e induzir o aparecimento de um microambiente imunossupressor (macrófagos M2 e linfócitos Treg), que permite a fuga do controle imunológico e início da terceira fase, a evasão, em que o sistema imune deixa de combater o tumor e passa a favorecer o seu crescimento, em que ocorre o estabelecimento do câncer (Figura 5) (BHATIA; KUMAR, 2016; O' REILLY et al., 2016; OSTROUMOV; FEKETE; MICHAEL, 2017; PASSARELLI et al., 2017; SISTIGU et al., 2017).

**Figura 4.** Imunoedição tumoral



**Fonte:** Adaptado de Yarchoan et al., 2017.

**Legenda:** Durante a tumorigênese, as células adquirem alterações genéticas que resultam na apresentação de neoantígenos, que são reconhecidos especialmente pelas células da imunidade inata. As células tumorais que sobrevivem à fase inicial de eliminação entram em uma fase de equilíbrio, na qual células menos imunogênicas e mais resistentes aos mecanismos antitumorais sobrevivem e estabelecem um microambiente imunossupressor. Nesse ponto, as células tumorais começam a "escapar" do sistema imunológico, para formar um tumor clinicamente evidente.

As células tumorais podem favorecer o recrutamento de diferentes células a partir da secreção de citocinas, quimiocinas, prostaglandinas e outros mediadores para recrutar células do sistema imunológico, que buscam contribuir para o desenvolvimento tumoral por modificar o microambiente em que se encontram

(WEINSTEIN; STORKUS, 2015). Desse modo, ocorre a presença de diversas células efetoras do sistema imune, como células da imunidade inata, como macrófagos, células dendríticas (DC), *Natural Killer* (NK), mastócitos, e células da imunidade adaptativa, como células T CD8<sup>+</sup>, células T CD4<sup>+</sup>, células T reguladoras (Treg), células B, entre outros tipos, que irão favorecer além da proliferação, a tolerância imune ao tumor (FRIDMAN et al., 2017; LIU et al., 2016; SOLÍS-MARTÍNEZ et al., 2015).

Diversos elementos constituem o estroma de um microambiente tumoral, como fibroblastos, miofibroblastos, células neuroendócrinas, células adiposas, células imunes e inflamatórias, redes vasculares (sanguíneas e linfáticas), e a matriz extracelular (CHEN et al., 2015a). As células do estroma tumoral e componentes não celulares como citocinas, proteínas da matriz extracelular e outros mediadores também contribuem em diversas maneiras para o desenvolvimento do tumor, pois são capazes de modular o microambiente em que o tumor se encontra, que beneficia o seu desenvolvimento (CRUSZ; BALKWILL, 2015; SISTIGU et al., 2017; WEINSTEIN; STORKUS, 2015). Por conta disso, diversas células e mediadores inflamatórios tem o seu papel estudado, para buscar o melhor entendimento da biologia do tumor, bem como a identificação de alvos para terapia antineoplásica.

Dentre as células que têm importante papel na inflamação associada ao câncer estão os macrófagos associados ao tumor (TAM). Os macrófagos podem ser polarizados para dois tipos principais, macrófagos de perfil M1 e de perfil M2 (SAWA-WEJKSZA; KANDEFER-SZERSZEŃ, 2018). Os macrófagos M1 são produzidos em respostas do tipo Th1, ou seja, produzem citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IL-23, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Por outro lado, os macrófagos M2 participam de respostas do tipo Th2, que produzem IL-4, IL-10, IL-6, IL-13, prostaglandinas, além do VEGF, apresentando-se como um perfil que leva a progressão tumoral e angiogênese (MURRAY et al., 2014; PETTY; YANG, 2017; SOLÍS-MARTÍNEZ et al., 2015).

As citocinas são peptídeos que podem ser produzidos por diferentes células, sendo secretadas de maneira controlada em resposta a estímulos específicos, capazes de modificar a resposta biológica (HOLDSWORTH; GAN, 2015). No microambiente tumoral, as citocinas podem atuar como fatores de crescimento ou modulando o sistema imune para impedir a destruição das células tumorais. Com respeito a sua origem, as citocinas podem ser classificadas em pró e anti-

inflamatórias, de acordo com o tipo celular que as produz. Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> produzem três subtipos distintos de células, as do tipo Th1, Th2 e Th17, as quais apresentam um perfil de citocinas característico (FRIDMAN et al., 2017; YAO et al., 2016).

No perfil Th1 são produzidas principalmente citocinas pró-inflamatórias, como as IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-12, além do TNF- $\alpha$  e INF $\gamma$  (interferon  $\gamma$ ), responsáveis por desencadear a ativação de células, como macrófagos, que irão promover a destruição por meio de fagocitose e ativação do sistema complemento, sendo este perfil responsável, muitas vezes, por destruir as células tumorais (LISSONI, 2016; XU, 2014).

Entre as citocinas de perfil Th1, a IL-12 é produzida por fagócitos ativados e células dendríticas, sendo primordial para a transição da imunidade inata para a adaptativa, que impulsiona a diferenciação de células T auxiliares em células Th1, além de aumentar a atividade citotóxica de células *NK* e células T CD8<sup>+</sup>, para proporcionar importantes respostas antitumorais (SAITO et al., 2015; STRAUSS et al., 2019). Esta citocina é conhecida por sua função na inibição da angiogênese tumoral (LU, 2017; ZHOU et al., 2019). Na resposta imune antitumoral, a IL-12 é responsável por estimular linfócitos a produzir IFN- $\gamma$ , sendo este um grande mediador dos efeitos produzidos pela IL-12, que inclui seus efeitos antiangiogênicos, o qual pode atuar diretamente nos vasos tumorais ou indiretamente por meio da supressão da expressão do VEGFR (SORENSEN et al., 2010; ZUNDLER; NEURATH, 2015). A IL-12 também pode inibir a angiogênese tumoral por meio da diminuição da liberação de VEGF e metaloproteínase 9, importante para a ação antitumoral (LU, 2017; TUGUES et al., 2015).

Incluída na família de citocinas IL-1, a citocina IL-1 $\beta$  é secretada principalmente por macrófagos e células dendríticas em sua forma imatura, a qual é ativada pela caspase-1, para gerar a sua forma biologicamente ativa (MAN et al., 2017). Esta citocina pode desempenhar papel dual na progressão do câncer, visto que é relatado a sua ação pró-tumoral, por ativar células endoteliais a produzir fatores pró-angiogênicos (como o VEGF), que favorece o crescimento, angiogênese e metástase (BAKER; HOUSTON; BRINT, 2019). Por outro lado, podem ser ativadas pela caspase-1 em resposta ao reconhecimento de PAMPs (Padrões moleculares

associados a patógenos) ou DAMPs (Danos moleculares associados a patógenos), para iniciar respostas inflamatórias antitumorais, como a ativação de macrófagos de perfil M1 (MATAMOROS et al., 2019), ou ainda induzir a apoptose das células tumorais pela via intrínseca, por sua capacidade de induzir dano as mitocôndrias, com consequente liberação de citocromo c (CHAUHAN et al., 2018; SHEN et al., 2017).

TNF- $\alpha$  é um membro da superfamília TNF, produzida por macrófagos, neutrófilos, células *NK*, linfócitos T CD4<sup>+</sup>, entre outras (SAITO et al., 2015), e apresenta diferentes funções no câncer, com capacidade de estimular a sobrevivência, proliferação, angiogênese e metástase (WATERS; POBER; BRADLEY, 2013). Todavia, esta citocina também desempenha importante papel na indução de apoptose de células tumorais, pois se liga ao TNFR, que inicia cascatas de sinalização intracelulares que culminam na ativação de vias apoptóticas (AMBER et al., 2015; ZHENG et al., 2017). O TNF- $\alpha$  também é capaz de ativar macrófagos de perfil M1 e células *NK*, e atrair neutrófilos e monócitos para o local da resposta imune antitumoral, além de induzir o colapso da microvasculatura tumoral (JOSEPHS et al., 2018). Adicionalmente, foi relatado o papel do TNF- $\alpha$  em promover a senescência da célula tumoral, por aumentar a expressão das proteínas p16 e p19 (inibidoras do ciclo celular), com consequente parada do ciclo na fase G1/G0, para impedir a progressão tumoral (BRAUMÜLLER et al., 2013).

As citocinas de perfil Th2 são principalmente anti-inflamatórias, como IL-3, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, responsáveis por ativar células B para produzirem anticorpos contra determinados antígenos extracelulares, como também inibir a ativação de uma resposta Th1, que se torna uma resposta normalmente favorável ao desenvolvimento do tumor (COUSSENS; ZITVOGEL; PALUCKA, 2013; KUMAR; VOHRA; MAHINDROO, 2017).

Dentre as citocinas de perfil Th2, a IL-4 é uma das mais importantes, que pode ser produzida por macrófagos, células dendríticas, mastócitos, células *NK*, basófilos e eosinófilos, sendo essencial para a polarização de linfócitos T auxiliares para um perfil Th2 (SAITO et al., 2015; SUZUKI et al., 2015). Por conta disso, o aumento nos níveis desta citocina é comumente encontrado em muitos tipos de câncer, que atua como uma citocina promotora do tumor por inibir a apoptose de células tumorais (CHEN et al., 2019; LI et al., 2008). Nessa perspectiva, o bloqueio de IL-4 pode

melhorar a eficácia de terapias contra o câncer (ITO et al., 2017; SHIROTA et al., 2017). Todavia, estudos recentes mostram que esta citocina pode apresentar ação incerta na imunidade tumoral, pois pode apresentar respostas imunes antitumorais, juntamente com IL-1 $\beta$ , IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (GREEN et al., 2019; XUE et al., 2019).

O perfil Th17 tem como marca a produção da IL-17, a qual apresenta um papel complexo na biologia do tumor, pois pode apresentar papel pró-tumoral (que influencia nos processos de tumorigênese, angiogênese e metástase), bem como pode atuar na imunidade antitumoral, contudo, o papel do Th17 no câncer ainda precisa ser melhor investigado (SONG; YANG, 2017).

As quimiocinas são uma grande família de pequenas citocinas que controlam a migração e a permanência das células imunes. Desse modo, quimiocinas como CCL2, CCL5, CXCL1 e CXCL12 constituem fatores que promovem o recrutamento de diferentes células imunes, a fim de contribuir com a progressão do tumor (RIBEIRO FRANCO et al., 2020; YAO et al., 2016).

Nesse contexto, diferentes terapias são produzidas na busca da manipulação do sistema imunológico para promover uma resposta antitumoral eficaz (KOTTSCHADE, 2019). Entre essas está a utilização de inibidores da checagem imunológica, visto que a interação de determinados receptores da célula tumoral com a célula T inibem a sua ação citotóxica e favorece o desenvolvimento do tumor. Como exemplos estão os mAbs inibidores de PD-1 (Pembrolizumab e Nivolumab), os mAbs inibidores de PD-L1 (Atezolizumab, Avelumab e Durvalumab) e os mAbs inibidores de CTLA-4 (Tremelimumab, Ipilimumab), que impedem a interação destes receptores com aqueles presentes na célula T, para permitir sua ação citotóxica (CHOI et al., 2018; KATZ; ALSHAREDI, 2018; TOLBA; OMAR, 2018).

## **2.4 Estresse oxidativo e o câncer**

O estresse oxidativo é como se denomina a condição de excesso de radicais livres dentro da célula. Radicais livres são espécies químicas altamente reativas, como as espécies reativas de oxigênio (EROs), espécies reativas de nitrogênio (ERNs), óxido nítrico (NO), entre outras (SHARMA; GUPTA; SHARMA, 2018). Normalmente, o estresse oxidativo está relacionado a processos patológicos, como

processos inflamatórios, doenças cardiovasculares, neurodegeneração e câncer (FORRESTER et al., 2018; KUMARI et al., 2018; POPRAC et al., 2017), pois as EROs, que incluem o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxila ( $\cdot OH$ ), atuam como segundos mensageiros na sinalização de diversos processos celulares, que causam, por exemplo, danos a biomoléculas (DNA, lipídeos e proteínas) e peroxidação lipídica (KUMARI et al., 2018; PRASAD; SRIVASTAVA, 2020). Nas células, as mitocôndrias contribuem com o máximo de geração de EROs, pois produzem o ânion superóxido por reagirem com o oxigênio no processo de produção do ATP (PISOSCHI; POP, 2015).

No contexto do câncer, as EROs apresentam papel dual, pois a elevação das EROs a um nível tóxico é responsável por ativar vias de sinalização que causa a mortalidade das células tumorais, uma vez que provoca muitos danos ao material genético e induz a apoptose. Diferentes tratamentos quimioterápicos apresentam em seu efeito citotóxico o aumento de EROs, como é o caso da doxorrubicina e da cisplatina (DAVALLI et al., 2018; WANG et al., 2017b; YANG et al., 2018).

Todavia, as células tumorais aumentam a produção de EROs em comparação com as células normais, uma vez que as células tumorais têm um nível de metabolismo mais alto que as células normais para manter o aumento da proliferação (YANG et al., 2018). Os elevados níveis de EROs causam instabilidade genética, bem como atuam como moléculas sinalizadoras envolvidas nos processos de angiogênese, metástase, resistência a apoptose, que contribuem para o processo de carcinogênese (KUMARI et al., 2018; MOLONEY; COTTER, 2018).

Estudos mostram que EROs podem estar envolvidas em todas as etapas da carcinogênese. Por serem uma moléculas altamente mutagênicas, podem estimular o processo de iniciação do câncer (VAN HOUTEN; SANTA-GONZALEZ; CAMARGO, 2018). Após a expansão das células iniciadas, que caracteriza a fase de promoção, as EROs são responsáveis por regular diferentes vias de sinalização, como a ativação das vias MAPK, PI3K/Akt (CHIO; TUVESON, 2017), regular negativamente a proteína supressora de tumor PTEN (MOLONEY; COTTER, 2018) e a ativação do NF- $\kappa$ B (GALADARI et al., 2017), entre outras, que promovem a proliferação celular e sobrevivência das células tumorais. Ainda, EROs também contribuem para a fase de progressão tumoral, que desempenha papel imprescindível na indução de metástase

por promover a angiogênese, inibir proteínas de adesão celular e ativar as MMPs, que potencializa a progressão do tumor (BABU; TAY, 2019; SAHA et al., 2017).

Para proteger dos danos provocados pelos radicais livres, a célula dispõe de sistemas antioxidantes que podem ser enzimáticos e não enzimáticos, que buscam reduzir o estresse oxidativo, danos ao DNA, e outros danos celulares (DAVALLI et al., 2018). Os antioxidantes enzimáticos apresentam capacidade de decompor os radicais livres em moléculas estáveis e menos prejudiciais, como as enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx). As vitaminas (como A, C e E), minerais (como selênio e zinco) e metabólitos como o ácido úrico, a bilirrubina e a melatonina são importantes exemplos de antioxidantes não enzimáticos (HE et al., 2017; KUMARI et al., 2018; PISOSCHI; POP, 2015).

Portanto, o uso de terapias antioxidantes é ser uma alternativa interessante, pois a diminuição de EROs para os níveis normais irão diminuir a sinalização relacionada aos processos de sobrevivência do tumor, que reduz a tumorigênese e progressão tumoral mediada por EROs (GALADARI et al., 2017; MU; LIU, 2017).

## **2.5 Farmacoterapia do câncer**

No que se refere ao tratamento do câncer, variadas abordagens podem ser utilizadas e, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a escolha do tratamento deve ser feita de maneira cuidadosa, de acordo com o tipo de tumor e o estado em que se encontra, que abrange três principais modalidades terapêuticas, que são a cirurgia, a terapia sistêmica (quimioterapia) e a radioterapia, embora nem sempre apresentem resultados clínicos satisfatórios. Outras terapias também vêm sendo utilizadas, como o transplante de medula óssea, terapia alvo, imunoterapia, hormonioterapia, entre outras (MILLER et al., 2016). Em alguns casos é utilizado apenas um destes tratamentos, mas na maioria há a necessidade de uma combinação de mais de uma destas terapias para apresentar resultados satisfatórios, ainda com a possibilidade de não serem eficazes (MOKHTARI et al., 2017).

A cirurgia é utilizada para promover a remoção do câncer que está contido em uma determinada área. Este procedimento pode ser utilizado como um tratamento único, porém, muitas vezes é realizada a combinação com outro tipo de tratamento. A

radioterapia é um tratamento em que se utilizam altas doses de radiação a fim de destruir ou evitar o desenvolvimento do tumor, que também funciona melhor em tumores localizados (DEA et al., 2017; GILLETTE; GILLETTE, 1995).

A quimioterapia é um método que utiliza fármacos a fim de combater as células cancerosas. Existe uma variedade de compostos que são utilizados na quimioterapia que exibem diferentes mecanismos de ação e, assim, são agrupados em diferentes classes, basicamente, os agentes alquilantes, os antimetabólitos e os produtos naturais (HARTNER, 2018).

Os agentes alquilantes são divididos em várias subclasses que, de maneira geral, podem atuar em diferentes fases do ciclo celular, que impedem a proliferação das células por promover a alquilação do DNA, isto é, adicionam grupos alquila em bases nitrogenadas. Esse processo pode provocar quebras no material genético ou levar ao mau emparelhamento das bases nitrogenadas e causar mutações, que gera danos no DNA que poderão ativar mecanismos de morte celular. Vários fármacos estão incluídos nessa classe, como a ciclofosfamida, o bussulfano, a cisplatina e a dacarbazina (DE ALMEIDA et al., 2005; PUYO; MONTAUDON; POURQUIER, 2014).

Os antimetabólitos atuam por meio da inibição da biossíntese dos componentes do DNA e do RNA ou inibem a sua função, que atuam especificamente na fase S do ciclo celular. Eles podem se incorporar no material genético da célula ou inibir o alongamento e função do mesmo, que culmina na ativação de morte celular. Como exemplos estão o metotrexato (MXT), o 5-fluorouracila (5-FU) e a 6-mercaptopurina (6-MP) (DE ALMEIDA et al., 2005; TIWARI, 2012).

Em relação aos produtos naturais utilizados na quimioterapia do câncer, pode-se citar diversos fármacos com diferentes mecanismos de ação, dentre estes: os alcaloides da vinca (vimblastina, vincristina), que atuam como antimitóticos por inibir a polimerização dos microtúbulos (MOUDI et al., 2013); os taxanos (paclitaxel, docetaxel), que inibem a despolimerização dos microtúbulos, também podem atuar como antimitóticos (JOERGER, 2016); as podofilotoxinas (etoposida, teniposida), que atuam por inibir as topoisomerasas, que culmina na formação de superenovelamentos no DNA, para impedir que ocorra processos de transcrição e replicação (DE ALMEIDA et al., 2005; YU; CHE; XU, 2017); os análogos da camptotecina (irinotecana e topotecana), apresentam como alvo a enzima nuclear topoisomerase I, que param o

ciclo na fase S (CHAZIN et al., 2014); e os antibióticos citotóxicos (doxorrubicina, idarrubicina), capazes de se intercalar no DNA e impedir sua síntese (BHATTACHARYA; MUKHERJEE, 2015).

Apesar da grande diversidade de terapias e fármacos utilizados para tratar os diferentes tipos de câncer, o sucesso dos tratamentos com medicamentos convencionais tem se mostrado discreto pela toxicidade não seletiva exercida por agentes antineoplásicos clássicos, bem como o desenvolvimento de resistência ao tratamento, que é um fenômeno bastante observado na terapêutica e constitui um dos principais problemas encontrados para o tratamento do câncer (MOKHTARI et al., 2017; SZAKÁCS et al., 2014).

A eficiência do tratamento do câncer irá depender da fase em que se inicia o tratamento e de um balanço entre a atividade antineoplásica e a toxicidade com as células saudáveis do organismo. Pelo fato de que as células cancerosas se originarem das células saudáveis e, portanto, apresentarem certa semelhança com as mesmas, o grande desafio do tratamento com antineoplásicos é a distinção entre as células tumorais e saudáveis (BRANDÃO et al., 2010).

Uma característica presente nas células tumorais é a sua taxa de crescimento elevada, que normalmente se apresenta como alvo dos quimioterápicos, porém, algumas células normais do organismo também se dividem rapidamente e são afetadas, o que é responsável pelos principais efeitos colaterais da quimioterapia, como náuseas e vômitos, perda de cabelo e mielossupressão, associados a renovação constante das células do trato gastrointestinal, dos folículos pilosos e da medula óssea, respectivamente (ASLAM et al., 2014; IWAMOTO, 2013).

Com o crescente avanço da utilização de técnicas de biologia molecular e o melhor entendimento da biologia do câncer, algumas estratégias vêm sendo utilizadas para minimizar a toxicidade exercida pelos antineoplásicos em células normais, bem como aumentar a especificidade para as células tumorais. Dentre estas estratégias está a utilização de uma variedade de agentes dirigidos para alvos específicos, os quais normalmente estão alterados em algum tipo de tumor maligno, o que é conhecido como terapia alvo (BENEVENTO et al., 2017; MAJIDI et al., 2009).

As terapias dirigidas para alvos específicos tem como instrumentos os anticorpos monoclonais (mAb) e os inibidores de tirosina cinase, que podem ser

dirigidos a alvos moleculares específicos, que bloqueiam diferentes vias de sinalização (LEITE; CALLADO; RIBEIRO, 2012). Contudo, a utilização de mAb constitui a maioria das terapias alvo empregadas na clínica (HORTA; GOLDBERG; SONDEL, 2016; BELLATI et al., 2011).

Dentre estas terapias, pode-se citar o bevacizumab, um mAb humanizado que se liga ao Fator de Crescimento de Endotélio Vascular tipo A (VEGF-A), que bloqueiam a ligação e ativação de seus receptores na superfície das células (VEGFRs), para impedir a ativação das cascatas de transdução do sinal e inibir processos como a angiogênese, visto que o VEGF constitui o principal fator pró-angiogênico secretado pelo tumor (GIULIANO; PAGÈS, 2013; YADAV et al., 2015). Outro exemplo é o cetuximabe, um mAb quimérico, que se liga especificamente ao Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR), que impede a ativação e dimerização do receptor, para causar o seu bloqueio e induzir processos de citotoxicidade celular dependente de anticorpos (HOLUBEC et al., 2016), dentre muitos outros fármacos que constituem anticorpos monoclonais direcionados a alvos moleculares específicos.

Algumas pequenas moléculas sintéticas, como o gefitinibe e o erlotinibe, conseguem entrar na célula e inibir especificamente os receptores de tirosina cinase principalmente por bloquear competitivamente o sítio de ligação ao ATP do receptor, para impedir sua ativação e, conseqüentemente, inibir determinadas vias enzimáticas que podem estar alteradas nas células tumorais (BENEVENTO et al., 2017; NAN et al., 2017).

A hormonioterapia é um tratamento que busca bloquear, por meio de terapia anti-hormonal/endócrina, a ação de hormônios, para evitar que eles estimulem a proliferação de células tumorais. Muitos cânceres são caracterizados pela superexpressão de receptores hormonais, como receptores de estrogênio e progesterona (HAQUE; DESAI, 2019; SHIELDS, 2017). Um dos fármacos utilizados na hormonioterapia é o tamoxifeno, uma droga que atua como antagonista competitivo do estrogênio, que bloqueia a ligação ao seu receptor, para impedir a ativação da via de sinalização e, conseqüentemente, a progressão do câncer (PLUMMER et al., 2019).

Por fim, a imunoterapia do câncer busca induzir o sistema imune a identificar e eliminar células tumorais, ou manipular componentes do sistema imune para gerar respostas imunes antitumorais (KOTTSCHADE, 2019). Diferentes estratégias imunoterapêuticas vêm sendo estudadas, como as que têm como alvo os inibidores de pontos de checagem do sistema imune, a programação de células T para executar ação citotóxica contra as células tumorais, e até a produção de vacinas oncológicas e a utilização da Interleucina-2 para modificar as respostas biológicas, a fim de ativar mecanismos citotóxicos contra o tumor (ABBOTT; USTOYEV, 2019; XU et al., 2019).

Diante do exposto, observa-se que existem diferentes terapias utilizadas para o tratamento do câncer. Todavia, estas ainda exibem diversos problemas associados aos casos de resistência das células tumorais aos fármacos, bem como a alta toxicidade e, muitas vezes, baixa seletividade (ASLAM et al., 2014; SZAKÁCS et al., 2014). Desse modo, a pesquisa e o desenvolvimento de novas alternativas para o tratamento desta enfermidade se fazem necessárias, com o objetivo de proporcionar maior resposta ao tratamento, com menor toxicidade para os indivíduos expostos, e com baixo desenvolvimento de resistência por parte das células tumorais.

## **2.6 Acridina e seus derivados**

As acridinas e seus derivados são amplamente estudados como potenciais agentes terapêuticos para o tratamento de inúmeras doenças, como infecções bacterianas (BOSCH et al., 2019), virais (MAZZUCCO et al., 2015), parasitárias (SERAFIM et al., 2018), doença de Alzheimer (CHUFAROVA et al., 2018; PI et al., 2012) e diferentes tipos de câncer (FERGUSON; DENNY, 1991; OTHMAN; KOZURKOVA, 2018; ZHANG et al., 2014).

Acridinas são compostos heterocíclicos com estrutura planar, formadas por dois anéis de benzeno fundidos a um anel de piridina no centro (BELMONT et al., 2007; LAFAYETTE et al., 2013), que apresentam núcleo altamente versátil, que permite modificações químicas que favorecem a criação de derivados com diferentes atividades biológicas (GOUVEIA et al., 2018; KUMAR; KAUR; KUMARI, 2012).

A atividade biológica das acridinas é atribuída especialmente à capacidade dessas estruturas de se intercalarem ao DNA, que interfere na maquinaria celular. Os

principais alvos biológicos são o DNA e as enzimas topoisomerases e telomerase (ZHANG et al., 2014).

As enzimas topoisomerases são essenciais para que ocorra os processos de replicação do DNA, transcrição e recombinação, pois catalizam quebras transitórias no DNA para controlar o seu superenrolamento. Estas enzimas podem ser divididas em topoisomerases do tipo I (catalizam a quebra de uma fita do DNA) e do tipo II (catalizam a quebra da dupla fita do DNA) (YOU; GAO, 2019). A telomerase é uma enzima responsável por sintetizar o DNA telomérico, nas extremidades dos cromossomos, para combater o encurtamento dos telômeros e a consequente perda de DNA (SMITH; PENDLEBURY; NANDAKUMAR, 2020). No contexto do câncer, estas enzimas são alvos farmacológicos de diferentes drogas para induzir a morte celular, como a doxorrubicina e os análogos da camptotecina que tem como alvo a topoisomerase (BLASIAK, 2017; YOU; GAO, 2019), e o imetelstat, que é capaz de inibir a telomerase (WANG et al., 2018a).

O derivado da acridina amsacrina (m-AMSA) foi a primeira droga totalmente sintética, capaz de intercalar o DNA, a mostrar eficiência clínica para o tratamento da leucemia, que tem como principal alvo a topoisomerase do tipo II, que, quando inativa, é capaz de causar múltiplas lesões ao DNA, o que leva a apoptose (DENNY, 2004; HEVENER et al., 2018). Contudo, a amsacrina apresenta alta toxicidade, uma vez que seu metabolismo pode estar associado a produção de radicais livres, que causam danos também nas células normais, o que limita o seu uso (BELMONT et al., 2007; KETRON et al., 2012).

Dado a grande riqueza química e de atividades biológicas demonstrada pelos derivados acridínicos, estudos que buscam produzir novos derivados com potente atividade antitumoral estão em andamento (OTHMAN; KOZURKOVA, 2018).

Nesse contexto, compostos espiro-acridínicos foram produzidos como uma nova e promissora classe de derivados da acridina (VILKOVÁ; PROKAIOVÁ; IMRICH, 2014), obtidos por reações de espiro-ciclização, que apresentam um anel espiro de cinco ou seis membros ligado ao carbono C-9 da acridina (ALMEIDA et al., 2016), que já demonstrou capacidade de ligação ao DNA, inibição da topoisomerase II $\alpha$  e da enzima tirosinase, bem como atividade antiproliferativa em diferentes linhagens

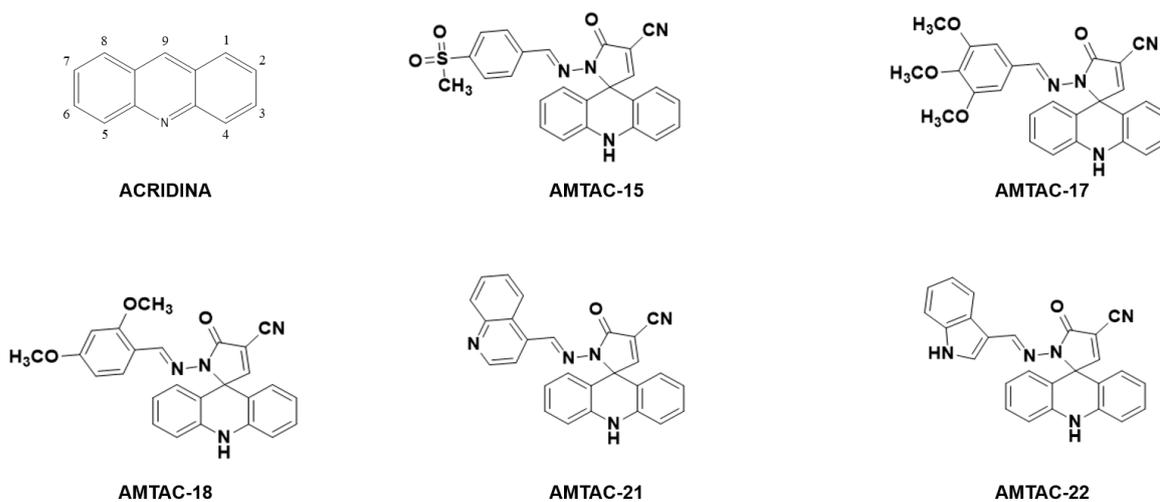
tumorais (DE ALMEIDA et al., 2015; GOUVEIA et al., 2018; MENEZES et al., 2018; SALEM et al., 2016).

Estudos preliminares realizados pela equipe de pesquisa do Laboratório de OncoFarmacologia, do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB/Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal da Paraíba – UFPB), mostraram derivados acridínicos com potente atividade antitumoral em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich, como o N'-(2-cloro-6-metoxiacridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-acrilohidrazida (ACS-AZ10) (MANGUEIRA et al., 2017), o n'-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-il)-2-cianoacetohidrazide (ACS-AZ) (MANGUEIRA, 2019), e o derivado 5'-oxo-1'-fenil-1',5'-diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (ACMD), o qual também demonstrou atividade antitumoral *in vitro* sobre a linhagem HL-60 (leucemia promielocítica humana) (SOUSA, 2019).

Ainda, resultados da nossa equipe de pesquisa demonstraram que o (E)-1'-{(4-flúorbenzilideno)-amino}-5'-oxo-1',5'-diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-07), novo composto espiro-acridínico, apresentou potente atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* (BATISTA, 2019), que corrobora com dados preliminares que apresentaram capacidade inibitória sobre a topoisomerase II $\alpha$ , semelhante ao da m-AMSA (GOUVEIA et al., 2018).

Nessa perspectiva, foram sintetizados os compostos espiro-acridínicos, 1'-((4-(metil-sulfonil)benzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pyrrole]-4'-carbonitrila (AMTAC-15), (E)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxi-benzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-17), (E)-1'-((2,4-dimetoxi-benzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-18), (E)-5'-oxo-1'-((quinolina-6-il-metileno)amino)-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-21) e 1'-(((1H-indol-7-il)metileno)amino)-5'-oxo-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-22) (Figura 6), os quais não apresentam relatos na literatura a respeito de sua atividade farmacológica ou da toxicidade.

**Figura 5.** Estrutura dos novos compostos espiro-acridínicos



**Fonte:** Pinheiro Segundo; Moura, 2020.

Considerando o cenário atual e a problemática no tratamento dos mais diversos tipos de câncer, e que os derivados acridínicos são moléculas com grande potencial terapêutico, especialmente no campo de atividade anticâncer, este trabalho se propôs a estudar a atividade antitumoral e os mecanismos de ação *in vitro* e *in vivo*, bem como a toxicidade de um novo composto espiro-acridínico.

# Objetivos

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Investigar a atividade antitumoral e a toxicidade do novo composto espiro-acridínico (*E*)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxi-benzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10*H*-espiro [acridina- 9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-17), por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Selecionar o composto espiro-acridínico mais efetivo a partir de triagem farmacológica de atividade antitumoral *in vitro* dos compostos AMTAC-15, AMTAC-17, AMTAC-18, AMTAC-21 e AMTAC-22, em diferentes linhagens de células tumorais humanas e em linhagem não tumoral;
- Investigar o potencial citotóxico do composto mais promissor na linhagem mais sensível e em células não tumorais;
- Elucidar possíveis mecanismos de ação antitumoral *in vitro* do composto selecionado: interferência na regulação do ciclo celular, nos mecanismos de morte celular (apoptose/necrose) e na produção de espécies reativas de oxigênio;
- Avaliar a toxicidade aguda do composto mais promissor em embriões/larvas de peixe-zebra e em camundongos, bem como a genotoxicidade em sangue periférico de camundongos;
- Avaliar a atividade antitumoral *in vivo* do composto selecionado em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich (CAE) e investigar os mecanismos de ação envolvidos: alterações no perfil do ciclo celular, efeito antiangiogênico, imunomodulador e antioxidante;

- Caracterizar o perfil de toxicidade do composto mais promissor após tratamento antitumoral (sete dias) em modelo de CAE.

*Material e métodos*

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Local da pesquisa**

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de OncoFarmacologia (OncoFar), no Biotério Professor Thomas George, localizados no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM), onde funciona o Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba (CCS/UFPB), bem como na Unidade de Produção de Organismos Não Convencionais (UniPOM) no Departamento de Biologia Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza (DBM/CCEN/UFPB).

### **4.2 Material**

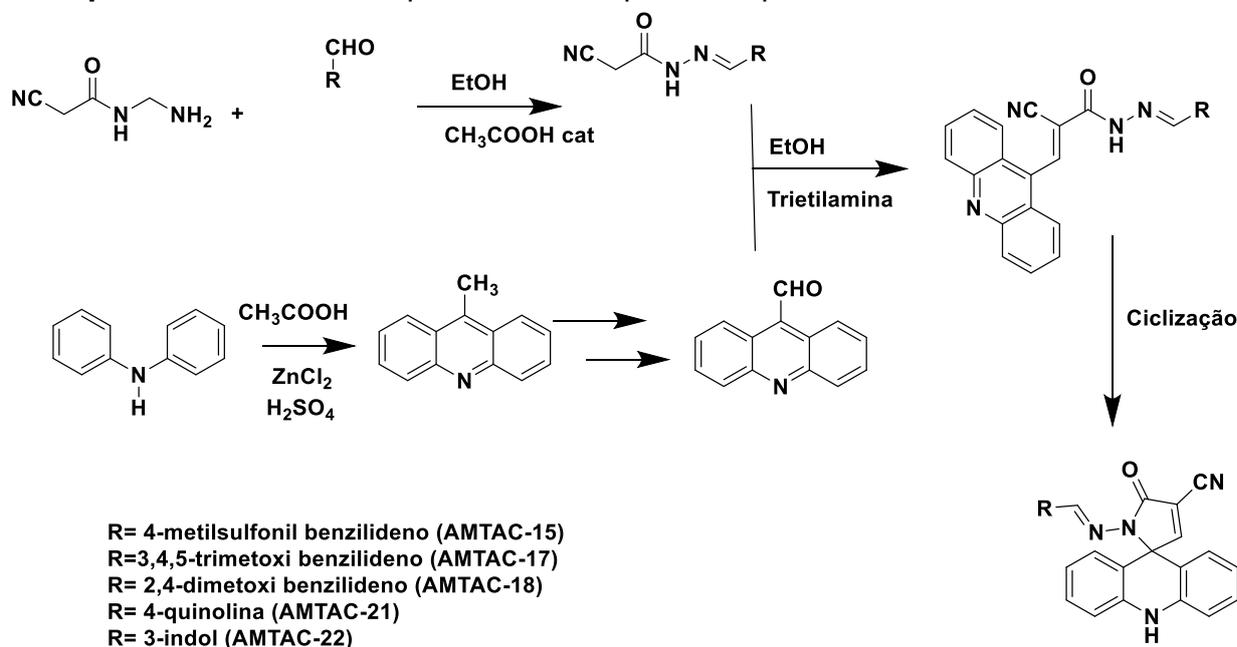
#### **4.2.1 Amostras teste**

As amostras teste, compostos espiro-acridínicos (AMTAC-15, AMTAC-17, AMTAC-18, AMTAC-21 e AMTAC-22), foram gentilmente fornecidas pelo professor Dr. Ricardo Olímpio de Moura do Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM) da Universidade Estadual da Paraíba, sintetizadas de acordo com metodologias já descritas (ALMEIDA et al., 2016; GOUVEIA et al., 2018).

A via sintética usada para obter os compostos espiro-acridínicos foi paralela e convergente, sendo realizada a síntese de 2-ciano-N'-(benzilideno)-aceto-hidrazida (JRs) substituídos como intermediários e em paralelo com o aldeído acridínico. Para obter os JRs, partiu-se da 2-ciano-aceto-hidrazida que foi condensada com diferentes aldeídos aromáticos, como mostrado no Esquema 1, em meio etanólico e em equivalentes molares na presença de ácido acético como catalisador à temperatura ambiente por 24 horas. Para a síntese do aldeído acridínico, partiu-se da difenilamina, que sofre reação de acilação de Friedel-Crafts seguida de ciclização em meio ácido, obtendo a 9-metilacridina, que após oxidações sucessivas permitiu a obtenção do 9-carboxialdeído-acridínico. Para obter os compostos espiro-acridínicos, partiu-se do aldeído de acridina que foi condensado com os intermediários JRs em meio etanólico

e básico em equivalentes molares a 78 °C por 6 horas, os quais sofrem ciclização espontânea, que produz os derivados finais da espiro-acridina.

### Esquema 1. Via sintética para obter compostos espiro-acridínicos



**Fonte:** Pinheiro Segundo; Moura, 2020.

**Legenda:** Compostos espiro-acridínicos do estudo: 1'-((4-(metil-sulfonyl) benzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-dihidro-10*H*-espiro[acridina-9,2'-pyrrole]-4'- carbonitrila (AMTAC-15), (*E*)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxi-benzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10*H*-espiro[acridina- 9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-17), (*E*)-1'-((2,4-dimetoxi-benzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-dihidro-10*H*-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'- carbonitrila (AMTAC-18), (*E*)-5'-oxo-1'-((quinolina-6-il-metileno)amino)-1',5'-dihidro-10*H*-espiro[acridina -9,2'-pirrol]- 4'-carbonitrila (AMTAC-21) e 1'-(((1*H*-indol-7- il)metileno)amino)-5'-oxo-1',5'- dihidro-10*H*-espiro[acridina- 9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-22).

#### 4.2.2 Cultivo celular

Para os ensaios de atividade antitumoral *in vitro* foram utilizadas linhagens de células tumorais humanas e, para avaliação da citotoxicidade, foram utilizadas linhagens não tumorais humana e murina (Quadro 1). As células HCT-116 foram generosamente fornecidas pelo Dr. Manoel de Moraes (Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil). HeLa, SK-MEL-28, MDA-MB-231 e PC-3 foram adquiridas no banco de células do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brasil). MCF-7 e

L929 foram fornecidas pelo Dr. João Ernesto de Carvalho (Universidade de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil). HaCaT foi fornecida pela Dra. Jaciana Aguiar (Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil).

**Quadro 1.** Linhagens de células tumorais e não tumorais utilizadas no estudo

Linhagens	Tipo histológico	Origem	Meio de cultura
HCT-116	Carcinoma colorretal	Humana	RPMI
HeLa	Adenocarcinoma de colo do útero	Humana	DMEM
SK-MEL-28	Melanoma	Humana	DMEM
MCF-7	Adenocarcinoma de mama	Humana	RPMI
MDA-MB-231	Adenocarcinoma de mama	Humana	DMEM
PC-3	Carcinoma de próstata	Humana	F-12K
HaCaT	Queratinócito (não tumoral)	Humana	DMEM
L929	Fibroblasto (não tumoral)	Murina	RPMI

**Fonte:** SILVA, 2020.

As linhagens celulares foram cultivadas ( $5 \times 10^4$  células/mL) em frascos de cultivo utilizando o meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640, *Dulbecco's Modified Eagle's* (DMEM) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) ou F-12K (Banco de Células do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil), suplementadas com 10% de soro bovino fetal (SBF) inativado (GIBCO, Grand Island, NY, EUA), e 1% de solução de antibióticos (penicilina 10.000 U/ml e estreptomicina 10 mg/mL) (Sigma Aldrich). As células foram manipuladas em fluxo laminar, para garantir que não houvesse contaminações, e mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. O crescimento celular foi acompanhado a cada 24 horas, e ao atingirem 80% de confluência, normalmente após 48 horas de cultivo, foi feita a adição 2 mL de solução de tripsina (Sigma Aldrich), por 5-10 minutos, para o deslocamento da monocamada das células aderentes da parede do frasco. Após esse período, adicionou-se meio suplementado com SBF, na mesma proporção de tripsina, para interromper a ação desta. As células foram centrifugadas a 500 g por 5 minutos e ressuspensas em meio suplementado para a contagem em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi avaliada por meio da utilização do corante azul de Tripán (Sigma Aldrich).

Para os ensaios de atividade antitumoral *in vivo* foi utilizada a linhagem de adenocarcinoma murino (Carcinoma Ascítico de Ehrlich), gentilmente cedida pelo

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho (CPQBA/Unicamp). As células foram mantidas na forma ascítica na cavidade peritoneal de camundongos *Swiss (Mus musculus)* na Unidade de Produção Animal (UPA/IPeFarM/UFPB), por meio de repiques semanais.

Para a manutenção do estoque de células, foi realizada a criopreservação das linhagens. Após o procedimento como descrito anteriormente, se a cultura apresentasse mais de 90% de células viáveis e, não ultrapassando cinco passagens, seriam utilizadas para congelamentos. Foi transferido 950 µL da suspensão celular para o tubo criogênico e 50 µL de dimetilsufóxido (DMSO) por gotejamento, utilizado como criopreservante, homogeneizando rapidamente e levadas para o congelador por 20-30 minutos, em seguida transferidas, em um isopor com gelo, para o freezer -80 e, no dia seguinte, finalmente estocadas em tambor de nitrogênio líquido.

#### **4.2.3 Obtenção das células mononucleares de sangue periférico (PBMCs)**

Para a realização do ensaio de citotoxicidade em células normais humanas, as células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs) foram isoladas a partir de amostras de sangue humano, cedidas por doadores voluntários. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde, CAAE: 22986519.0.0000.5188, parecer nº 3.715.689 (ANEXO A).

As PBMCs são caracterizadas por possuir núcleo redondo, e incluem linfócitos (70-90%), monócitos (10-30%), que são uma parte essencial do sistema imunológico e podem ser extraídos facilmente do sangue periférico (MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ; TAVÁREZ; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, 2019).

Para a obtenção destas células, alíquotas de 20 mL de sangue contendo anticoagulante (EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético) foi homogeneizada com 20 mL de PBS (tampão fosfato salino), em tubos estéreis. Posteriormente, a mistura obtida foi adicionada em tubos contendo o Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), uma solução estéril que separa o sangue por gradientes de densidade, que permite a obtenção de células mononucleares. As amostras foram submetidas a centrifugação (400 g, 20 °C, 30 minutos). Em seguida, um anel contendo as células monoculares foi retirado cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta *pasteur* estéril e transferido para um novo tubo, realizando-se duas centrifugações (400 g, 20

°C, por 10 minutos) para lavagem das células com PBS. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi homogeneizado com meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal. A proliferação destas células foi estimulada com 2% de fitohemaglutinina (eBioscience, Thermo Fisher, Rochester, NY), por 24 horas antes do tratamento com as substâncias.

#### 4.2.4 Embriões de peixe-zebra

Para realização dos ensaios que utilizam o modelo de peixe-zebra (*Danio rerio*), foram utilizados embriões com até 3 horas pós-fertilização, fornecidos pela Unidade de Produção de Organismos Não Convencionais (UniPOM) do Departamento de Biologia Molecular (DBM/CCEN/UFPB). Os embriões foram acondicionados no Laboratório de Avaliação de Risco de Novas Tecnologias (LabRisco/CCEN/UFPB), que compartilha estrutura experimental com a UniPOM, de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) até o momento dos experimentos. Peixes adultos de uma linhagem do tipo selvagem, foram mantidos a  $26 \pm 1$  °C sob ciclo claro-escuro. A qualidade da água foi mantida por filtração com carvão ativado e a temperatura mantida em  $7,0 \pm 0,5$ , condutividade a  $750 \pm 50$   $\mu$ S e oxigênio dissolvido acima de 95% de saturação. Os peixes foram alimentados diariamente com ração comercial (Tropical Gran Discus, Sarandi, Brasil) e náuplios de *Artemia* sp. Para obter os embriões, uma armadilha de ovos foi colocada durante a noite em um tanque que contém espécimes masculinos e femininos (proporção de 1: 1) no dia anterior ao teste. Uma hora após o início do ciclo de luz, os ovos foram coletados com auxílio de uma pipeta de Pasteur e lavados com meio E3 (NaCl 5 mM, KCl 0,17 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,33 mM e MgSO<sub>4</sub> 0,33 mM) para seleção subsequente de embriões usando um estereomicroscópio (50x ampliação). Ovos fertilizados viáveis foram selecionados para uso no teste de Toxicidade Aguda em Peixes (FET).

Larvas utilizadas no experimento ou excedentes foram acondicionadas em pequeno volume de água e conduzidas para congelamento rápido em freezer -20 °C, de acordo com o item 8.14.13 da diretriz da prática de eutanásia do CONCEA. As larvas congeladas foram conduzidas para incineração pela empresa SIM Engenharia

Ambiental (Campina Grande - PB), que possui convênio para descarte de resíduos químicos e biológicos da UFPB. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Uso Ético de Animais em Pesquisa (CEUA) da Universidade Federal da Paraíba, Brasil, certificado pelo número 5900310718/2018 (ANEXO B).

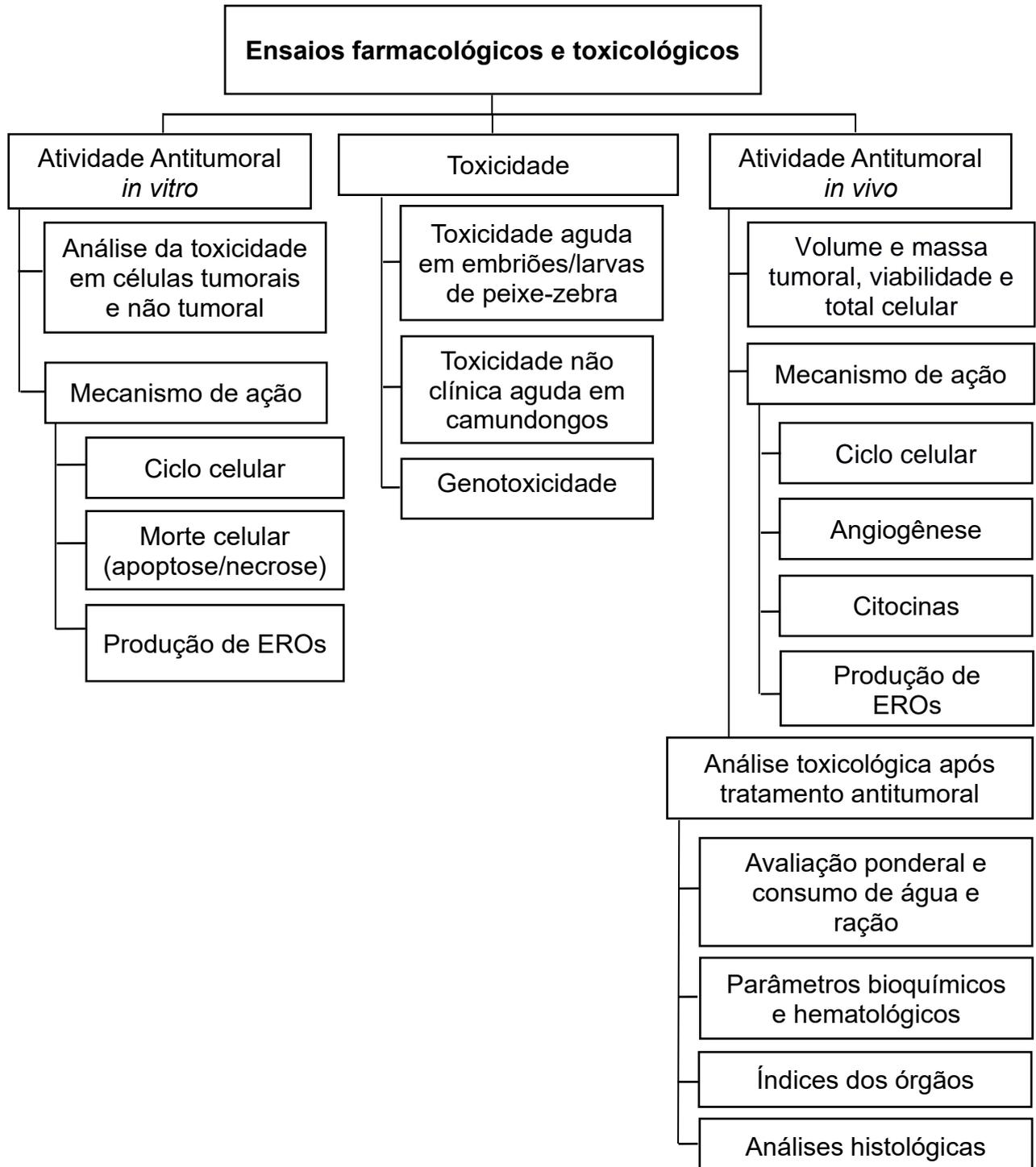
#### **4.2.5 Animais e condições experimentais**

Foram utilizados camundongos albinos *Swiss (Mus musculus)* fêmeas, pesando entre 28 e 32 gramas, obtidos da Unidade de Produção Animal (UPA) do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM/UFPB). Os animais foram agrupados em gaiolas de polietileno, mantidos sob temperatura de  $21 \pm 1$  °C, sem uso de qualquer medicação, tendo livre acesso à comida, tipo pellets de ração (Purina) e água potável. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas. Todos os cuidados foram considerados no sentido de diminuir a dor e o sofrimento dos animais. Antes da realização de qualquer protocolo experimental, os animais foram colocados no ambiente de trabalho por pelo menos 30 minutos de antecedência à execução do experimento.

Após todos os ensaios *in vivo*, os animais foram anestesiados com uma solução de xilazina (16 mg/kg – i.p.) e cetamina (100 mg/kg – i.m.) e, em seguida, eutanasiados por deslocamento cervical. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal da UFPB sob certidão N° 163/2015 (ANEXO C).

### 4.3 Métodos

**Fluxograma 1.** Representação esquemática dos métodos utilizados no estudo da toxicidade e atividade antitumoral do novo composto espiro-acridínico (AMTAC-17).



### 4.3.1 Estudos *in vitro*

#### 4.3.1.1 Avaliação da citotoxicidade em células tumorais e não tumorais

A avaliação da citotoxicidade foi realizada por meio do ensaio de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio), o qual é um método colorimétrico que mede indiretamente a citotoxicidade, proliferação ou viabilidade celular. O MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido em cristais de formazan de cor púrpura, insolúveis em água, após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais e outras enzimas lisossomais presentes em células metabolicamente ativas. Uma vez solubilizado, o formazan pode ser quantificado por espectrofotômetro e sua intensidade colorimétrica é diretamente proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983).

As células foram semeadas (100  $\mu$ L) em placas de 96 poços na concentração de  $3 \times 10^5$  células/mL (HCT-116, HeLa, MCF-7, PC-3, MDA-MB-231, SK-MEL-28, L929 e HaCaT) e  $1 \times 10^6$  células/mL (PBMC). Após 24 horas, as substâncias previamente dissolvidas em DMSO, em uma concentração de 20 mM, e incubadas (100  $\mu$ L) na concentração de 50  $\mu$ M (triagem farmacológica), ou em diferentes concentrações (3,12 – 200  $\mu$ M) com a suspensão celular, não ultrapassando a concentração final de 0,5% de DMSO, por 24, 48 e/ou 72 horas, conforme o caso, em estufa a 5% de CO<sub>2</sub>, a 37 °C. A doxorubicina foi utilizada como droga padrão, e testada em concentrações variando entre 0,31 e 20  $\mu$ M. Prosseguido o período de incubação, as placas foram centrifugadas (500 g, 5 minutos, 25 °C), foi removido 110  $\mu$ L do sobrenadante e 10  $\mu$ L da solução de MTT foi adicionada (5 mg/mL em PBS) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As placas foram incubadas por 3 horas, em seguida foi adicionado 100  $\mu$ L de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% e os cristais de formazan produzidos foram dissolvidos *overnight*. A absorbância foi mensurada em um espectrofotômetro (leitor de microplacas BioTek Instruments, Sinergy HT, Winooski, VT, EUA), no comprimento de onda de 570 nm.

Neste ensaio, primeiramente todas as células foram expostas a uma concentração limiar fixa de 50  $\mu$ M dos compostos AMTAC-15, AMTAC-17, AMTAC-18, AMTAC-21 e AMTAC-22, incubados por 72 horas. Esta triagem preliminar foi

realizada para inferir quais compostos apresentariam melhor atividade antitumoral. Em seguida, o composto de maior atividade (AMTAC-17) e a linhagem tumoral mais sensível (HCT-116), foram selecionados para a determinação da  $CI_{50}$  (concentração que produz 50% de inibição no crescimento celular) em diferentes tempos (24, 48 e 72 horas). Para a determinação da  $CI_{50}$  foram testadas diferentes concentrações de AMTAC-17 (3,12 – 200  $\mu$ M), em quadruplicata, sendo realizado o ensaio de MTT conforme descrito anteriormente. O controle foi considerado 100% de viabilidade.

O índice de seletividade foi obtido a partir da razão entre a  $CI_{50}$  da célula não tumoral pela  $CI_{50}$  da célula tumoral (SERAFIM et al., 2018).

#### **4.3.1.2 Investigação de mecanismos de ação antitumoral *in vitro***

##### **4.3.1.2.1 Avaliação do ciclo celular**

As células HCT-116 foram incubadas ( $2 \times 10^5$  células em 1 mL) em placas de 24 poços com o AMTAC-17 nas concentrações de 30 e 60  $\mu$ M (correspondentes a  $CI_{50}$  e o dobro), por 48 horas. Como droga padrão foi usada a doxorrubicina (2,5  $\mu$ M). Após o tratamento, as células foram coletadas por centrifugação (500 g, 20 °C, 5 minutos), ressuspensas em 1 mL de PBS, fixadas cuidadosamente em 4 mL etanol 70% previamente gelado, em vórtex, e congeladas (-20 °C) até a análise. No momento da análise, as células foram recuperadas por centrifugação (400 g, 10 minutos, 4 °C), realizando-se sucessivas lavagens em PBS em temperatura ambiente, 300  $\mu$ L de células foram então incubadas com RNase (3  $\mu$ L; 0,1 mg/mL) e iodeto de propídio (15  $\mu$ L; 0,05 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), no escuro (37 °C, 30 minutos). Em seguida, a leitura foi realizada em citômetro de fluxo (FacsCanto II, BD, EUA), adquirindo-se 10.000 eventos/amostra. O experimento foi realizado em triplicata e os dados foram analisados com o programa Flowing Software 2.5.1. Foi determinado o percentual de células nas diferentes fases do ciclo celular (G1, S, G2, M), bem como células sub-diplóides (sub-G1), considerando que o marcador iodeto de propídio se liga especificamente ao DNA e, portanto, a intensidade de fluorescência detectada pode ser relacionada com a quantidade de DNA nas células em cada fase do ciclo (JAYAT; RATINAUD, 1993).

#### **4.3.1.2.2 Avaliação do mecanismo de morte celular**

##### **4.3.1.2.2.1 Avaliação dos efeitos de AMTAC-17 sobre a externalização da fosfatidilserina**

As células HCT-116 foram incubadas ( $2 \times 10^5$  células em 1 mL) em placas de 24 poços com o AMTAC-17 nas concentrações de 30 e 60  $\mu\text{M}$  (correspondentes a  $\text{CI}_{50}$  e o dobro), por 48 horas. Como controle positivo foi usada a doxorubicina (2,5  $\mu\text{M}$ ). Após o tratamento, as células foram coletadas por centrifugação (500 g, 20 °C, 5 minutos), lavadas em PBS, ressuspensas em um tampão de ligação (195  $\mu\text{L}$ ) e 5  $\mu\text{L}$  da Anexina V conjugada com fluoresceína (FITC) foi então adicionada, de acordo com as instruções do fabricante (eBioscience, Thermo Fisher, Rochester, NY). As células foram incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos, lavadas e ressuspensas em 190  $\mu\text{L}$  de tampão de ligação. Em seguida, 10  $\mu\text{L}$  do iodeto de propídio (IP) (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foi adicionado. A Anexina V possui alta afinidade com o fosfolípido fosfatidilserina presente na membrana externa de células em apoptose. Já o IP interage diretamente com o DNA de células que perderam a integridade de membrana, distinguindo assim células em apoptose ou necrose (RICCARDI; NICOLETTI, 2006). Em seguida, a leitura foi realizada em citômetro de fluxo (FacsCanto II, BD, EUA), adquirindo-se 10.000 eventos/amostra. O experimento foi realizado em triplicata e os dados foram analisados com o programa Flowing Software 2.5.1.

##### **4.3.1.2.2.2 Análise morfológica da apoptose**

As células HCT-116 foram incubadas ( $5 \times 10^5$  células em 1 mL) em placas de 24 poços com o AMTAC-17 na concentração de 30  $\mu\text{M}$ , por 48 horas. Como controle positivo foi usada a doxorubicina (2,5  $\mu\text{M}$ ). Após o tratamento, as células foram coletadas por centrifugação (500 g, 20 °C, 5 minutos), ressuspensas em PBS, marcadas com 10  $\mu\text{L}$  de laranja de acridina (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e de iodeto de propídio (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As células recém coradas foram observadas sob microscópio confocal de varredura a laser (Leica, Alemanha). Laranja de Acridina é um corante capaz de atravessar membranas intactas e se intercalar no

DNA, emitindo a fluorescência verde, podendo assim diferenciar células viáveis/apoptose inicial de células em apoptose tardia/necrose, pois estas também são marcadas com o IP. As células foram observadas de acordo com os seguintes critérios: (a) as células viáveis apresentam coloração verde clara e estrutura intacta; (b) as células apoptóticas iniciais exibem um núcleo verde claro mostrando condensação da cromatina; (c) as células apoptóticas tardias mostram áreas alaranjadas densas (verde/vermelho) de condensação da cromatina e *blebs* de membrana; (d) as células necróticas possuem núcleo vermelho (RENVOIZÉ et al., 1998; TAN; NORHAIZAN, 2019).

#### 4.3.1.2.3 Quantificação de espécies reativas de oxigênio

A produção de espécies reativas de oxigênio foi avaliada utilizando o fluoróforo 2',7'-diacetato diclorofluoresceína (DCFH-DA). Esta molécula não fluorescente é muito sensível às variações no ambiente redox intracelular e quando penetra nas células vivas é clivada por esterases intracelulares, bem como oxidada por diferentes espécies reativas de oxigênio, sendo convertida em DCF (diclorofluoresceína), uma molécula altamente fluorescente (COSSARIZZA et al., 2009). Portanto, o número de células que emitirão fluorescência, detectadas por citometria de fluxo, é diretamente proporcional aos níveis de estresse oxidativo.

As células HCT-116 foram incubadas ( $2 \times 10^5$  células em 1 mL) em placas de 24 poços com o AMTAC-17 nas concentrações de 30 e 60  $\mu\text{M}$  (correspondentes a  $\text{CI}_{50}$  e o dobro), por 48 horas. Após o tratamento, as células foram coletadas por centrifugação (500 g, 20 °C, 5 minutos), ressuspensas em 1 mL de PBS, e posteriormente 300  $\mu\text{L}$  de células foram marcadas com 6  $\mu\text{L}$  de DCFH-DA (10  $\mu\text{M}$ ) e incubadas no escuro, durante 30 minutos, a 37 °C. Uma alíquota dessas amostras foi incubada com peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), na concentração final de 500  $\mu\text{M}$ , utilizado como o controle positivo deste ensaio. Após o período de incubação, os tubos foram colocados em gelo triturado para suspender a reação de marcação do DCF. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FacsCanto II (BD, EUA) em Ex 485/Em 530 nm. A quantificação das EROs foi estimada pela média da intensidade

de fluorescência (M.I.F.). O experimento foi realizado em triplicata e os dados foram analisados com o programa Flowing Software 2.5.1.

### **4.3.2 Estudos *in vivo***

#### **4.3.2.1 Ensaio toxicológicos**

##### **4.3.2.1.1 Avaliação da toxicidade aguda em embriões/larvas de peixe-zebra**

A avaliação da embriotoxicidade aguda do AMTAC-17 foi realizada em peixe-zebra de acordo com o teste FET, protocolo nº 236 da OECD (2013), com algumas modificações. Vinte poços de uma placa de 96 poços foram preenchidos com 300 µL/poço da amostra teste, solubilizada em DMSO 0,5% e em meio E3, na concentração de 300 µM, outros 20 poços foram preenchidos com o mesmo volume de meio E3 (controle negativo) e outros 20 poços foram preenchidos com o mesmo volume de DMSO 0,5% (controle solvente). Em cada poço foi adicionado um embrião com até 3 horas pós-fertilização. A concentração de 300 µM de AMTAC-17 (que representa mais de 10x o valor da  $CI_{50}$  para a célula tumoral HCT-116) foi utilizada como teste limite de acordo com a recomendação do teste FET. Diariamente e até 96 horas após a exposição à substância teste, foram verificados os seguintes pontos de letalidade: (i) coagulação do ovo; (ii) ausência de formação do somito; (iii) não deslocamento da base da cauda; e (iv) falta de batimentos cardíacos. Na presença de qualquer um desses pontos de letalidade o embrião/larva seria considerado morto. A exposição foi realizada em condição estática (sem renovação da substância teste ou de meio E3). As observações foram feitas utilizando um estereomicroscópio (Televal 31, Zeiss), em um aumento de 50x, e fotografadas. Ao final do experimento, as larvas sobreviventes foram rapidamente congeladas e conduzidas para incineração.

##### **4.3.2.1.2 Avaliação da toxicidade não clínica aguda**

O ensaio de toxicidade aguda em camundongos foi realizado de acordo com o “Guidelines for testing of chemicals” n. 423/2001 da OECD (*Organisation for Economic*

*Co-operation and Development*) (ANEXO C). Em princípio, o método não se destina a permitir o cálculo preciso da DL<sub>50</sub>, apesar de fornecer uma estimativa do seu valor, entretanto permite uma classificação da substância em categorias de acordo com o “*Globally Harmonized Classification System*” – GHS (OECD, 2001).

Camundongos *Swiss*, três fêmeas por grupo, foram submetidos a doses únicas de 2000 mg/kg de AMTAC-17 por via intraperitoneal (i.p.) e ao grupo controle foi administrado apenas o veículo (solução a 12% de Tween 80 em solução salina).

Com o objetivo de mapear possíveis alterações comportamentais, sugestivas de atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) ou Sistema Nervoso Autônomo (SNA), após administração da substância foi realizada observação cuidadosa para detecção de possíveis sinais tóxicos como hiperatividade, irritabilidade, agressividade, tremores, convulsões, catatonias, analgesia, anestesia, ptose, resposta ao toque diminuído, ambulação, capacidade de limpeza e ato de levantar, nos intervalos: 0, 15, 30 e 60 minutos e após 4 horas; e diariamente durante 14 dias, utilizando-se protocolo experimental (ANEXO D) (ALMEIDA et al., 1999).

#### **4.3.2.1.3 Avaliação da genotoxicidade**

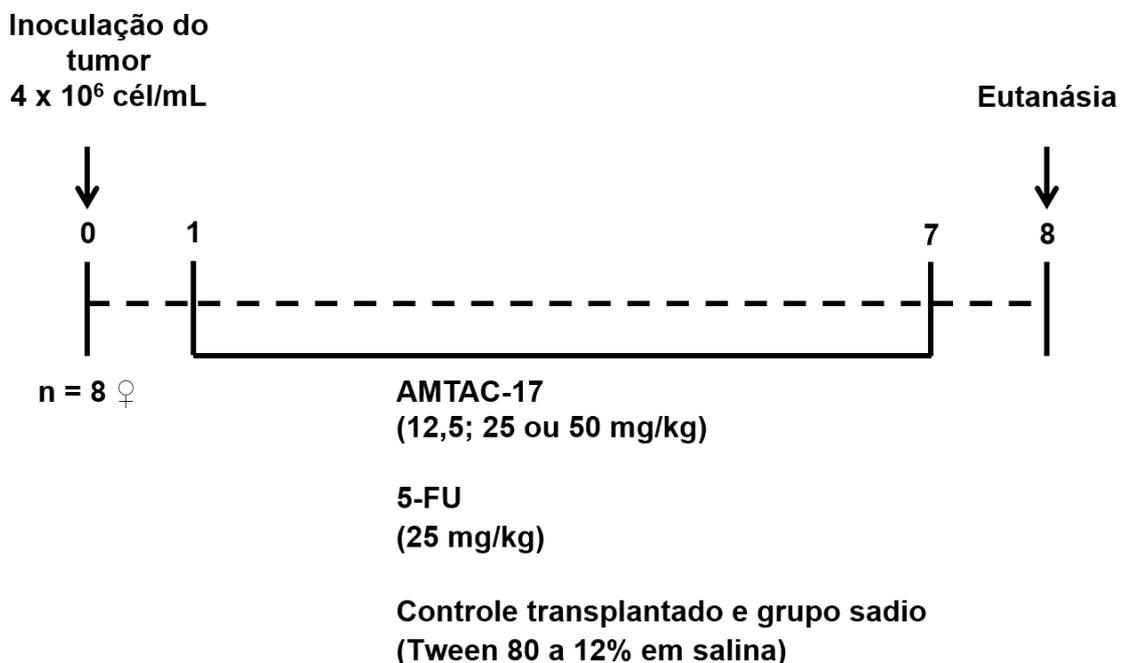
Para o ensaio do micronúcleo em sangue periférico, grupos de seis camundongos *Swiss* fêmeas foram tratados por via intraperitoneal (i.p.) com a dose de 2000 mg/kg de AMTAC-17. Um grupo controle positivo (ciclofosfamida - 50 mg/kg – i.p.) e um grupo controle negativo (Tween 80 a 12% em solução salina) foram incluídos. Após 48 horas, os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg i.m.) e cloridrato de xilazina (16 mg/kg i.p.) e amostras de sangue foram coletadas pelo plexo orbital com o auxílio de uma agulha heparinizada para confecção das extensões sanguíneas. Após secagem, as lâminas foram coradas com coloração panótica (Newprov) para posterior análise em microscópio óptico. Para cada animal, três extensões sanguíneas foram preparadas e um mínimo de 2000 eritrócitos contados para determinação da frequência de eritrócitos micronucleados (OECD, 1997).

#### 4.3.2.2 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich

Células de Carcinoma Ascítico de Ehrlich (CAE) com cinco dias de crescimento foram aspiradas da cavidade peritoneal de camundongos e implantadas por via intraperitoneal (0,5 mL -  $4 \times 10^6$  células/mL) nos camundongos experimentais (n=8 fêmeas/grupo) (DOLAI et al., 2012). Vinte e quatro horas após o implante, AMTAC-17 foi solubilizado em Tween 80 (12%) e administrado diariamente por via intraperitoneal (i.p.), nas doses de 12,5; 25 ou 50 mg/kg, por sete dias. O grupo controle transplantado com o tumor foi tratado com uma solução de 12% de Tween 80 e um quinto grupo de animais foi tratado com 5-FU (25 mg/kg), como droga padrão.

Ainda, para as análises toxicológicas foi utilizado um grupo sadio, no qual não houve implante de células tumorais nos animais, porém os animais foram submetidos às mesmas condições experimentais.

#### Esquema 2. Tratamento dos animais em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich



Fonte: SILVA, 2020.

#### **4.3.2.2.1 Volume do tumor, massa tumoral, viabilidade e total celular**

Para a avaliação do efeito antitumoral do AMTAC-17, um dia após a última administração do tratamento descrito no item 4.3.2.2, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100 mg/kg i.m.) e cloridrato de xilazina (16 mg/kg i.p.), e eutanasiados por deslocamento cervical. Então, o líquido ascítico foi coletado da cavidade peritoneal e o volume foi medido e expresso em mL. Uma alíquota foi retirada para a determinação da viabilidade celular pelo ensaio de exclusão do azul de tripan. Para tanto, foram incubados volumes semelhantes de líquido ascítico e de uma solução de 0,4% do corante, seguido de análise das células em câmara de Neubauer. Este ensaio avalia a habilidade de células viáveis, com membrana plasmática intacta, excluírem o corante azul de tripan, permitindo assim, a quantificação dessas células (RENZI; VALTOLINA; FORSTER, 1993). A massa do tumor foi determinada pela diferença dos pesos dos camundongos antes e depois da retirada do líquido ascítico, e foi expressa em gramas (g). A quantidade total de células viáveis no peritônio dos animais foi expressa como total celular ( $\times 10^7$  células), que foi obtido como o produto do volume do tumor, expresso em mL, pela viabilidade celular, expressa como a quantidade de células  $\times 10^6$ /mL.

#### **4.3.2.2.2 Investigação do mecanismo de ação antitumoral *in vivo***

Para a investigação do mecanismo de ação antitumoral *in vivo* do AMTAC-17 foi selecionada a dose de 12,5 mg/kg. Os animais transplantados com células de CAE foram tratados por sete dias com AMTAC-17 conforme descrito no item 4.3.2.2. No dia seguinte após a última administração, os animais dos grupos controle transplantado, AMTAC-17 (12,5 mg/kg), 5-FU (25 mg/kg), e o grupo de animais sadios (quando presente) foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100 mg/kg; i.m.) e cloridrato de xilazina (16 mg/kg; i.p.) e, em seguida, eutanasiados por deslocamento cervical, para avaliação dos mecanismos de ação antitumoral *in vivo* e avaliação da toxicidade, descritas nos tópicos a seguir.

#### **4.3.2.2.1 Análise do ciclo celular**

Após a eutanásia dos animais conforme descrito no item 4.3.2.2.2, as células do líquido ascítico ( $1 \times 10^6$  células/mL) dos animais experimentais (grupos: controle; 12,5 mg/kg de AMTAC-17; 25 mg/kg de 5-FU) foram coletadas, fixadas cuidadosamente com etanol 70% previamente gelado, em vórtex, e congeladas ( $-20$  °C) até a análise. As demais etapas foram realizadas conforme o item 4.3.1.2.1.

#### **4.3.2.2.2 Investigação do efeito antiangiogênico**

Após a eutanásia dos animais conforme descrito no item 4.3.2.2.2, o peritônio foi cortado e o revestimento interior da cavidade peritoneal dos animais foi examinado e fotografado para determinação da microdensidade vascular peritumoral, com o auxílio do software AVSOFT. A microdensidade dos vasos foi determinada pela área ocupada por vasos sanguíneos dividido pela área total selecionada (AGRAWAL et al., 2011).

#### **4.3.2.2.3 Quantificação das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-4 e TNF- $\alpha$**

Para a quantificação de citocinas, os animais foram tratados e eutanasiados conforme descrito no item 4.3.2.2.2. O líquido ascítico coletado da cavidade peritoneal dos animais foi centrifugado (250 g, 4 °C, 5 minutos). Em seguida, o sobrenadante foi coletado e armazenado a  $-20$  °C para posterior dosagem das citocinas, por meio de ELISA, de acordo com o protocolo especificado pelo fabricante (Bioscience, Inc. Science Center Drive, EUA). Brevemente, placas de 96 poços foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, anti-IL-1 $\beta$ , anti-IL-4, anti-IL-12 e anti-TNF- $\alpha$ , solubilizados em tampão fosfato, e incubadas *overnight* a 4°C. Após este período, as placas foram lavadas com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBST) e os sítios inespecíficos foram bloqueados com a solução de bloqueio (PBS contendo soro fetal bovino a 10%), por uma hora. Novamente, as placas foram lavadas em PBST e foram adicionadas tanto as amostras a serem analisadas, quanto diferentes concentrações das citocinas recombinantes IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-12 e TNF- $\alpha$  para a obtenção da curva. As placas foram

novamente incubadas *overnight* a 4 °C. Terminado o período de incubação, as placas foram lavadas e o complexo detector formado pelo anticorpo de detecção biotilado foi adicionado às placas que foram incubadas por uma hora. Posteriormente, as placas foram novamente lavadas e então foi adicionado o complexo enzimático avidina-peroxidase (avidin-HRP). As placas foram incubadas por mais meia hora à temperatura ambiente. Após lavagens adicionais, a reação foi revelada pela adição da solução substrato contendo tetrametilbenzidina (TMB) e, depois de 15 minutos, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1N e a leitura realizada em leitor de placa (Microplate reader BioTek Instruments, Sinergy HT, EUA) a 450 nm. A quantidade de citocinas foi calculada a partir das curvas-padrão (SANTOS et al., 2018).

#### **4.3.2.2.4 Quantificação de espécies reativas de oxigênio**

Após a eutanásia dos animais conforme descrito no item 4.3.2.2.2, o líquido peritoneal foi lavado com PBS e centrifugado (245 g, 4 °C, 5 minutos). Após este processo, as células de CAE foram coletadas ( $2 \times 10^6$  células/mL), marcadas com DCFH-DA (10 µM). As demais etapas foram realizadas conforme o item 4.3.1.2.3.

#### **4.3.2.3 Avaliação da toxicidade em animais transplantados com células de carcinoma ascítico de Ehrlich**

##### **4.3.2.3.1 Avaliação ponderal e do consumo de água e de ração**

Para a avaliação de possíveis efeitos tóxicos produzidos pelo tratamento com AMTAC-17, os animais dos grupos controle transplantado, AMTAC-17 (12,5 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg), descritos no item 4.3.2.2.2, foram pesados no início e no final do tratamento e diariamente foram avaliados os consumos de água e de ração.

##### **4.3.2.3.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos**

Amostras de sangue foram coletadas pelo plexo orbital com o auxílio de uma agulha heparinizada dos animais dos grupos controle transplantado, AMTAC-17 (12,5

mg/kg), 5-FU (25 mg/kg), e do grupo de animais sadios, anestesiados conforme descrito no item 4.3.2.2.2. Foram analisados os parâmetros bioquímicos: ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), e nos parâmetros hematológicas foi realizada a avaliação das séries vermelha e branca (eritrograma e leucograma, respectivamente). Os parâmetros bioquímicos e hematológicos foram determinados utilizando-se *kits* específicos para o analisador bioquímico automático BIO 2000 (BIOPLUS) e o analisador hematológico celular automático Hematoclin 2.8 Vet (Bioclin/Midray), respectivamente (MOURA et al., 2016).

#### **4.3.2.3.3 Avaliação dos índices dos órgãos**

Após a coleta de sangue descrita no item 4.3.2.3.2, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, e os órgãos (timo, baço, fígado, rins e coração) foram removidos e pesados para o cálculo dos seus índices. O índice dos órgãos foi calculado seguindo a fórmula: Índice = peso do órgão (mg)/peso do animal (g).

#### **4.3.2.3.4 Análises histológicas**

Após a pesagem dos órgãos, descrita no item 4.3.2.3.3, fígado e rins dos animais dos grupos controle transplantado, AMTAC-17 (12,5 mg/kg), 5-FU (25 mg/kg) e o grupo de animais sadios foram seccionados, fixados em formalina (solução de formol a 10%) tamponada e após 24 horas foram resseccionados para processamento histopatológico: desidratação com séries crescentes de álcool (70 a 100%), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina, segundo os métodos habituais. Em micrótomo rotativo semi-automático, os fragmentos tissulares emblocados em parafina, foram seccionados em espessura de 3 µm e subsequentemente submetidos à coloração hematoxilina-eosina e tricrômio de gomori, este último destinado ao estudo do tecido hepático. Em seguida foram examinados ao microscópio óptico (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). As análises histológicas foram realizadas em colaboração com a Profa. Dra. Karina Carla de Paula

Medeiros do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

#### **4.4 Análise estatística**

Para a determinação da  $CI_{50}$  (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (95%), foi realizada a regressão não-linear. Nos demais ensaios, os dados foram analisados a partir da média  $\pm$  e.p.m (erro padrão da média) de 3 experimentos independentes. Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA), seguido de Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

# Resultados

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Estudos *in vitro*

#### 5.1.1 Avaliação da citotoxicidade em células tumorais e não tumoral

O potencial citotóxico dos compostos espiro-acridínicos (AMTAC-15, AMTAC-17, AMTAC-18, AMTAC-21 e AMTAC-22) em linhagens de células tumorais humanas (HCT-116, HeLa, SK-MEL-28, MCF-7, MDA-MB-231 e PC-3) e em linhagem de célula não tumoral murina (L929), após tratamento de 72 horas, está demonstrado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Citotoxicidade dos compostos espiro-acridínicos, frente linhagens tumorais e não tumoral pelo ensaio de MTT, após 72 horas de exposição

Linhagem celular	IC(%)				
	AMTAC-15	AMTAC-17	AMTAC-18	AMTAC-21	AMTAC-22
HCT-116	28,50 ± 0,64*	70,16 ± 0,88*	54,3 ± 1,24*	70,60 ± 0,98*	67,20 ± 1,19*
HeLa	5,56 ± 0,64	56,01 ± 0,59*	24,92 ± 1,43*	59,73 ± 0,18*	62,38 ± 1,06*
SK-MEL-28	0,00 ± 2,38	28,87 ± 2,50*	15,79 ± 0,98*	33,56 ± 4,06*	25,96 ± 4,15*
MCF-7	22,60 ± 1,70*	38,70 ± 1,50*	37,90 ± 0,49*	60,60 ± 1,55*	64,50 ± 0,97*
MDA-MB-231	3,35 ± 0,25	30,13 ± 3,44*	12,03 ± 0,80*	22,38 ± 1,15*	35,88 ± 1,37*
PC-3	5,99 ± 1,06	48,32 ± 3,15*	26,87 ± 0,91*	42,31 ± 0,82*	50,98 ± 0,85*
L929	9,00 ± 1,20	35,28 ± 2,10*	44,60 ± 0,71*	98,60 ± 0,28*	88,90 ± 0,38*

Fonte: SILVA, 2020.

**Legenda:** Dados foram obtidos de um experimento realizado em quadruplicata e apresentados em valores de porcentagem de inibição obtidos a partir da média ± e.p.m. em comparação com o controle negativo, analisados por ANOVA seguido por Tukey. Foi utilizada a concentração de 50 µM dos compostos para a triagem farmacológica. O controle foi considerado como 100% de viabilidade. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle. IC: Inibição do crescimento (porcentagem).

O composto AMTAC-15 induziu as menores porcentagens de inibição nas linhagens testadas, apresentando atividade significativa apenas para as linhagens HCT-116 ( $28,5 \pm 0,64\%$ ;  $p < 0,05$ ) e para a linhagem MCF-7 ( $22,6 \pm 1,70\%$ ;  $p < 0,05$ ). O AMTAC-18 demonstrou moderada porcentagem de inibição na linhagem HCT-116 ( $54,3 \pm 1,24\%$ ;  $p < 0,05$ ), porém apresentou pouca atividade nas outras linhagens. Os compostos AMTAC-21 e AMTAC-22 exibiram semelhantes percentuais de inibição, com inibição significativa em todas as linhagens em estudo. Finalmente, o AMTAC-17 demonstrou atividade significativa em todas as linhagens, com um dos maiores efeitos citotóxicos na linhagem HCT-116 ( $70,16 \pm 0,88\%$ ;  $p < 0,05$ ), semelhante ao observado para o AMTAC-21 ( $70,60 \pm 0,98\%$ ;  $p < 0,05$ ). Contudo, o AMTAC-17 apresentou maior seletividade para a célula tumoral, uma vez que exibiu pequena porcentagem de inibição da linhagem não tumoral L929 ( $35,28 \pm 2,10\%$ ;  $p < 0,05$ ), enquanto que AMTAC-21 foi potencialmente citotóxico ( $98,60 \pm 0,28\%$ ;  $p < 0,05$ ).

Por esse motivo, o composto AMTAC-17 foi selecionado para a investigação de mecanismos de ação *in vitro* na linhagem HCT-116 e, posteriormente, atividade antitumoral e toxicidade *in vivo*.

### 5.1.2 Avaliação dos efeitos do AMTAC-17 sobre a viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada na linhagem HCT-116 após tratamento com AMTAC-17 por 24, 48 e 72 horas (Tabela 2). Observaram-se alterações na viabilidade de células HCT-116 em 24 horas de tratamento, porém apresentando  $CI_{50}$  superior a maior concentração testada ( $200 \mu\text{M}$ ). No tratamento de 48 horas ocorreu maior inibição da viabilidade celular em relação ao grupo controle, apresentando uma  $CI_{50}$  de  $56,64 \pm 1,42 \mu\text{M}$ . Como esperado, o tratamento das células por 72 horas mostrou um aumento da citotoxicidade, com uma  $CI_{50}$  de  $27,19 \pm 1,32 \mu\text{M}$ .

Na perspectiva de avaliar a citotoxicidade em células não tumorais, foi avaliada a viabilidade de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs), bem como de linhagens de células não tumorais HaCaT e L929 após tratamento com AMTAC-17 por 72 horas (Tabela 2). A viabilidade das PBMCs foi significativamente reduzida por AMTAC-17 em relação ao grupo controle (100% de viabilidade), apresentando uma  $CI_{50}$  de  $18,62 \pm 1,09 \mu\text{M}$ . Nas linhagens de células não tumorais, o AMTAC-17

apresentou  $CI_{50}$  de  $31,40 \pm 1,14 \mu\text{M}$  e  $103,50 \pm 1,15 \mu\text{M}$ , para a HaCaT e L929, respectivamente.

A droga padrão doxorrubicina foi testada nas linhagens HCT-116 e HaCaT, a qual apresentou uma  $CI_{50}$  de  $2,5 \pm 0,001 \mu\text{M}$  em HCT-116 e  $0,28 \pm 0,001 \mu\text{M}$  para a linhagem de células não tumorais humanas HaCaT ( $p < 0,05$  para ambas). A viabilidade de PBMCs foi significativamente reduzida após o tratamento com a droga padrão ( $CI_{50}$ :  $0,05 \pm 0,002 \mu\text{M}$ ;  $p < 0,05$ ) (Tabela 2).

A partir dos resultados de  $CI_{50}$  para as células tumorais e não tumorais, determinou-se o índice de seletividade (IS), o qual demonstrou que a AMTAC-17 possui seletividade maior para as células tumorais da linhagem HCT-116 (HaCaT: 1,15; PBMC: 0,68) que a droga padrão doxorrubicina (HaCaT: 0,10; PBMC: 0,01).

**Tabela 2.** Efeito do AMTAC-17\* e DXR\*\* sobre a viabilidade da linhagem tumoral HCT-116 e de células não tumorais

Células	$CI_{50}(\mu\text{M})$				IS	
	AMTAC-17 (24 h)	AMTAC-17 (48 h)	AMTAC-17 (72 h)	DXR (72 h)	AMTAC-17 (72 h)	DXR (72 h)
HCT-116	>200	$56,64 \pm 1,42$	$27,19 \pm 1,32$	$2,57 \pm 0,001$	-	-
L929	NT	NT	$103,50 \pm 1,15$	NT	3,80	ND
HaCaT	NT	NT	$31,40 \pm 1,14$	$0,28 \pm 0,001$	1,15	0,10
PBMC	NT	NT	$18,62 \pm 1,09$	$0,05 \pm 0,002$	0,68	0,01

Fonte: SILVA, 2020.

**Legenda:** Dados foram obtidos a partir de três experimentos independentes realizados em quadruplicata e apresentados em valores de  $CI_{50}$  obtidos por regressão não linear com intervalo de confiança de 95%. NT: Não Testado. ND: Não Determinado.  $CI_{50}$ : Concentração que produz 50% de inibição no crescimento celular. IS: Índice de seletividade ( $CI_{50}$  da célula não tumoral (HaCaT ou PBMC)/ $CI_{50}$  da célula tumoral (HCT-116)).

\*AMTAC-17: (*E*)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxibenzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10*H*-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

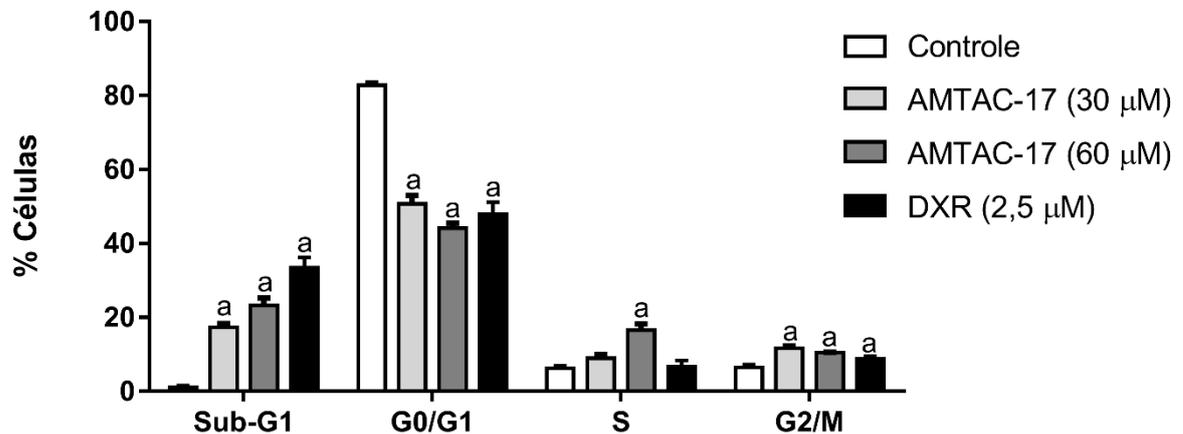
\*\*DXR: Doxorrubicina

### 5.1.3 Investigação do mecanismo de ação *in vitro*

### 5.1.3.1 Avaliação do ciclo celular

Em 48 horas, AMTAC-17 promoveu alterações significativas na distribuição das células tumorais nas diferentes fases do ciclo celular (Figura 6). Observa-se aumento no pico sub-G1 na concentração de 30  $\mu\text{M}$  ( $17,36 \pm 1,05\%$ ;  $p < 0,05$ ) e 60  $\mu\text{M}$  ( $23,26 \pm 0,61\%$ ;  $p < 0,05$ ), em comparação ao controle ( $1,16 \pm 0,24\%$ ). Na fase G0/G1, ocorreu diminuição no percentual de células, após tratamento com 30  $\mu\text{M}$  e 60  $\mu\text{M}$  de AMTAC-17 ( $50,73 \pm 2,28\%$  e  $44,14 \pm 0,53\%$ , respectivamente;  $p < 0,05$  para ambas), em comparação ao controle ( $82,82 \pm 0,65\%$ ). Na fase S do ciclo celular, não houve diferença significativa na concentração de 30  $\mu\text{M}$  ( $8,96 \pm 1,04\%$ ), porém com o aumento da concentração se observa o acúmulo de células nessa fase ( $16,56 \pm 0,46\%$ ;  $p < 0,05$ ), comparado ao controle ( $6,33 \pm 0,41\%$ ). Ainda, observou-se que as duas concentrações de AMTAC-17 testadas promoveram aumento significativo no percentual de células na fase G2/M (30  $\mu\text{M}$ :  $11,68 \pm 0,63\%$ ; 60  $\mu\text{M}$ :  $10,46 \pm 0,41\%$ ;  $p < 0,05$  para ambas), quando comparadas ao controle ( $6,47 \pm 0,55\%$ ).

**Figura 6.** Efeito do AMTAC-17\* e DXR\*\* sobre a progressão do ciclo celular em células HCT-116 após 48 horas de tratamento



Fonte: SILVA, 2020.

**Legenda:** Dados são expressos como média  $\pm$  e.p.m. de três experimentos independentes em triplicata analisados por ANOVA seguido por Tukey. <sup>a</sup> $p < 0,05$  comparado ao grupo controle.

\*AMTAC-17: (*E*)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxibenzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10*H*-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila.

\*\*DXR: Doxorrubicina

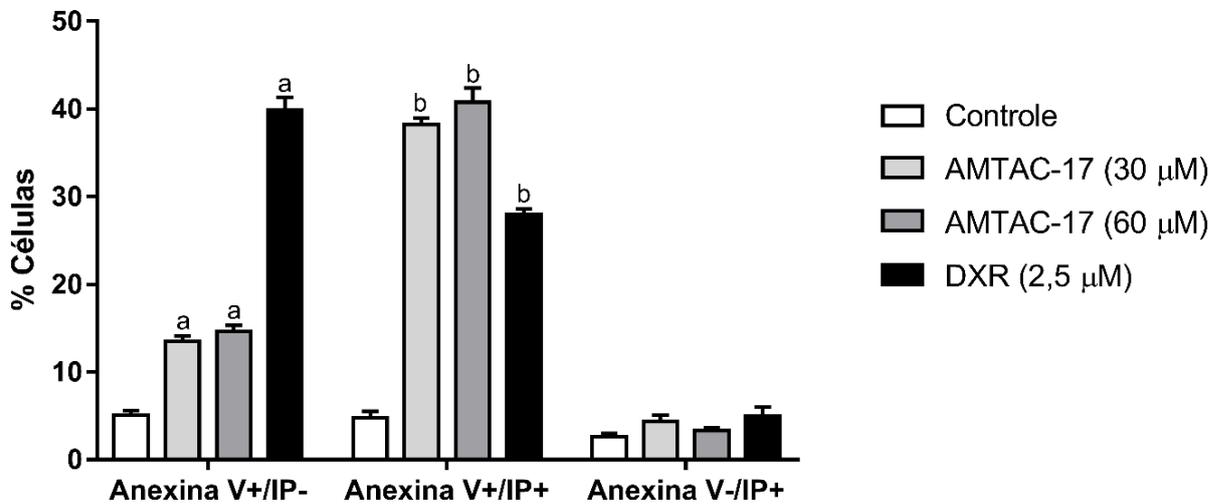
Como esperado, o tratamento com a droga padrão doxorrubicina induziu aumento significativo do pico sub-G1 ( $33,48 \pm 1,64\%$ ;  $p < 0,05$ ), com consequente diminuição na concentração de células em G0/G1 ( $47,84 \pm 1,92\%$ ;  $p < 0,05$ ), e um discreto aumento na porcentagem de células na fase G2/M ( $8,88 \pm 0,39\%$ ;  $p < 0,05$ ), em comparação aos seus respectivos controles.

### **5.1.3.2 Avaliação do mecanismo de morte celular**

#### **5.1.3.2.1 Avaliação dos efeitos de AMTAC-17 sobre a externalização da fosfatidilserina**

Após 48 horas, as duas concentrações de AMTAC-17 (30 e 60  $\mu\text{M}$ ) induziram aumento significativo no percentual de células marcadas apenas com Anexina V ( $13,49 \pm 0,61\%$  e  $14,65 \pm 0,68\%$ , respectivamente;  $p < 0,05$  para ambas), bem como marcadas com Anexina V e IP ( $38,27 \pm 0,71\%$  e  $40,76 \pm 1,65\%$ , respectivamente;  $p < 0,05$  para ambas), em comparação aos controles ( $5,09 \pm 0,50\%$ ;  $4,80 \pm 0,7\%$ , respectivamente). As células tratadas com a doxorrubicina também exibiram aumento quando marcadas apenas com Anexina V ( $39,93 \pm 1,39\%$ ;  $p < 0,05$ ) e também com Anexina V e IP ( $28,01 \pm 0,65\%$ ;  $p < 0,05$ ) em comparação aos controles (Figura 7). Por outro lado, não ocorreram diferenças significativas entre os diferentes grupos e o controle, em relação a marcação apenas com o IP.

**Figura 7.** Efeito de AMTAC-17\* e DXR\*\* sobre a marcação com Anexina V/IP em células HCT-116 após 48 horas de tratamento



Fonte: SILVA, 2020.

**Legenda:** Dados são expressos como média  $\pm$  e.p.m. de três experimentos independentes em triplicata analisados por ANOVA seguido por Tukey. <sup>a</sup> $p < 0,05$  comparado ao grupo controle Anexina V+/PI-; <sup>b</sup> $p < 0,05$  comparado ao grupo controle Anexina V+/PI+.

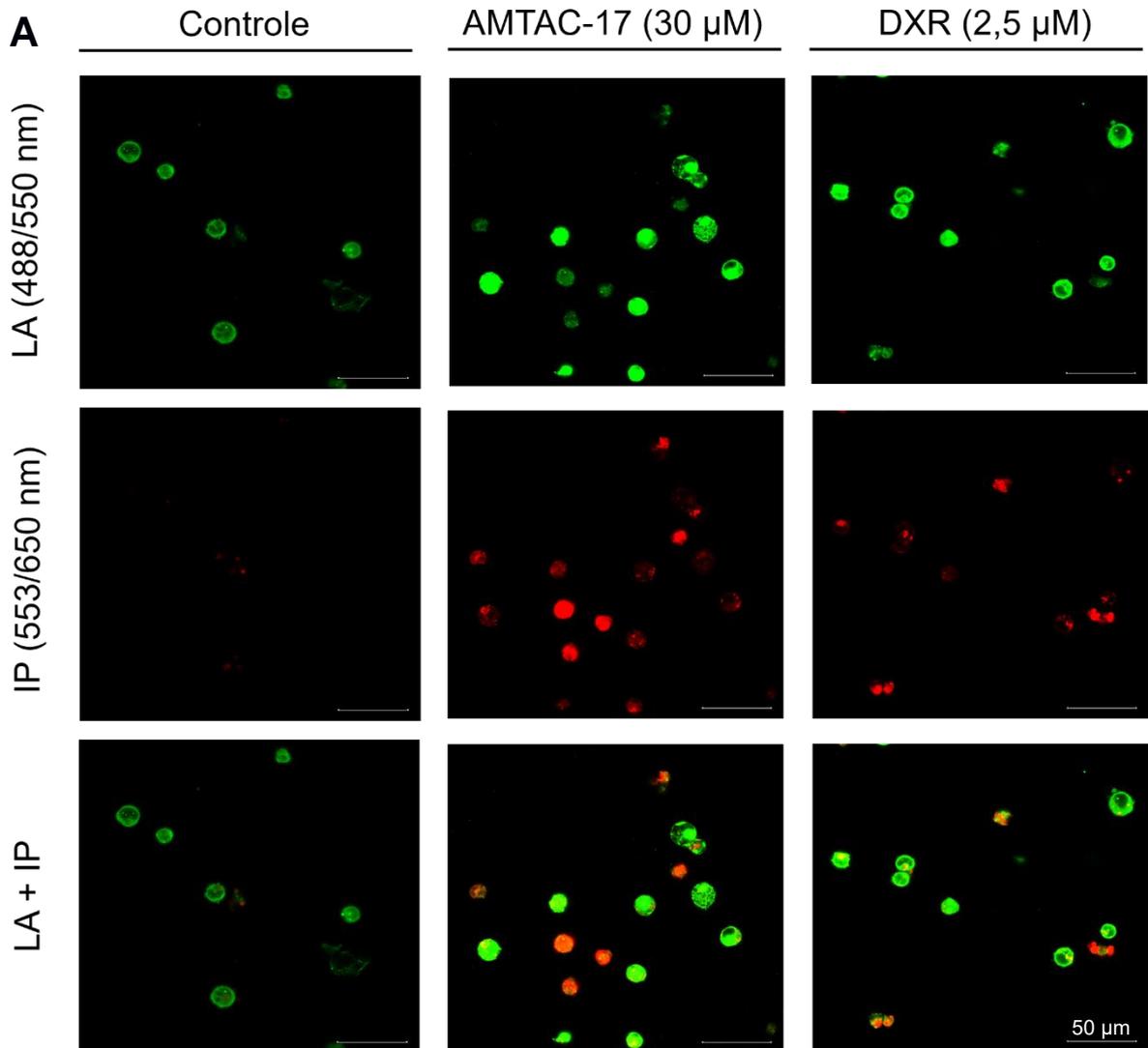
\*AMTAC-17: (E)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxibenzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila.

\*\*DXR: Doxorrubicina

### 5.1.3.2.2 Análise morfológica da apoptose

A Figura 9 mostra o efeito do AMTAC-17 (30 μM) e a doxorrubicina (2,5 μM) em células HCT-116 por 48 horas de tratamento. Observa-se que o AMTAC-17 e a doxorrubicina foram capazes de aumentar o número de células duplamente marcadas com LA e IP (Figura 8A), bem como exibiram características morfológicas da apoptose, como a formação de *blebs* na membrana, condensação de cromatina e fragmentação nuclear (setas, Figura 8B).

**Figura 8.** Efeito de AMTAC-17\* e DXR\*\* sobre a marcação com LA/IP em células HCT-116 após 48 horas de tratamento



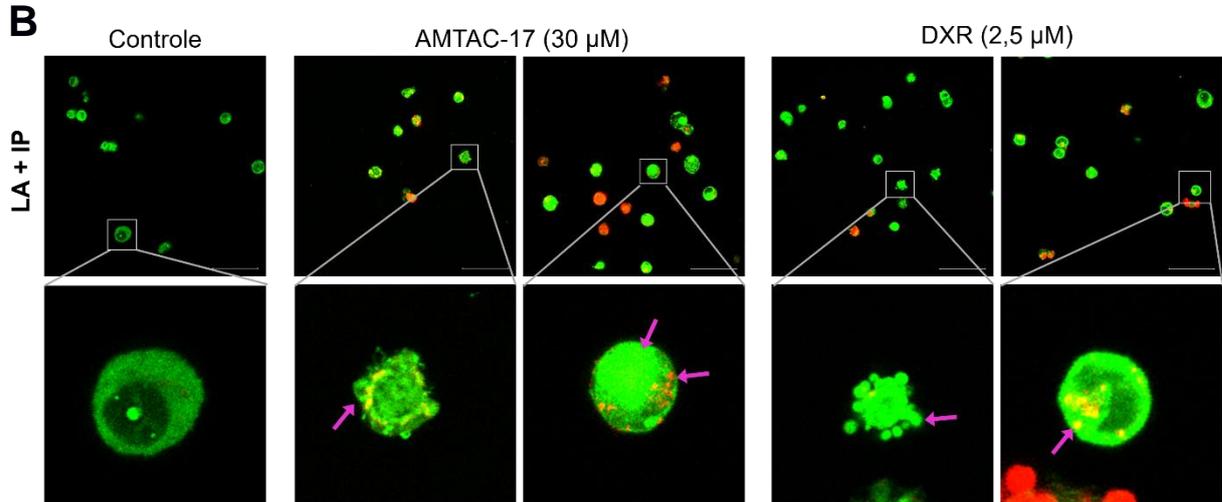
**Fonte:** SILVA, 2020.

**Legenda: A:** Imagens representativas de células HCT-116 após 48 horas de incubação com AMTAC-17 e a DXR como controle positivo. As células viáveis apresentam núcleo verde claro e uma estrutura intacta; as células apoptóticas iniciais exibem um núcleo verde claro mostrando condensação da cromatina; as células apoptóticas tardias mostram áreas alaranjadas densas (verde/vermelho) de condensação da cromatina e *blebs* de membrana; e as células necróticas parecem ter núcleo vermelho.

\*AMTAC-17: (*E*)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxibenzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10*H*-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila.

\*\*DXR: Doxorrubicina

**Figura 8.** Efeito de AMTAC-17\* e DXR\*\* sobre a marcação com LA/IP em células HCT-116 após 48 horas de tratamento (continuação)



Fonte: SILVA, 2020.

**Legenda: B:** Visualização de características morfológicas da apoptose em células HCT-116 após 48 horas de incubação com AMTAC-17 e a DXR como controle positivo. As setas em roxo indicam formação de *blebs* de membrana, condensação da cromatina e fragmentação nuclear.

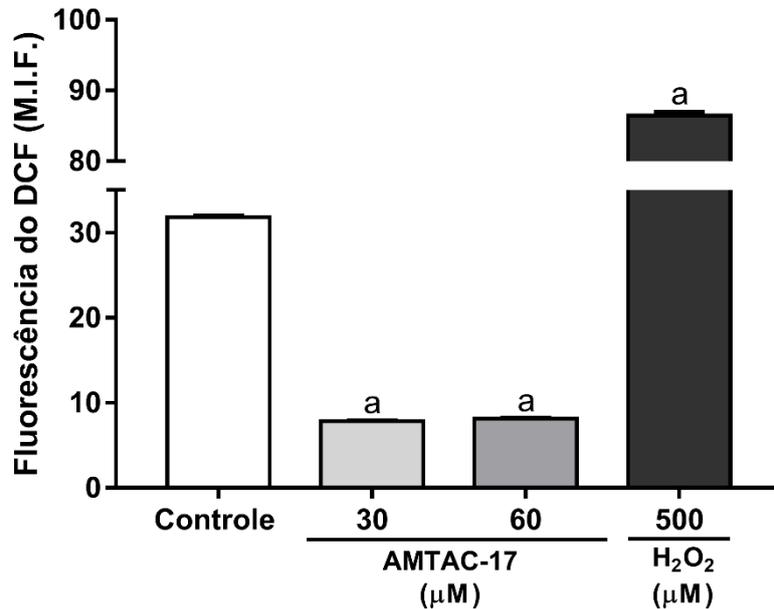
\*AMTAC-17: (*E*)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxibenzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10*H*-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila.

\*\*DXR: Doxorrubicina

### 5.1.3.3 Quantificação de espécies reativas de oxigênio

A Figura 9 representa o efeito do tratamento de 48 horas com o AMTAC-17 sobre a produção de EROs. Nas concentrações de 30 e 60 µM se observou diminuição significativa nos níveis de EROs, visualizado a partir da média da intensidade de fluorescência (M.I.F.) ( $7,84 \pm 0,08$  e  $8,12 \pm 0,14$ ;  $p < 0,05$  para ambos, respectivamente), em comparação ao controle ( $31,78 \pm 0,24$ ), enquanto que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentou aumento significativo ( $86,44 \pm 0,55$ ;  $p < 0,05$ ) em relação ao controle.

**Figura 9.** Efeito do AMTAC-17\* sobre produção de EROs em células HCT-116 após 48 horas de tratamento



Fonte: SILVA, 2020.

**Legenda:** Dados são expressos como média  $\pm$  e.p.m. de três experimentos independentes em triplicata analisados por ANOVA seguido por Tukey. <sup>a</sup> $p < 0,05$  comparado ao grupo controle. M.I.F.: Média da intensidade de fluorescência. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrogênio. DCF: 2',7'-diacetato diclorofluoresceína.

\*AMTAC-17: (*E*)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxibenzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10*H*-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila.

## 5.2 Estudos *in vivo*

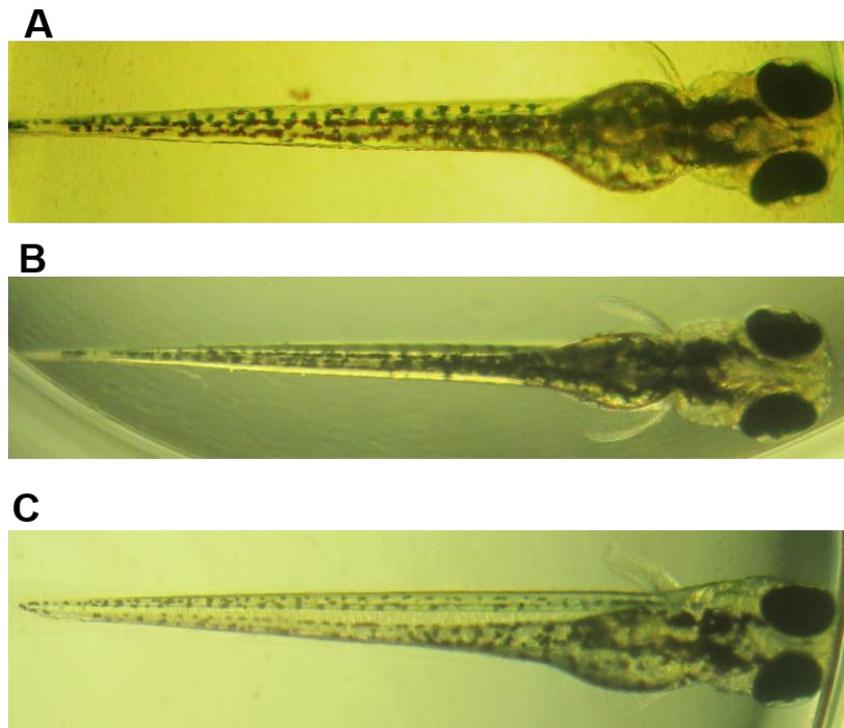
### 5.2.1 Estudos toxicológicos

#### 5.2.1.1 Avaliação da toxicidade aguda em embriões/larvas de peixe-zebra

O tratamento com o AMTAC-17 na concentração de 300  $\mu$ M não causou mortalidade significativa de embriões e larvas de peixe-zebra. Durante todo o período de observação (até 96 horas), nenhuma alteração relacionada aos pontos de letalidade ou qualquer modificação morfológica e de desenvolvimento foi observada nos embriões/larvas.

Os embriões/larvas dos controles (meio E3 ou DMSO a 0,5%) também não apresentaram nenhuma alteração durante o período de observação (Figura 10). Dado o exposto, é possível afirmar que a  $CL_{50}$  para 96 horas de exposição de embriões/larvas de peixe-zebra para o AMTAC-17 é maior que 300  $\mu$ M.

**Figura 10.** Larvas de peixe-zebra expostas ao AMTAC-17\* na concentração de 300  $\mu$ M, ou aos controles meio E3 e DMSO a 0,5% em 96 horas



**Fonte:** SILVA, 2020.

**Legenda:** Imagens representativas das larvas de peixe-zebra após 96 horas de exposição ao AMTAC-17 ou DMSO 0,5%. **A:** Controle (meio E3); **B:** Concentração de 300  $\mu$ M de AMTAC-17; **C:** DMSO a 0,5% em meio E3.

\*AMTAC-17: (E)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxibenzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

### 5.2.1.2 Avaliação da toxicidade não clínica aguda

No ensaio de toxicidade não clínica aguda foi observado que AMTAC-17 não provocou mortes na dose de 2000 mg/kg (i.p.). Entre os efeitos comportamentais avaliados, o único efeito observado foi constipação, que desapareceu após 4 horas

de tratamento (Tabela 3). De acordo com o guia n. 423/2001 da OECD, o valor de DL<sub>50</sub> foi estimado sendo maior que 5000 mg/kg.

**Tabela 3.** Efeitos da administração de dose única (i.p.) de AMTAC-17\* em camundongos

Grupos	Dose	M/T**	Efeitos comportamentais
Controle	-	0/3	Nenhum
AMTAC-17	2000 mg/kg	0/3	Constipação até 4 horas

Fonte: SILVA, 2020.

Controle: animais sadios tratados apenas com o veículo (12% de Tween 80 em solução salina).

\*AMTAC-17: (E)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxibenzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

\*\*M/T – Morte/Tratado

### 5.2.1.3 Avaliação da genotoxicidade

A Tabela 4 mostra o número de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos após tratamento com AMTAC-17 (2000 mg/kg) ou com ciclofosfamida (50 mg/kg). O AMTAC-17 não induziu aumento significativo do número de eritrócitos micronucleados em sangue periférico ( $10,67 \pm 1,11$ ) quando comparado ao grupo controle ( $9,50 \pm 0,76$ ). Como esperado, a ciclofosfamida induziu aumento no número de eritrócitos micronucleados ( $18,40 \pm 0,52$ ;  $p < 0,05$ ), em comparação ao grupo controle.

**Tabela 4.** Efeito da administração de dose única (i.p.) de AMTAC-17\* e ciclofosfamida no número de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos após 48 horas do tratamento

Grupos	Dose (mg/kg)	Número de eritrócitos micronucleados
Controle	-	9,50 ± 0,76
AMTAC-17	2000	10,67 ± 1,11
Ciclofosfamida	50	18,40 ± 0,52 <sup>a</sup>

Fonte: SILVA, 2020.

**Legenda:** Dados apresentados como média ± e.p.m. de seis animais analisados por ANOVA seguido de Tukey. <sup>a</sup> $p < 0,05$  comparado ao grupo controle. Controle: animais saudáveis tratados apenas com o veículo (12% de Tween 80 em solução salina).

\*AMTAC-17: (E)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxibenzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

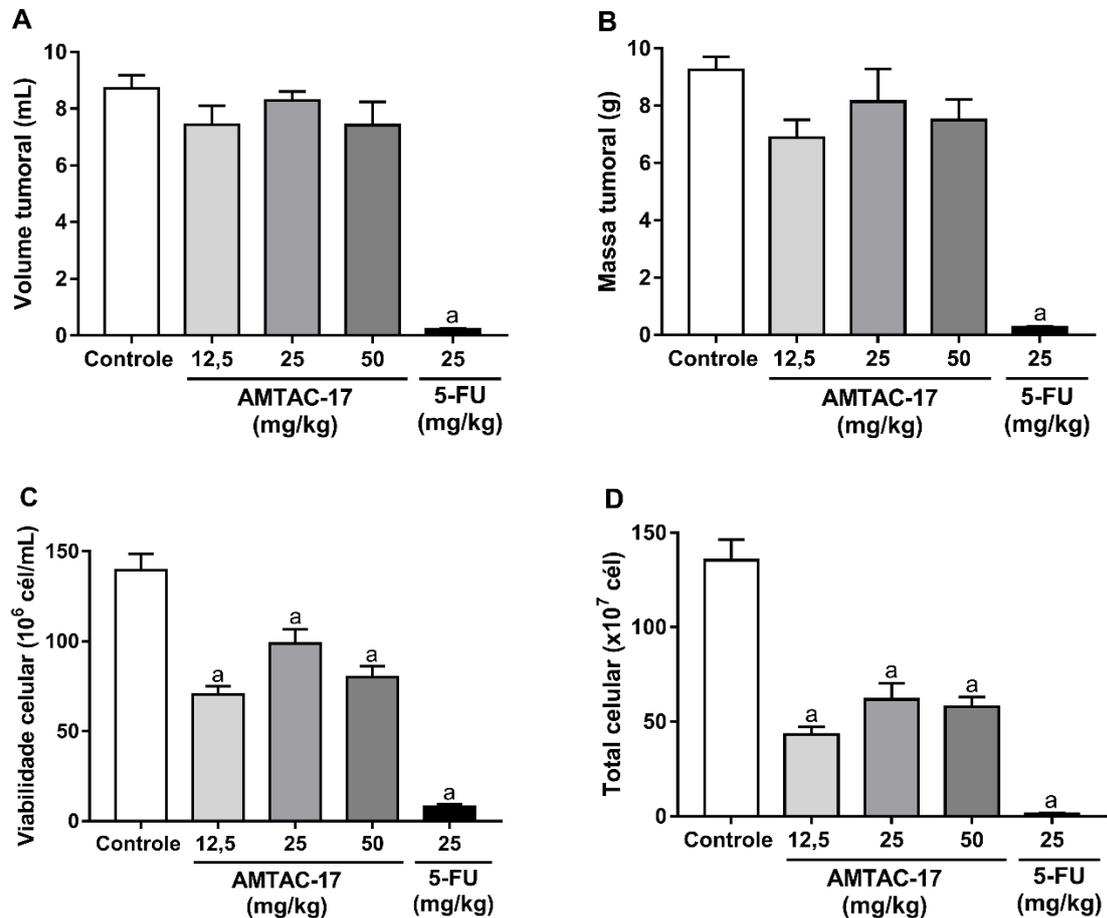
## 5.2.2 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich

### 5.2.2.1 Volume do tumor, massa tumoral, viabilidade e total celular

Com o tratamento de sete dias com AMTAC-17 não ocorreu redução significativa do volume tumoral, bem como da massa tumoral nas doses testadas (12,5; 25 e 50 mg/kg), em comparação ao grupo controle transplantado (Figura 11A e B).

Considerando o parâmetro viabilidade celular, o tratamento com AMTAC-17 promoveu significativa redução nas doses de 12,5 mg/kg ( $70,50 \pm 4,50 \times 10^6$  células/mL;  $p < 0,05$ ), 25 mg/kg ( $98,7 \pm 8,07 \times 10^6$  células/mL;  $p < 0,05$ ) e 50 mg/kg ( $80,17 \pm 6,00 \times 10^6$  células/mL;  $p < 0,05$ ), quando comparados ao grupo controle ( $139,42 \pm 9,13 \times 10^6$  células/mL), não apresentando diferenças significantes entre as doses (Figura 11C).

**Figura 11.** Efeitos do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-17\* e 5-FU\*\* em camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich



Fonte: SILVA, 2020.

**Legenda:** **A:** volume tumoral; **B:** massa tumoral; **C:** viabilidade celular; **D:** total celular. Dados apresentados como média  $\pm$  e.p.m. de oito animais analisados por ANOVA seguido de Tukey. <sup>a</sup> $p < 0,05$  comparado ao grupo controle. Controle: animais transplantados com o tumor e tratados apenas com o veículo (12% de Tween 80 em solução salina).

\*AMTAC-17: (E)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxibenzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

\*\*5-FU: 5-fluorouracila

Em relação ao total celular, AMTAC-17 também promoveu redução significativa nas três doses testadas (12,5 mg/kg:  $43,32 \pm 3,99 \times 10^7$  células; 25 mg/kg:  $61,81 \pm 8,66 \times 10^7$  células; e 50 mg/kg:  $57,97 \pm 5,27 \times 10^7$  células;  $p < 0,05$  para todos), quando comparados ao grupo controle ( $135,47 \pm 10,95 \times 10^7$  células). De forma semelhante

ao observado para a viabilidade celular, não houve diferença significativa no efeito induzido pelas diferentes doses testadas (Figura 11D).

O grupo tratado com o 5-FU, como esperado, induziu redução significativa de todos os parâmetros avaliados (volume tumoral:  $0,22 \pm 0,04$  mL; massa tumoral:  $0,25 \pm 0,05$  g; viabilidade celular:  $8,00 \pm 1,43 \times 10^6$  células/mL; e total celular:  $1,41 \pm 0,30 \times 10^7$  células;  $p < 0,05$  para todos), em relação ao grupo controle.

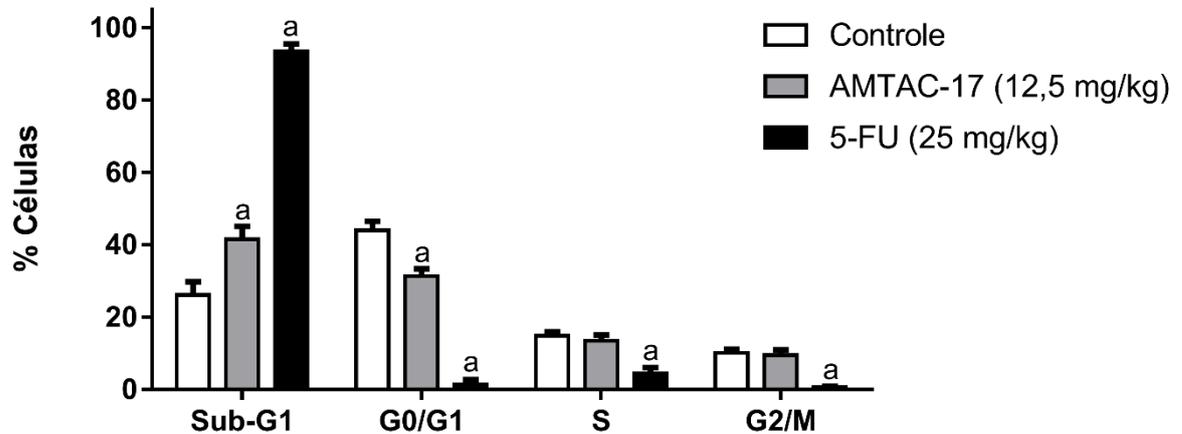
### **5.2.3 Investigação do mecanismo de ação antitumoral *in vivo***

#### **5.2.3.1 Análise do ciclo celular**

Na análise do ciclo celular, o AMTAC-17 (12,5 mg/kg) induziu aumento no pico sub-G1 para  $41,48 \pm 2,59\%$  ( $p < 0,05$ ), associado a uma diminuição na fase G0/G1 para  $31,30 \pm 2,06\%$  ( $p < 0,05$ ), quando comparados com o grupo controle transplantado com o tumor ( $26,16 \pm 2,77\%$  e  $43,98 \pm 2,51\%$ , respectivamente) (Figura 12).

O tratamento com a droga padrão 5-FU também promoveu aumento significativo do pico sub-G1 ( $93,43 \pm 0,84\%$ ;  $p < 0,05$ ), ao passo que reduziu a porcentagem de células nas fases G0/G1 ( $1,36 \pm 0,57\%$ ;  $p < 0,05$ ), S ( $4,40 \pm 0,69\%$ ;  $p < 0,05$ ) e G2/M ( $0,68 \pm 0,07\%$ ;  $p < 0,05$ ), em comparação aos seus respectivos controles ( $23,34 \pm 2,77\%$ ;  $43,98 \pm 2,51\%$ ;  $14,85 \pm 1,14\%$  e  $10,13 \pm 1,04\%$ , respectivamente).

**Figura 12.** Efeito do tratamento de sete dias com AMTAC-17\* e 5-FU\*\* na distribuição de células de carcinoma ascítico de Ehrlich nas diferentes fases do ciclo celular



**Fonte:** SILVA, 2020.

**Legenda:** Dados apresentados como média  $\pm$  e.p.m. de oito animais analisados por ANOVA seguido de Tukey. <sup>a</sup> $p < 0,05$  comparado ao grupo controle. Controle: animais transplantados com o tumor e tratados apenas com o veículo (12% de Tween 80 em solução salina).

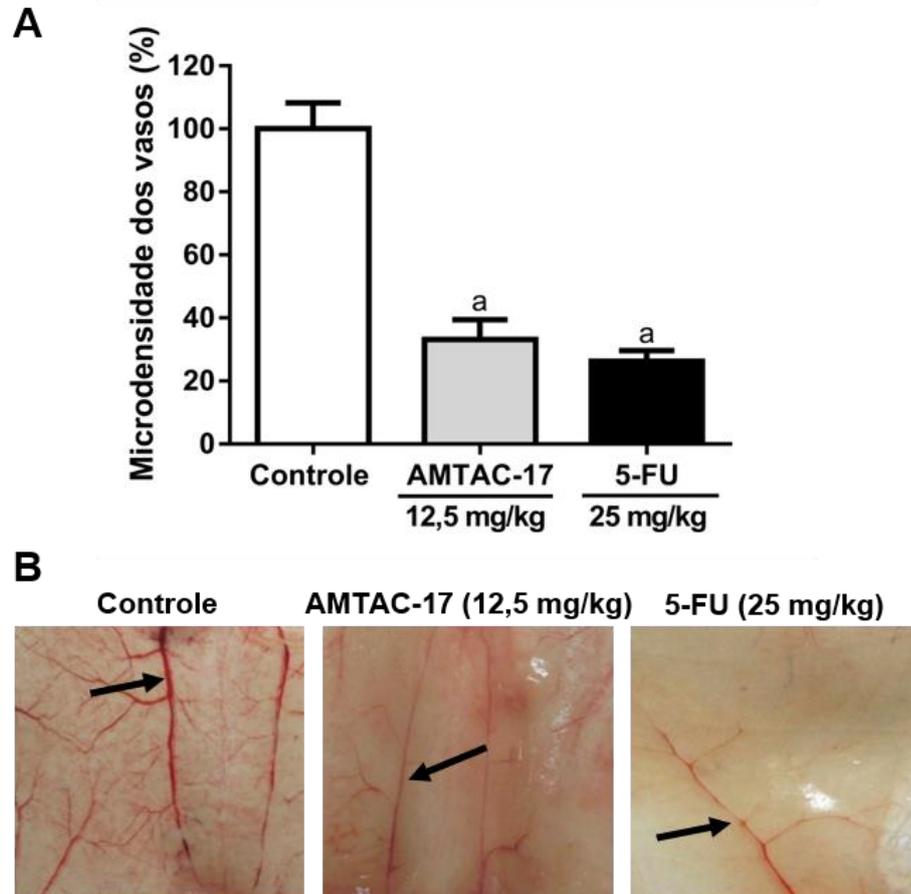
\*AMTAC-17: (E)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxibenzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

\*\*5-FU: 5-fluorouracila

### 5.2.3.2 Avaliação do efeito antiangiogênico

O tratamento com AMTAC-17 (12,5 mg/kg) promoveu redução significativa da microdensidade dos vasos tumorais ( $33,16 \pm 6,30\%$ ;  $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo controle ( $100,00 \pm 8,27\%$ ), assim como foi observado no grupo tratado com a droga padrão 5-FU ( $26,26 \pm 1,63\%$ ;  $p < 0,05$ ) (Figura 13A). Na Figura 13B é possível observar imagens representativas da microdensidade dos vasos dos diferentes grupos testados.

**Figura 13.** Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-17\* e 5-FU\*\* na microdensidade dos vasos peritoneais de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich



**Fonte:** SILVA, 2020.

**Legenda:** **A:** Microdensidade dos vasos (%). Determinado pela área ocupada por vasos sanguíneos divididos pela área total selecionada. Figuras foram cortadas em tamanho padrão (1 cm x 1 cm). **B:** Imagens representativas de membrana peritoneal dos camundongos submetidos aos diferentes tratamentos. Dados apresentados como média  $\pm$  e.p.m. de oito animais analisados por ANOVA seguido de Tukey. <sup>a</sup> $p < 0,05$  comparado ao grupo controle. Controle: animais transplantados com o tumor e tratados apenas com o veículo (12% de Tween 80 em solução salina).

\*AMTAC-17: (E)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxibenzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

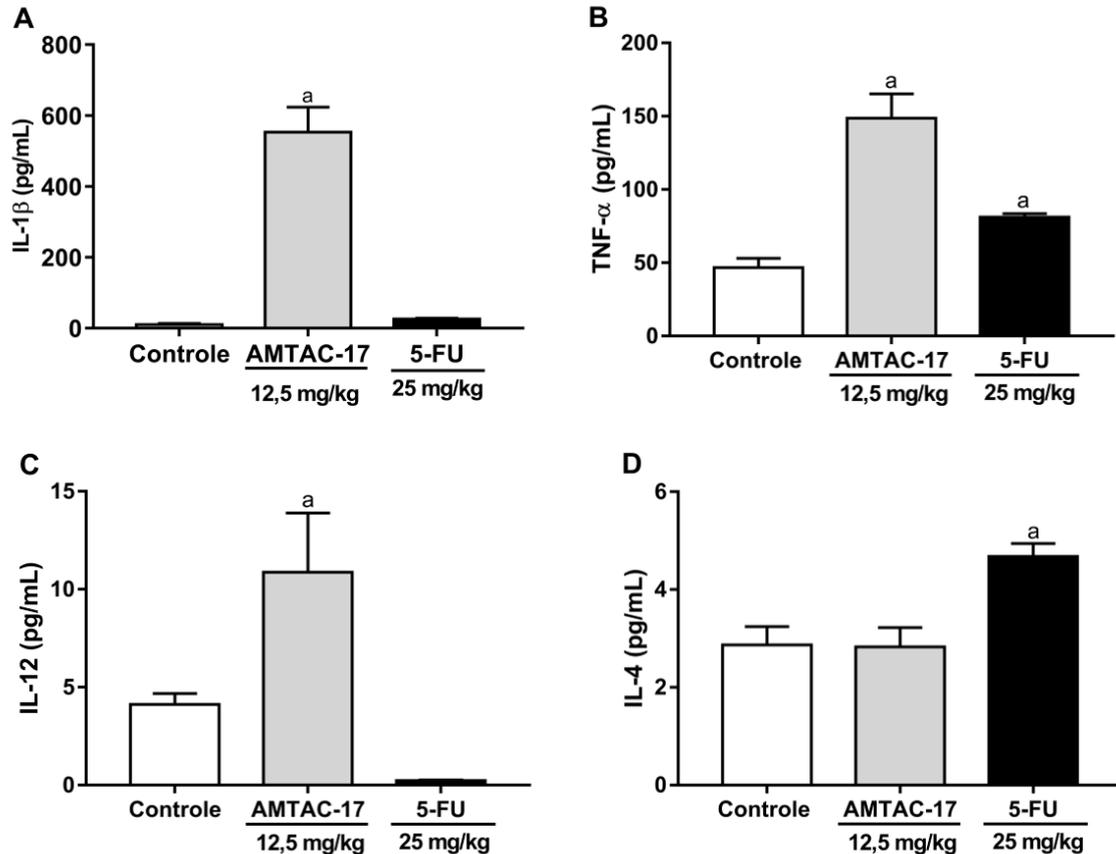
\*\*5-FU: 5-fluorouracila

### 5.2.3.3 Quantificação das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-4 e TNF- $\alpha$

O tratamento com o AMTAC-17 (12,5 mg/kg) induziu aumento nos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  ( $553,12 \pm 70,57$  pg/mL;  $p < 0,05$ ) (Figura 14A), TNF- $\alpha$  ( $148,53 \pm 16,67$  pg/mL;  $p < 0,05$ ) (Figura 14B) e IL-12 ( $10,86 \pm 3,03$  pg/mL;  $p < 0,05$ ) (Figura 14C), quando comparadas ao grupo controle ( $10,08 \pm 3,57$  pg/mL,  $46,59 \pm 6,43$  pg/mL,  $4,12 \pm 0,84$  pg/mL, respectivamente). Não foram observadas diferenças significantes nos níveis de IL-4 após o tratamento com AMTAC-17 (Figura 14D).

Nos animais tratados com o 5-FU, foi observado aumento nos níveis de TNF- $\alpha$  ( $81,14 \pm 2,52$  pg/mL;  $p < 0,05$ ) e IL-4 ( $4,67 \pm 0,26$  pg/mL;  $p < 0,05$ ) (Figura 14). O 5-FU não promoveu alterações significativas nos níveis de IL-1 $\beta$  e IL-12 quando comparados aos seus respectivos controles.

**Figura 14.** Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-17\* e 5-FU\*\* na concentração de citocinas no lavado peritoneal de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich



Fonte: SILVA, 2020.

**Legenda:** A: IL-1 $\beta$ , B: TNF- $\alpha$ , C: IL-12, D: IL-4. Dados apresentados como média  $\pm$  e.p.m. de cinco animais analisados por ANOVA seguido de Tukey. <sup>a</sup> $p < 0,05$  comparado ao grupo controle. Controle: animais transplantados com o tumor e tratados apenas com o veículo (12% de Tween 80 em solução salina).

\*AMTAC-17: (E)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxibenzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

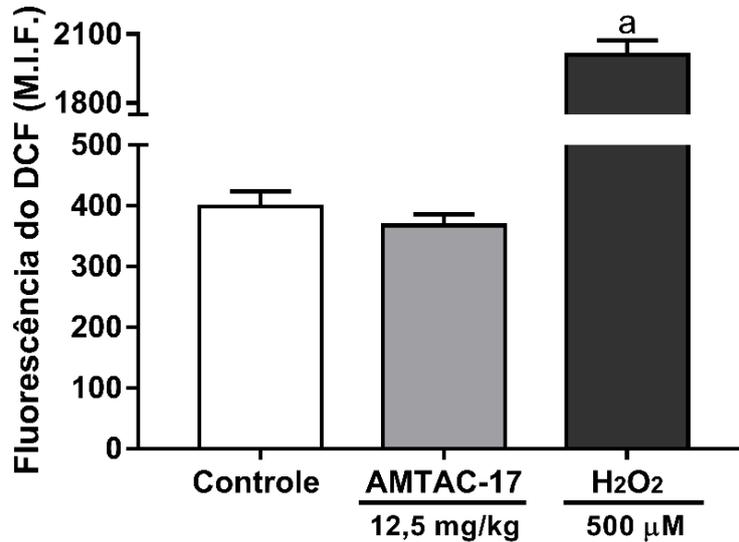
\*\*5-FU: 5-fluorouracila

#### 5.2.3.4 Quantificação de espécies reativas de oxigênio

A Figura 15 representa o efeito do tratamento de sete dias com AMTAC-17 (12,5 mg/kg) sobre a produção de EROs em modelo de tumor ascítico de Ehrlich.

Pode-se observar que AMTAC-17 não induziu alterações na produção de EROs em relação ao grupo controle.

**Figura 15.** Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-17\* na produção de EROs em modelo de tumor de Ehrlich



Fonte: SILVA, 2020.

**Legenda:** Dados apresentados como média  $\pm$  e.p.m. de oito animais analisados por ANOVA seguido de Tukey. <sup>a</sup> $p < 0,05$  comparado ao grupo controle. Controle: animais transplantados com o tumor e tratados apenas com o veículo (12% de Tween 80 em solução salina). M.I.F.: Média da intensidade de fluorescência. DCF: 2',7'-diacetato diclorofluoresceína. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrogênio.

\*AMTAC-17: (E)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxibenzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

## 5.2.4 Avaliação da toxicidade em animais transplantados com células de carcinoma ascítico de Ehrlich

### 5.2.4.1 Avaliação ponderal e do consumo de água e de ração

Na Tabela 5 estão expressos os valores referentes ao consumo de água e de ração, assim como a evolução ponderal dos animais tratados com AMTAC-17 (12,5 mg/kg) e com a droga padrão 5-FU (25 mg/kg).

De acordo com os dados obtidos, não foram observadas alterações significativas do consumo de água e de ração, e na evolução ponderal dos animais tratados com AMTAC-17 (12,5 mg/kg). Com relação do grupo 5-FU, também não ocorreram alterações nos parâmetros avaliados.

**Tabela 5.** Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-17\* (12,5 mg/kg) e 5-FU\*\* (25 mg/kg) no consumo de água e de ração, e evolução ponderal de camundongos transplantedos com carcinoma ascítico de Ehrlich

Grupos	Consumo de água (mL)	Consumo de ração (g)	Peso inicial (g)	Peso final (g)
Controle	40,07 ± 3,65	32,67 ± 6,51	29,30 ± 0,6	35,30 ± 1,6
AMTAC-17	46,67 ± 4,94	48,83 ± 6,95	28,56 ± 0,4	31,44 ± 1,2
5-FU	37,50 ± 2,14	25,21 ± 0,76	30,67 ± 1,00	28,67 ± 0,33

Fonte: SILVA, 2020.

**Legenda:** Dados apresentados como média ± erro padrão da média de oito animais, analisados por ANOVA seguido por Tukey. <sup>a</sup> $p < 0,05$  comparado ao grupo controle. Controle: animais transplantedos com o tumor e tratados apenas com o veículo (12% de Tween 80 em solução salina).

\*AMTAC-17: (E)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxibenzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

\*\*5-FU: 5-fluorouracila

#### 5.2.4.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos

A investigação dos efeitos toxicológicos de AMTAC-17 (12,5 mg/kg) com respeito aos parâmetros bioquímicos revelou uma diminuição significativa nos níveis das enzimas AST ( $67,00 \pm 4,66$  U/L;  $p < 0,05$ ) e ALT ( $66,99 \pm 5,75$  U/L;  $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo controle ( $120,50 \pm 17,03$  U/L e  $106,30 \pm 14,20$  U/L, respectivamente), porém, apenas os níveis de ALT apresentaram redução em comparação ao grupo sadio ( $104,19 \pm 11,46$  U/L) (Tabela 6). Não foram observadas diferenças nos parâmetros ureia e creatinina após tratamento com AMTAC-17 (12,5 mg/kg).

O grupo tratado com a droga padrão 5-FU promoveu aumento nos níveis de AST ( $118,10 \pm 2,30$  U/L;  $p < 0,05$ ) com relação ao grupo sadio, e de Creatinina ( $4,69 \pm 0,07$  U/L;  $p < 0,05$ ), em relação ao controle transplantado e ao grupo sadio (Tabela 6).

**Tabela 6.** Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-17\* e 5-FU\*\* nos parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich

Grupos	Dose (mg/kg)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
Grupo Sadio	-	$88,39 \pm 8,17$	$104,19 \pm 11,46$	$41,60 \pm 4,11$	$0,92 \pm 0,04$
Controle	-	$120,50 \pm 17,03$	$106,30 \pm 14,20$	$45,50 \pm 6,6$	$1,03 \pm 0,15$
AMTAC-17	12,5	$67,00 \pm 4,66^a$	$66,99 \pm 5,75^{a,b}$	$43,10 \pm 6,2$	$1,04 \pm 0,07$
5-FU	25	$118,10 \pm 2,30^b$	$109,98 \pm 3,33$	$44,92 \pm 2,50$	$4,69 \pm 0,07^{a,b}$

Fonte: SILVA, 2020.

**Legenda:** Dados apresentados como média  $\pm$  e.p.m. de oito animais, analisados por ANOVA seguido por Tukey. <sup>a</sup> $p < 0,05$  comparado ao grupo controle. <sup>b</sup> $p < 0,05$  comparado ao grupo sadio. Controle: animais transplantados com o tumor e tratados apenas com o veículo (12% de Tween 80 em solução salina). Grupo sadio: animais sem tumor de Ehrlich (saudáveis), submetidos as mesmas condições experimentais.

\*AMTAC-17: (E)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxibenzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

\*\*5-FU: 5-fluorouracila

Na Tabela 7 estão expressos os valores dos parâmetros hematológicos de sangue periférico dos animais após sete dias de tratamento com AMTAC-17 (12,5 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg). Pode-se observar que não foram identificadas alterações significativas em nenhum dos parâmetros do eritrograma e leucograma nos animais tratados com AMTAC-17, quando comparados ao grupo controle transplantado. Contudo, ocorreu alterações nos níveis de CHCM ( $40,12 \pm 1,41$  g/dL) e aumento na porcentagem de neutrófilos ( $13,00 \pm 1,92\%$ ), quando comparados aos animais sadios ( $19,60 \pm 1,26$  g/dL;  $2,00 \pm 0,29\%$ , respectivamente).

**Tabela 7.** Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-17\* (12,5 mg/kg) e 5-FU\*\* (25 mg/kg) nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich

Parâmetro	Grupo sadio	Controle	AMTAC-17 (12,5 mg/kg)	5-FU (25 mg/kg)
Eritrócitos ( $10^6/\text{mm}^3$ )	6,57 ± 0,21	6,91 ± 0,75	5,42 ± 0,49	7,45 ± 0,64
Hemoglobina (g/dL)	12,96 ± 0,39	12,54 ± 1,03	10,53 ± 0,85	13,45 ± 1,27
Hematócrito (%)	35,81 ± 1,24	34,29 ± 3,85	28,50 ± 4,04	43,08 ± 3,97
VCM ( $\text{fm}^3$ )	54,26 ± 1,24	49,89 ± 2,52	51,90 ± 3,95	56,12 ± 2,52
HCM (pg)	19,65 ± 0,33	18,46 ± 0,57	19,56 ± 0,70	17,89 ± 0,35
CHCM (g/dL)	19,60 ± 1,26	37,63 ± 2,30 <sup>b</sup>	40,12 ± 1,41 <sup>b</sup>	47,98 ± 2,60 <sup>a,b</sup>
Leucócitos totais ( $10^3/\text{mm}^3$ )	11,58 ± 0,82	12,07 ± 2,36	8,30 ± 1,46	5,25 ± 0,27 <sup>a,b</sup>
Linfócitos (%)	81,38 ± 3,43	78,43 ± 3,31	78,00 ± 3,69	94,54 ± 1,10 <sup>a</sup>
Neutrófilos (%)	2,00 ± 0,29	13,00 ± 1,92 <sup>b</sup>	13,43 ± 2,21 <sup>b</sup>	6,30 ± 0,87 <sup>a,b</sup>
Monócitos (%)	5,42 ± 0,64	8,85 ± 1,58	8,57 ± 1,51	0,71 ± 0,31 <sup>a,b</sup>
Eosinófilos (%)	2,00 ± 0,30	1,87 ± 0,39	2,00 ± 0,31	2,00 ± 0,26

Fonte: SILVA, 2020.

**Legenda:** Dados apresentados como média ± e.p.m. de oito animais, analisados por ANOVA seguido por Tukey. <sup>a</sup> $p < 0,05$  comparado ao grupo controle. <sup>b</sup> $p < 0,05$  comparado ao grupo sadio. Controle: animais transplantados com o tumor e tratados apenas com o veículo (12% de Tween 80 em solução salina). Grupo sadio: animais sem tumor de Ehrlich (saudáveis), submetidos as mesmas condições experimentais.

\*AMTAC-17: (E)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxibenzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

\*\*5-FU: 5-fluorouracila

O tratamento com a droga padrão 5-FU causou alterações em diferentes parâmetros, com aumento significativo no CHCM ( $47,98 \pm 2,60$  g/dL;  $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle ( $37,63 \pm 2,30$  g/dL) e ao grupo sadio ( $19,60 \pm 1,26$  g/dL), além de reduções significativas da contagem de leucócitos totais e dos percentuais de neutrófilos e monócitos ( $5,25 \pm 0,27$   $10^3/\text{mm}^3$ ;  $6,30 \pm 0,87\%$ ;  $0,71 \pm 0,31\%$ , respectivamente;  $p < 0,05$  para todos), quando comparado ao grupo controle ( $12,07 \pm$

2,36  $10^3/\text{mm}^3$ ;  $13,00 \pm 1,92\%$ ;  $8,85 \pm 1,58\%$ , respectivamente) e ao grupo sadio ( $11,58 \pm 0,82 \cdot 10^3/\text{mm}^3$ ;  $2,00 \pm 0,29\%$ ;  $5,42 \pm 0,64\%$ , respectivamente). Ainda, o tratamento com 5-FU causou aumento significativo no percentual de linfócitos ( $94,54 \pm 1,10\%$ ;  $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo controle ( $78,43 \pm 3,31\%$ ).

#### 5.2.4.3 Avaliação dos índices dos órgãos

O tratamento com AMTAC-17 ou a droga padrão 5-FU não induziram alterações significativas nos índices de coração, baço, timo, fígado e rins (Tabela 8).

**Tabela 8.** Índices dos órgãos de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich após tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-17\* (12,5 mg/kg) e 5-FU\*\* (25 mg/kg)

Grupos	Índice de coração (mg/g)	Índice de fígado (mg/g)	Índice de rins (mg/g)	Índice de baço (mg/g)	Índice de timo (mg/g)
Controle	$4,20 \pm 0,30$	$65,40 \pm 2,10$	$12,70 \pm 0,40$	$5,20 \pm 0,50$	$3,00 \pm 0,40$
AMTAC-17	$3,30 \pm 0,50$	$76,00 \pm 4,40$	$12,40 \pm 0,80$	$7,10 \pm 1,10$	$2,70 \pm 0,30$
5-FU	$4,32 \pm 0,33$	$63,86 \pm 1,30$	$11,20 \pm 0,37$	$4,0 \pm 0,14$	$2,30 \pm 0,20$

Fonte: SILVA, 2020.

**Legenda:** Dados apresentados como média  $\pm$  e.p.m. de oito animais, analisados por ANOVA seguido por Tukey. <sup>a</sup> $p < 0,05$  comparado ao grupo controle. Controle: animais transplantados com o tumor e tratados apenas com o veículo (12% de Tween 80 em solução salina).

\*AMTAC-17: (E)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxibenzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

\*\*5-FU: 5-fluorouracila

#### 5.2.4.4 Análises histológicas

Para uma avaliação mais detalhada dos possíveis efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos dos animais tratados com o AMTAC-17 (12,5 mg/kg), análises histopatológicas em HE (hematoxilina e eosina) e tricrômio de Masson foram realizadas (Figura 16).

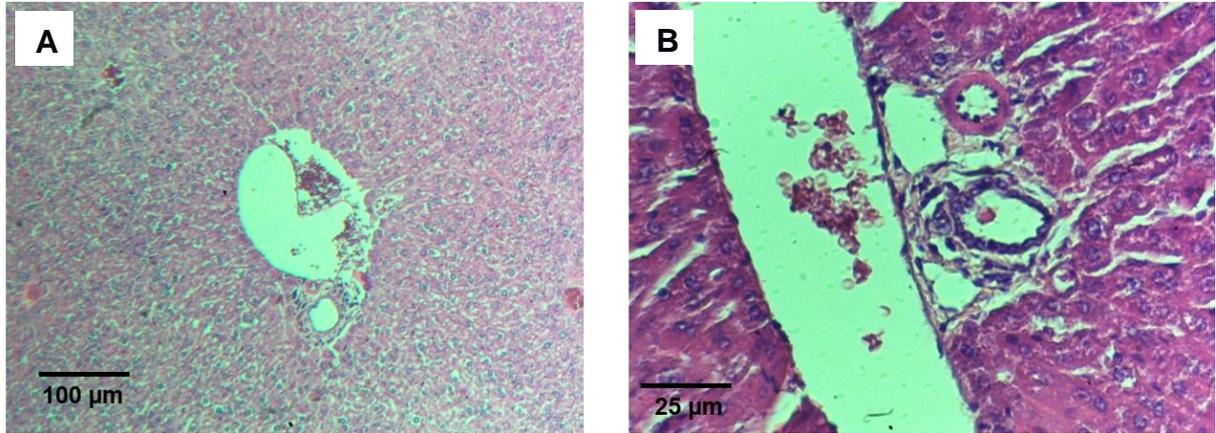
Ao exame de microscopia de luz, os fígados corados em HE dos animais do grupo sadio (sem tumor de Ehrlich, porém submetidos as mesmas condições experimentais) apresentaram arquitetura hepática bem conservada com presença da tríade portal (ramo da veia porta, da artéria hepática e o ducto biliar), hepatócitos poligonais uni ou binucleados permaneceram inalterados, organizados em cordões direcionados para as veias hepáticas terminais, de paredes finas (Figura 16A e B).

Em contrapartida, quando os animais do grupo controle transplantado foram avaliados, foram observadas visíveis lesões reversíveis, do tipo esteatose micro e macrogoticular, caracterizadas pelos inúmeros vacúolos esbranquiçados no citoplasma do hepatócito (Figura 16C e F), uma quantidade moderada de vasos congestos (Figura 16D), e aumento do número das células de Kupffer (Figura 16E), porém os espaços portais estavam regularmente distribuídos com a presença da tríade vículo-biliar habitual, cordões hepáticos inalterados e não foi encontrado necrose de hepatócitos, nem atipias celulares e infiltrado inflamatório.

Os animais tratados com o antineoplásico 5-FU apresentaram arquitetura lobular preservada, com células de Kupffer e sinusoides hepáticos morfologicamente preservados (Figura 16G), mas pode ser observado discreto infiltrado linfoplasmocitário e raros hepatócitos necrosados com núcleo picnótico em algumas áreas no tecido (Figura 16H).

Quando avaliados os fígados dos animais tratados com o AMTAC-17, pode-se observar a presença moderada de infiltrado linfoplasmocitário ao longo do tecido (Figura 16J) e na cápsula de Glisson (Figura 16L), uma discreta esteatose hepática microgoticular (Figura 16K), porém, os animais deste grupo não apresentaram células necróticas nem atípicas. As demais características morfológicas em relação a tríade portal, cordões de hepatócitos, células de Kupffer e arquitetura hepática se mantiveram inalteradas, semelhante ao grupo sadio (Figura 16I).

**Figura 16.** Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-17\* (12,5 mg/kg) e 5-FU\*\* (25 mg/kg) na histologia do fígado de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich



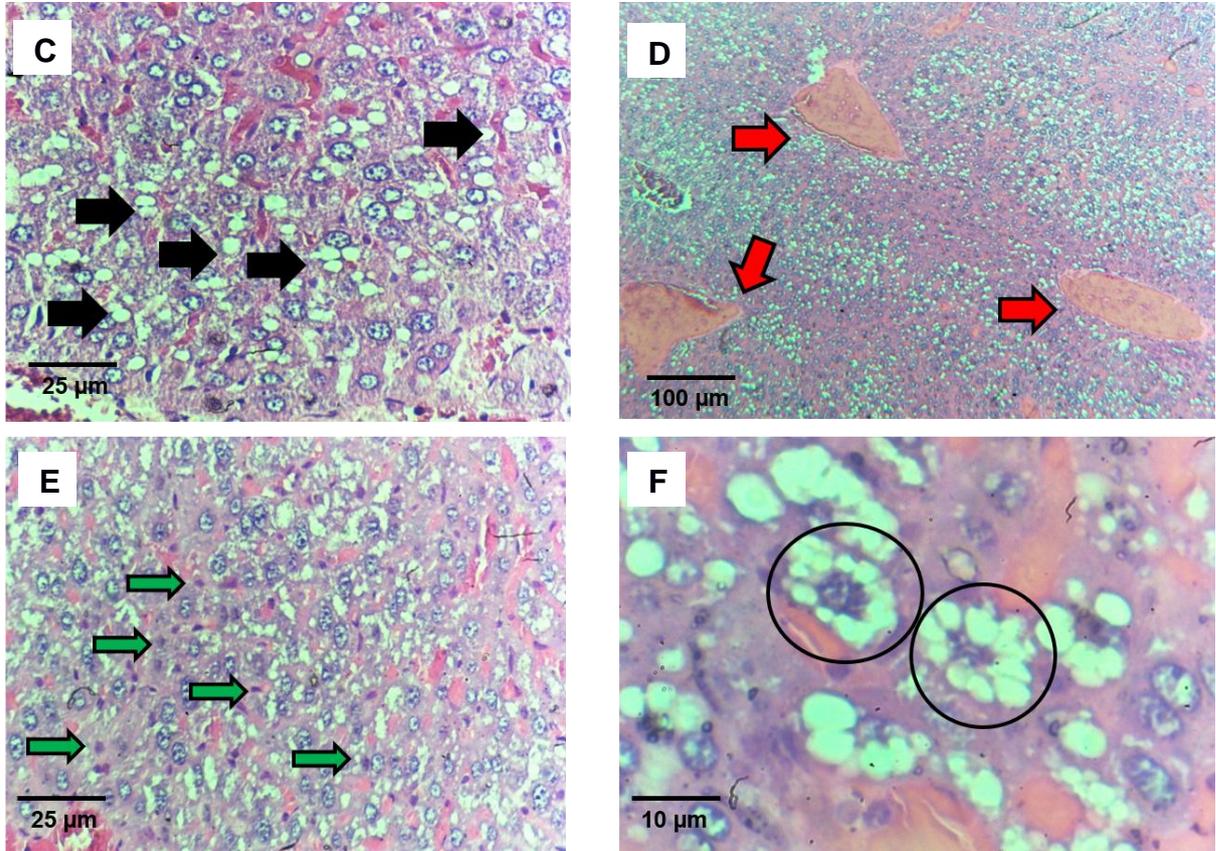
**Fonte:** SILVA, 2020.

**Legenda:** Histopatologia do fígado. **Grupo sadio** (Figura 17A e B). **A-B:** Arquitetura dos cordões hepáticos. Grupo sadio: animais sem tumor de Ehrlich, submetidos as mesmas condições experimentais.

\*AMTAC-17: (*E*)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxibenzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10*H*-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

\*\*5-FU: 5-fluorouracila

**Figura 16.** Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-17\* (12,5 mg/kg) e 5-FU\*\* (25 mg/kg) na histologia do fígado de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich (continuação)



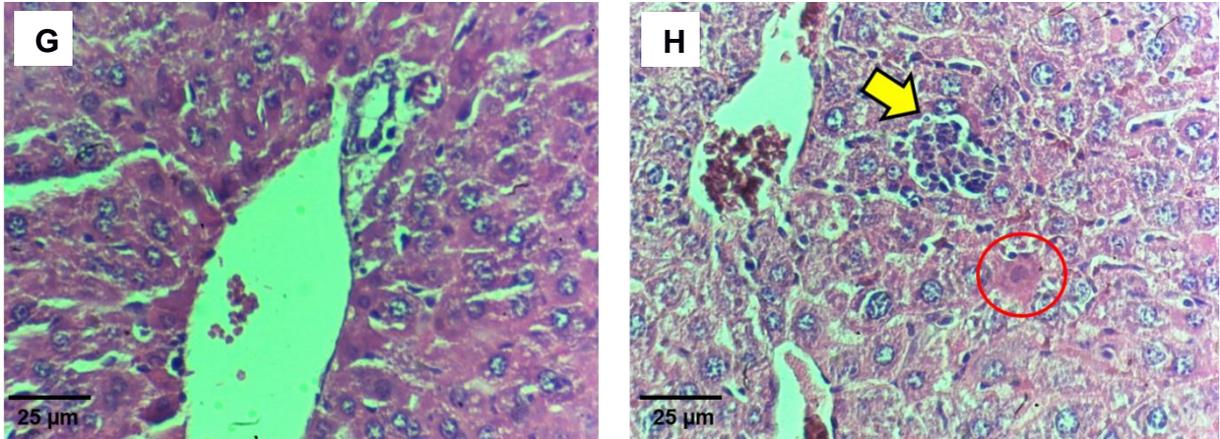
Fonte: SILVA, 2020.

**Legenda:** Histopatologia do fígado. **Grupo controle transplantado** (Figura 17C, D, E e F). **C:** esteatose hepática (seta preta - HE 400X); **D:** Congestão vascular (seta vermelha - HE 100X); **E:** célula de Kupffer (seta verde - HE 100X). **F:** esteatose hepática microgoticular (círculo preto - HE 1000X).

\*AMTAC-17: (E)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxibenzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

\*\*5-FU: 5-fluorouracila

**Figura 16.** Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-17\* (12,5 mg/kg) e 5-FU\*\* (25 mg/kg) na histologia do fígado de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich (continuação)



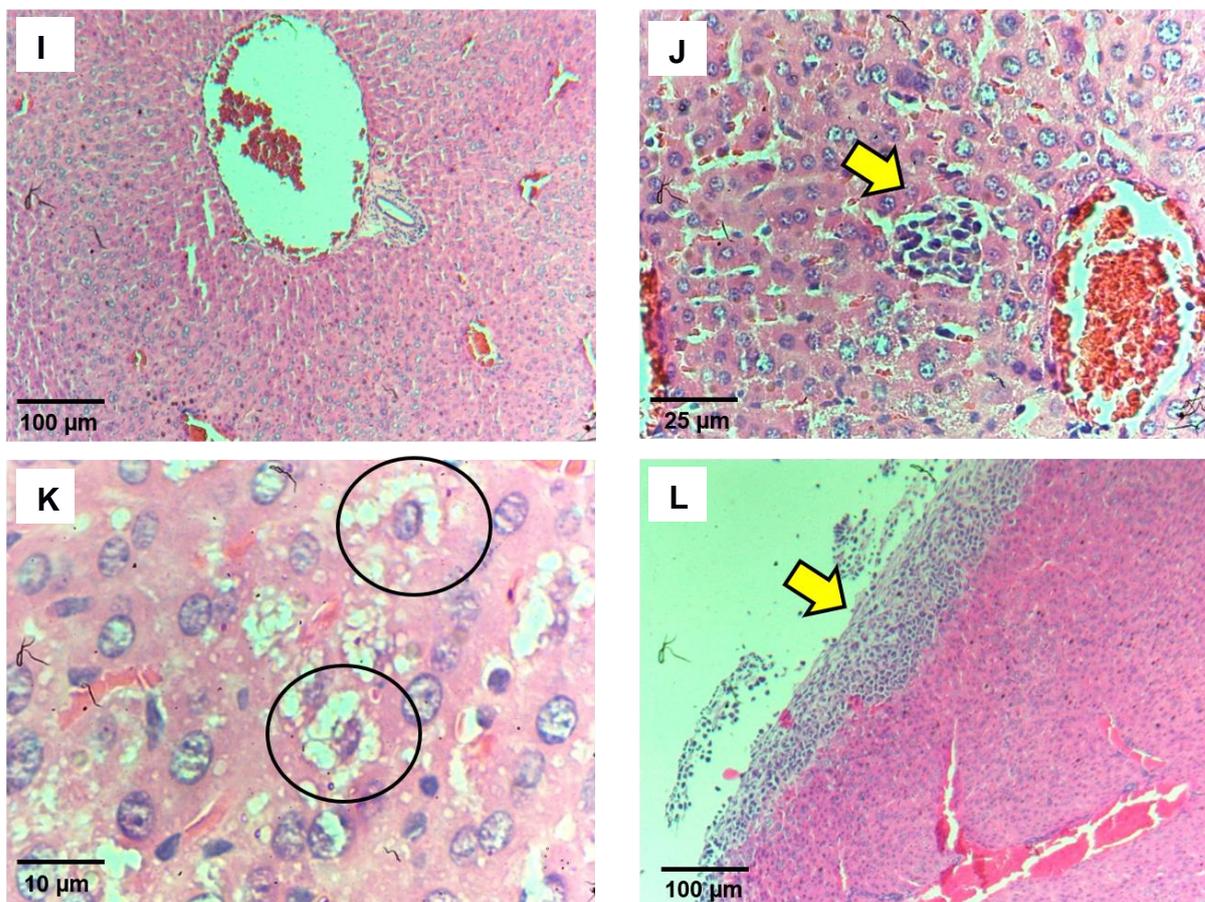
Fonte: SILVA, 2020.

**Legenda:** Histologia do fígado. **Grupo tratado com 5-FU** (Figura 17G e 17H). **G:** Tríade portal (HE 400x); **H:** infiltrado inflamatório (seta amarela) e célula necrótica (círculo vermelho) (HE 400X).

\*AMTAC-17: (*E*)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxibenzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10*H*-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

\*\*5-FU: 5-fluorouracila

**Figura 16.** Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-17\* (12,5 mg/kg) e 5-FU\*\* (25 mg/kg) na histologia do fígado de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich (continuação)



Fonte: SILVA, 2020.

**Legenda:** Histologia do fígado. **Grupo tratado com AMTAC-17** (Figura 17I, J, K, L). **I:** Arquitetura dos cordões hepáticos e tríade portal (HE 100x); **J-L:** infiltrado linfoplasmocitário (seta amarela - HE 400X - J e HE 100X - L); **K:** esteatose hepática microgoticular (círculo preto - HE 1000X).

\*AMTAC-17: (E)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxibenzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

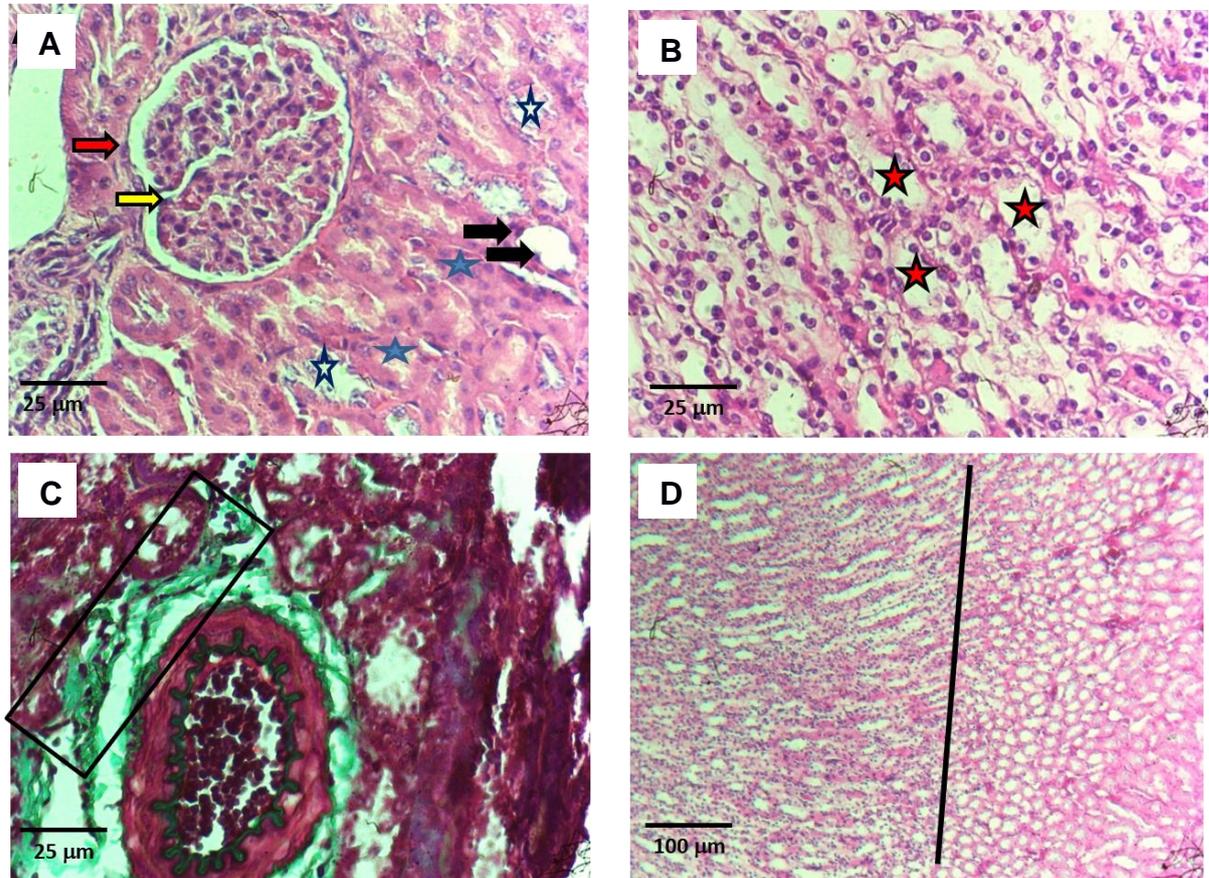
\*\*5-FU: 5-fluorouracila

Os rins removidos do grupo sadio apresentaram parênquima renal bem preservado. Na área cortical foram observados corpúsculos renais de tamanho regular, envolvidos por fina cápsula de Bowman e tufo capilar bem distribuído ao longo do glomérulo, sustentado por delicado mesângio. Ao redor dos corpúsculos, foram observados numerosos túbulos contorcidos proximais preservados com epitélio simples cúbico e abundante citoplasma, túbulos distais com lúmen visível e citoplasma

escasso e alça fina de Henle com seu epitélio simples pavimentoso característico de sua morfologia (Figura 17A). Na medula renal, os numerosos túbulos coletores foram encontrados sustentados por escasso tecido fibroconjuntivo e revestidos por epitélio simples com altura variável, de colunar a cúbico (Figura 17B). O sistema vascular do parênquima renal apresentava diferentes tipos de vasos sanguíneos e o tecido conjuntivo presente entre as estruturas vasculares se encontrava bem distribuído entre os vasos (Figura 17C e D).

Os demais grupos experimentais, controle transplantado, grupo tratado com 5-FU e tratado com AMTAC-17 apresentaram morfologia preservada, semelhante aos animais do grupo sadio quanto as estruturas glomerulares, túbulos contorcidos proximais e distal da região cortical e túbulos coletores da região medular. No entanto, os grupos controle transplantado e tratado com 5-FU apresentaram aumento da deposição de tecido conjuntivo ao redor dos vasos sanguíneos (Figura 17G e K), o que não foi observado nos animais do grupo AMTAC-17 (Figura 17O). Adicionalmente, os animais do grupo controle transplantado também apresentaram um aumento do número e do tamanho do lúmen da alça fina de Henle (Figura 17F).

**Figura 17.** Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-17\* (12,5 mg/kg) e 5-FU\*\* (25 mg/kg) na histologia dos rins de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich



Fonte: SILVA, 2020.

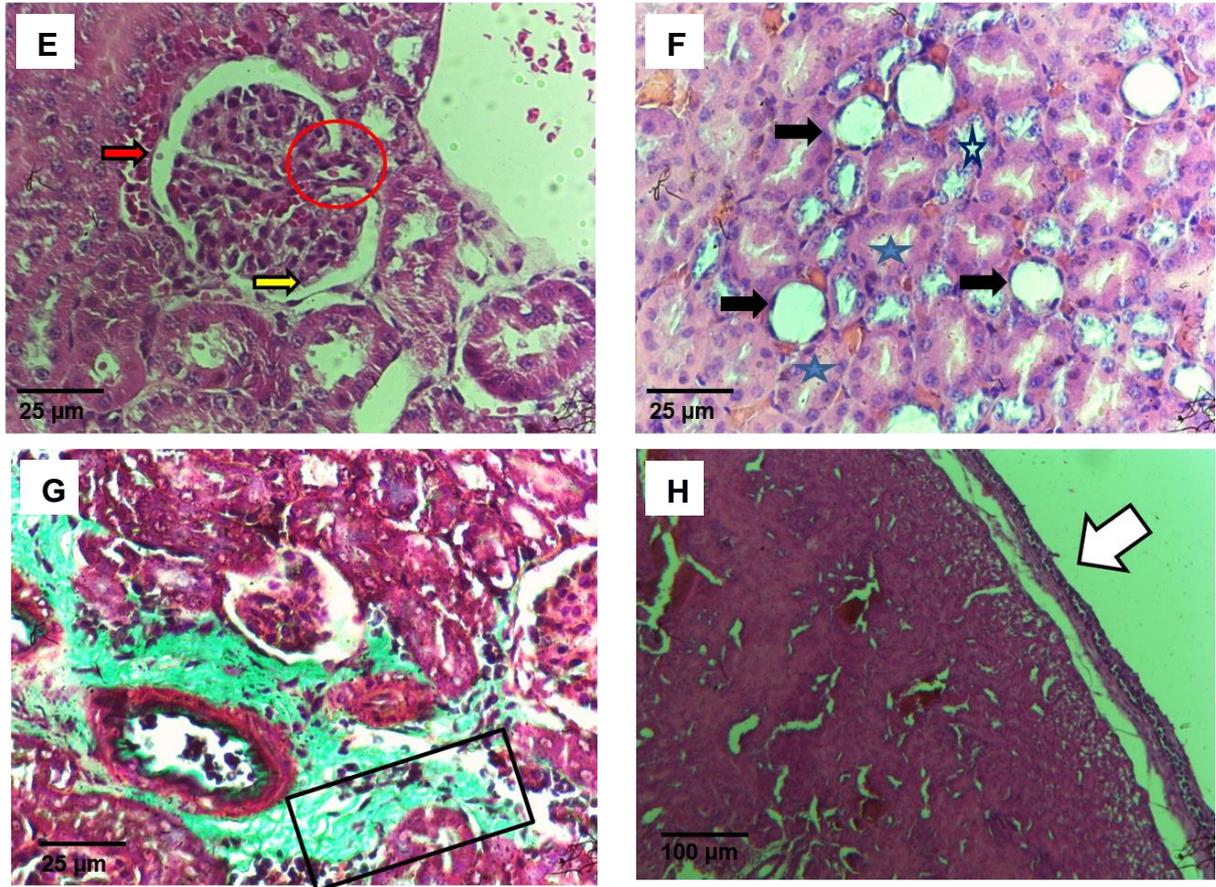
**Legenda:** Histologia dos rins. **Grupo sadio** (Figura 18A, B, C e D). **A:** Córtex renal com glomérulo preservado circundado por cápsula de Bowman com epitélio parietal (seta vermelha), tufo capilar interno revestido pelo epitélio visceral (seta amarela), túbulos proximais (estrela azul) e distais (estrela branca) e alça fina de Henle (seta preta) (HE 400x); **B:** Corte longitudinal da medula renal com túbulos coletores preservados e luz visível (estrela vermelha) (HE 400x); **C:** Tecido conjuntivo perivascular (retângulo preto) (TM 400x); **D:** Corte longitudinal e transversal dos túbulos coletores (TM 100x).

Grupo sadio: animais sem tumor de Ehrlich, submetidos as mesmas condições experimentais.

\*AMTAC-17: (E)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxibenzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

\*\*5-FU: 5-fluorouracila

**Figura 17.** Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-17\* (12,5 mg/kg) e 5-FU\*\* (25 mg/kg) na histologia dos rins de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich (continuação)



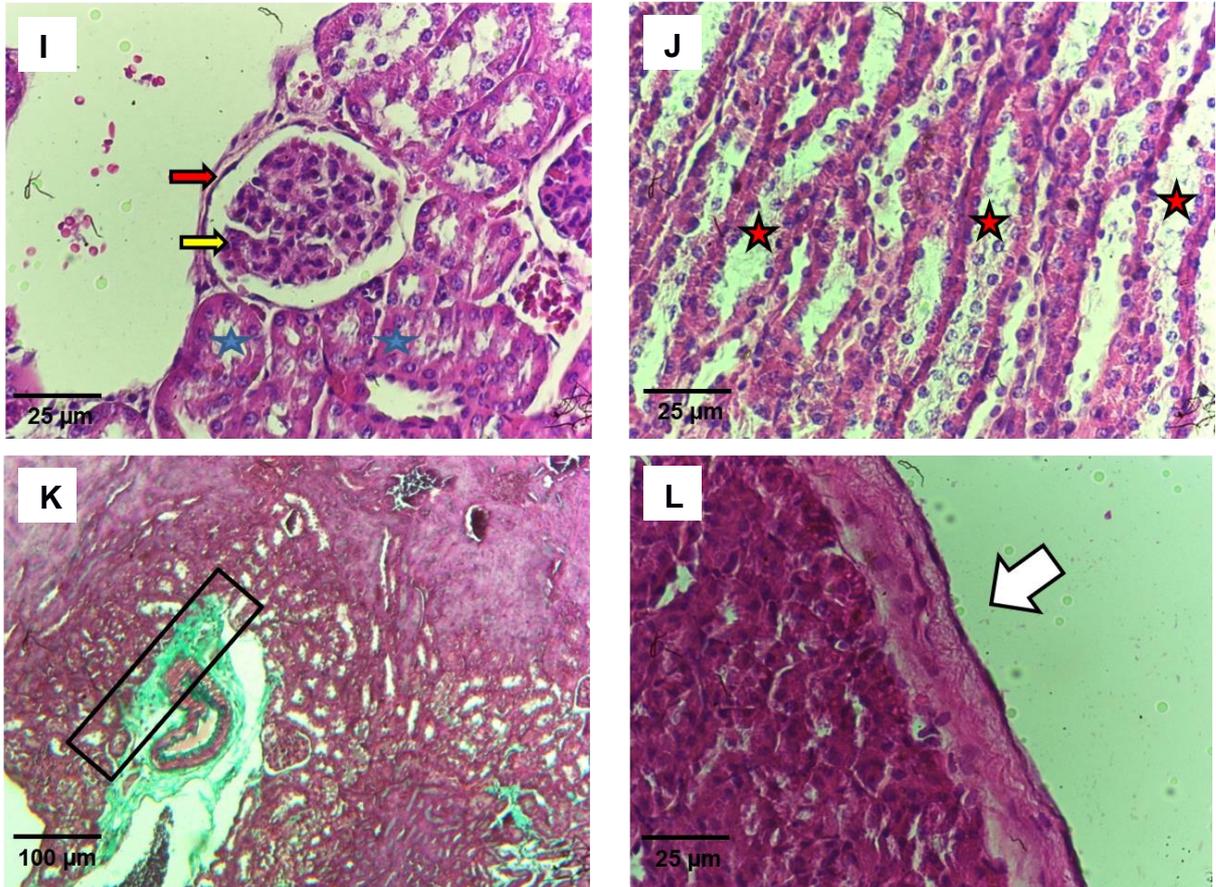
Fonte: SILVA, 2020.

**Legenda:** Histologia dos rins. **Grupo controle transplantado** (Figura 18E, F, G e H). **E:** Glomérulo preservado com visível arteríola (círculo vermelho) (HE 400x); **F:** Túbulo distal (estrela branca) e alça de Henle (seta preta) (HE 400x); **G:** Tecido conjuntivo perivascular (retângulo preto) (TM 400x); **H:** Cápsula renal preservada (seta branca) (HE 100x).

\*AMTAC-17: (*E*)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxibenzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10*H*-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

\*\*5-FU: 5-fluorouracila

**Figura 17.** Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-17\* (12,5 mg/kg) e 5-FU\*\* (25 mg/kg) na histologia dos rins de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich (continuação)



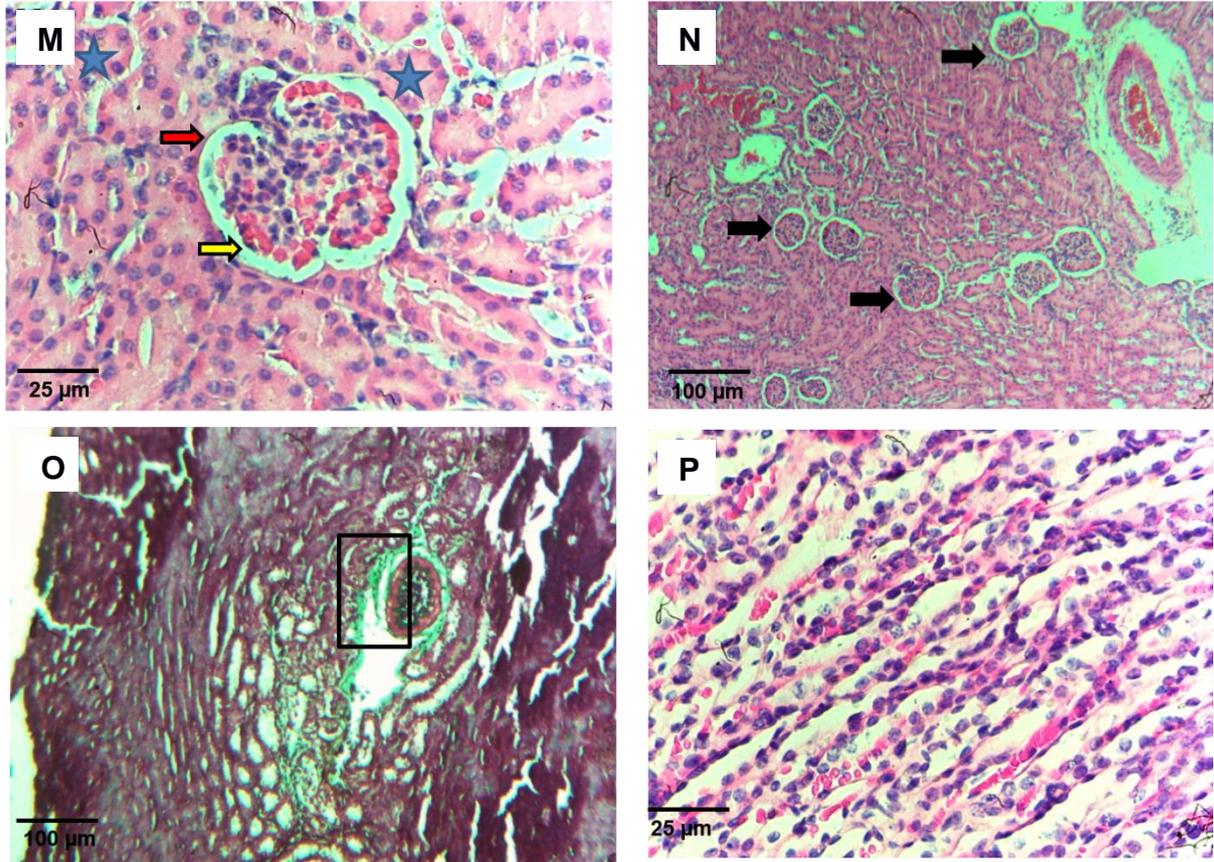
Fonte: SILVA, 2020.

**Legenda:** Histologia dos rins. **Grupo tratado com 5-FU** (Figura 18I, J, K e L). **I:** Glomérulos e túbulos preservados na região cortical (HE 400x) e medular (HE 400x, Figura 18J); **K:** Tecido conjuntivo perivascular (retângulo preto) (TM 100x); **L:** Cápsula renal preservada (seta branca) (HE 100x).

\*AMTAC-17: (E)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxibenzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

\*\*5-FU: 5-fluorouracila

**Figura 17.** Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-17\* (12,5 mg/kg) e 5-FU\*\* (25 mg/kg) na histologia dos rins de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich (continuação)



Fonte: SILVA, 2020.

**Legenda:** Histologia dos rins. **Grupo tratado com AMTAC 17** (Figura 18M, N, O e P). **M:** Glomérulo e túbulos preservados na região cortical (HE 400x); **N:** Glomérulos distribuídos na região cortical (setas pretas) (HE 100x); **O:** Tecido conjuntivo perivascular (retângulo preto) (TM 400x); **P:** Corte transversal da medula renal com túbulos coletores preservados e luz visível (HE 400x).

\*AMTAC-17: (*E*)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxibenzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10*H*-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

\*\*5-FU: 5-fluorouracila

# ***Discussão***

---

## 6 DISCUSSÃO

A acridina e seus derivados apresentam reconhecida atividade biológica, incluindo atividade antitumoral, sendo considerados potenciais agentes terapêuticos para o tratamento do câncer (ALMEIDA et al., 2017; DEMEUNYNCK; CHARMANTRAY; MARTELLI, 2001; ZHANG et al., 2014). Nesse contexto, foi objetivo deste trabalho estudar o potencial antitumoral e possíveis mecanismos de ação *in vitro* e *in vivo*, bem como a toxicidade, de um novo derivado da acridina, o (*E*)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxi-benzilideno) amino)-1', 5'-dihidro-10*H*-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-17).

Nesse estudo, inicialmente foram realizados ensaios *in vitro* em linhagens tumorais e não tumorais, pela utilização de diferentes compostos espiro-acridínicos, buscando selecionar aquele que apresentasse maior potencial citotóxico para linhagens tumorais, com menor toxicidade para células não tumorais. Para a avaliação da toxicidade, foi utilizado o ensaio de redução do MTT, uma das principais técnicas empregadas para avaliar a viabilidade celular (KUMAR; NAGARAJAN; UCHIL, 2018).

A citotoxicidade dos compostos AMTAC-15, AMTAC-17, AMTAC-18, AMTAC-21 e AMTAC-22 foi avaliada nas linhagens de células tumorais HCT-116, HeLa, SK-MEL-28, MCF-7, MDA-MB-231 e PC-3, bem como na linhagem de célula não tumoral L929.

Os compostos apresentaram diferentes potenciais de inibição nas diferentes linhagens celulares, sendo que os compostos AMTAC-15 e AMTAC-18 apresentaram os menores potenciais de inibição, enquanto que os compostos AMTAC-17, AMTAC-21 e AMTAC-22 foram os mais citotóxicos para as linhagens tumorais. Por outro lado, com relação a linhagem não tumoral L929 os compostos apresentaram a seguinte escala de toxicidade: AMTAC-15<AMTAC-17<AMTAC-18<AMTAC-22<AMTAC-21.

Estes resultados corroboram com Almeida e colaboradores (2016), que mostram que os compostos espiro-acridínicos AMTAC-01 e AMTAC-02 apresentaram atividade antitumoral em diferentes linhagens de células tumorais, incluindo MCF-7 e PC-3, utilizando o método de sulforrodamina B (SRB). Na mesma perspectiva, o composto AMTAC-07 também exibiu atividade antiproliferativa nas linhagens MOLT-4 (leucemia de células T), HL-60 (leucemia promielocítica humana) e HCT-116

(carcinoma de cólon humano) (BATISTA, 2019), e o composto ACMD demonstrou atividade citotóxica para células HL-60 (SOUSA, 2019).

Dentre os compostos testados nesse estudo, o AMTAC-17 e o AMTAC-21 apresentaram os maiores potenciais antiproliferativos na linhagem HCT-116. Contudo, o AMTAC-21 também apresentou alto poder de inibição da linhagem de células não tumorais L929, enquanto que o AMTAC-17 demonstrou ser mais seletivo para a célula tumoral HCT-116, nesse ensaio.

O AMTAC-21 apresenta dois núcleos heteroaromáticos (o núcleo da quinolina e o núcleo da espiro-acridina), enquanto que o AMTAC-17 apresenta somente o núcleo da espiro-acridina com um heterociclo (grupo benzilidênico substituído com a trimetoxila). Possivelmente, a junção dos dois heterocíclicos podem tornar a AMTAC-21 mais tóxica (semelhante ao observado pela AMTAC-22, que apresenta o núcleo indol e o núcleo da espiro-acridina), uma vez que os compostos testados com somente um heterociclo (AMTAC-15, -17 e -18) exibiram menor toxicidade para a célula não tumoral L929. Por esse motivo, selecionamos o AMTAC-17 para a continuação dos estudos de atividade antitumoral nas células de carcinoma colorretal humano (HCT-116).

É de suma importância o desenvolvimento de terapias para este tipo de câncer, uma vez que o carcinoma colorretal é um dos tipos mais comuns no mundo, apresentando de um a dois milhões de novos casos diagnosticados a cada ano, com mais de 700.000 mortes anuais (KEW; KOH, 2019; MÁRMOL et al., 2017). No contexto do Brasil, foram registradas 18.867 mortes no ano de 2017 de acordo com o Instituto Nacional de Câncer, e são previstos 41 mil novos casos anuais para o triênio 2020-2022 (INCA, 2020). Este tipo de carcinoma é tratável e, muitas vezes, curável quando detectado precocemente, porém as chances de cura são reduzidas quando a doença apresenta metástases (INCA, 2020). Desse modo, são necessárias terapias mais específicas para este tipo de câncer, buscando melhorar a sobrevida e qualidade de vida dos pacientes acometidos com esta doença.

Os fármacos utilizados na quimioterapia citotóxica exibem diversos efeitos colaterais, principalmente por não serem específicos para as células tumorais, causando diferentes ações em células normais que produzem efeitos como alopecia, vômitos, náuseas e mielossupressão (BARRETO et al., 2014; DAVIDSON et al., 2012;

YEAGER; OLSEN, 2011). Nesse contexto, buscou-se demonstrar uma possível seletividade do composto para as células tumorais, determinando a  $CI_{50}$  do AMTAC-17 para a linhagem HCT-116, bem como para as linhagens de células não tumorais L929 e HaCaT e em células mononucleares de sangue periférico humano (PBMCs), em comparação com a doxorrubicina, um fármaco utilizado na clínica.

Os resultados mostraram que o AMTAC-17 exibiu baixa toxicidade na linhagem L929, com índice de seletividade (IS) de 3,80. Contudo, o composto apresentou citotoxicidade para as células HaCaT (IS: 1,15) semelhante à exibida para a linhagem tumoral HCT-116, além de reduzir significativamente a viabilidade das PBMCs (IS: 0,68). Todavia, a droga padrão doxorrubicina demonstrou maior efeito citotóxico para as células não tumorais testadas, observado pelos seus índices de seletividade para a célula tumoral (HaCaT: 0,10; PBMC: 0,01), que foram inferiores aos exibidos pelo AMTAC-17. A DXR é conhecida por provocar efeitos colaterais em múltiplos órgãos, como cardiotoxicidade e efeitos no sistema digestório, tegumentar, nervoso, urinário e reprodutor, por conta da sua toxicidade não seletiva para as células tumorais (PUGAZHENDHI et al., 2018).

Diante disso, prosseguiram-se os ensaios de avaliação dos possíveis mecanismos de ação antitumoral *in vitro* do AMTAC-17 em células HCT-116. Inicialmente foi avaliada a distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular, visto que este é um importante mecanismo de ação antitumoral e diferentes fármacos utilizados na quimioterapia antineoplásica interferem nesse processo, como o 5-FU, os alcaloides da vinca (vimblastina e vincristina), a doxorrubicina, entre outros (MILLS; KOLB; SAMPSON, 2018).

As diferentes fases do ciclo celular podem ser identificadas de acordo com a quantidade de DNA marcada com o iodeto de propídio (IP), uma vez que as células presentes na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> apresentam ploidia típica ( $2n$  – diploides) de células que não estão se dividindo, enquanto que as células em processo de divisão celular iniciam a duplicação do seu material genético na fase S ( $>2n$ ), e apresentam o material genético totalmente duplicado na fase G<sub>2</sub>/M ( $4n$ ) (PÁRAL et al., 2018; WENZEL; SINGH, 2018). Além disso, ainda ocorre a formação de um pico com quantidade de DNA inferior à do G<sub>1</sub> ( $<2n$ ), chamado de pico sub-G<sub>1</sub>. Dados da literatura relacionam o aumento no pico sub-G<sub>1</sub> como um indicativo do processo de apoptose, pois, na análise por citometria

de fluxo, os eventos que apresentam uma quantidade de DNA inferior a G1 normalmente correspondem a células com DNA fragmentado, que se constitui um indicativo do processo de morte celular programada (JERNEI et al., 2019; RICCARDI; NICOLETTI, 2006; SOMMA et al., 2019). O aumento na porcentagem de células na fase S e G2/M do ciclo celular também indicam que o composto apresenta efeitos antimitóticos, capaz de provocar morte das células tumorais (HOFFMAN; YANO, 2019).

Como observado, o AMTAC-17 induziu alterações no ciclo celular nas duas concentrações testadas, correspondentes a  $CI_{50}$  (30  $\mu$ M) e o dobro da  $CI_{50}$  (60  $\mu$ M), ambas com aumento no conteúdo do DNA em sub-G1, com conseqüente diminuição da porcentagem de células na fase G0/G1. Com o aumento da concentração, o AMTAC-17 promoveu acúmulo de células na fase S do ciclo celular, porém ambas as concentrações foram capazes de induzir discretos aumentos na fase G2/M. Dados da literatura mostram que o composto espiro-acridínico AMTAC-02 é capaz de inibir a enzima topoisomerase II $\alpha$ , provavelmente por conta da presença do grupo metoxila em sua molécula (ALMEIDA et al., 2016), o qual também está presente na AMTAC-17, o que justificaria o acúmulo de células nas fases S e G2/M do ciclo, apresentando possíveis efeitos antimetabólitos e antimitóticos.

Outros derivados acridínicos também promovem alterações no ciclo celular, como o composto LS-1-10 que, de maneira semelhante, também promoveu aumento no pico sub-G1 e acúmulo de células em S/G2 (FU et al., 2017). Zhou e colaboradores (2018) demonstraram, em células de câncer de mama, que o efeito antitumoral de novos derivados 3-Nitroacridina envolve parada no ciclo celular nas fases G0/G1. O derivado acridínico ACMD induziu parada do ciclo celular na fase G2/M em células de leucemia HL-60, indicando que o composto apresenta em sua atividade antitumoral efeito antimitótico (SOUSA, 2019).

As células tratadas com AMTAC-17 também exibiram alterações características de apoptose, como externalização da fosfatidilserina, observada pelo aumento de células marcadas apenas com a Anexina V, nas concentrações de 30 e 60  $\mu$ M, bem como foi possível observar células duplamente marcadas com laranja de acridina (LA) e IP, e a presença de características morfológicas da apoptose, como a formação de *blebs* na membrana, condensação de cromatina e fragmentação nuclear, sugerindo

que a apoptose é um dos mecanismos de morte celular causado por este composto espiro-acridínico.

A literatura mostra que os derivados acridínicos induzem morte celular por apoptose em diferentes linhagens celulares, como o ACMD em células HL-60, após 72 horas de tratamento (SOUSA, 2019), a série de derivados acridínicos *N*-fenilbenzamida-4-metilamina induziu a apoptose de células de leucemia linfocítica aguda (CCRF-CEM) em 48 horas de tratamento (ZHANG et al., 2019). Uma série de novos derivados à base de 3-nitroacridina foram capazes de causar apoptose em células MCF-7 e MDA-MB-231 em 24 horas de tratamento, enquanto que os novos derivados de tetrahydroacridina com porções iodobenzóicas induziram apoptose após 24 horas de tratamento em células A549 (adenocarcinoma de pulmão humano) e HT-29 (adenocarcinoma colorretal humano) (GIREK et al., 2019). O composto 9-(2'-hidroxietilamino)-4-metil-1-nitroacridina promoveu alterações morfológicas características da apoptose em linhagens celulares de adenocarcinoma pancreático humano (Panc-1 e MiaPaCa-2), como encolhimento celular, condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos (BOROWA-MAZGAJ et al., 2017).

O estresse oxidativo associado à elevada produção de EROs representa um dos mecanismos de toxicidade apresentado por grande parte dos agentes quimioterápicos (VICTORINO et al., 2014; ZHU et al., 2020). Em contrapartida, as EROs desempenham papel crucial na sobrevivência, proliferação e migração de células tumorais, estando envolvidas em todas as etapas da carcinogênese, incluindo a iniciação, promoção e progressão da doença, além de estar envolvidas no processo de metástase (AGGARWAL et al., 2019; BABU; TAY, 2019).

Nesse estudo, observou-se que o AMTAC-17 promoveu significativa diminuição dos níveis de EROs, o que sugere que parte de seu mecanismo de ação antitumoral *in vitro* envolve o seu potencial antioxidante. Estudos indicam que a utilização de antioxidantes podem diminuir EROs intracelular e reduzir o risco de desenvolver o câncer (GALADARI et al., 2017; HE et al., 2017). Derivados acridínicos da série 9-(2-(1-arylethylidene)hydrazinyl)acridine demonstraram capacidade antioxidante por diminuir os níveis de radicais livres, radicais superóxido, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio em modelos *in vitro* (HAIDER et al., 2019). Por outro lado, o composto *N*-{(1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil}-2-butilacridina-9-amina apresenta

como parte de seu mecanismo de ação a indução de estresse oxidativo em estudos *in vitro* com células da linhagem HCT-116 (CHEN et al., 2015b).

Dados encontrados para o composto DTX-VNS, um nanosistema com Docetaxel (fármaco antimitótico utilizado no tratamento do câncer), mostram que o mesmo induziu significativa redução nos níveis de EROs em células tumorais, reduzindo os efeitos colaterais e promovendo uma melhora dos efeitos antitumorais do fármaco (ZHU et al., 2020). Ainda, Jeon e colaboradores (2019) demonstraram a importância dos antioxidantes no tratamento do carcinoma hepatocelular, utilizando a quercetina, um flavonoide natural com reconhecida atividade antioxidante, que reduziu significativamente a proliferação de células HepG2 por meio da redução nos níveis de EROs intracelulares.

Em suma, estes resultados *in vitro* do AMTAC-17 mostram que este composto acridínico apresenta atividade antitumoral na linhagem de câncer de cólon humano HCT-116, associada à ação antioxidante, e à alterações no ciclo celular, externalização de fosfatidilserina e alterações morfológicas, tais como a formação de *blebs* na membrana, condensação de cromatina e fragmentação nuclear, que, em conjunto, sugerem indução de morte celular por apoptose.

Considerando os dados promissores obtidos, o presente estudo progrediu com este composto visando compreender o seu perfil de toxicidade, bem como a atividade antitumoral *in vivo*.

Os estudos toxicológicos com o AMTAC-17 iniciaram pelo teste de toxicidade em embriões de peixe (teste FET) utilizando o modelo de peixe-zebra (*Danio rerio*), segundo o guia nº 236 da OECD (2013) que busca determinar a toxicidade aguda ou letal de produtos químicos em estágios embrionários dessa espécie (OECD, 2013). Ensaio com embriões e larvas de peixe-zebra estão sendo cada vez mais utilizados como modelos toxicológicos, uma vez que apresentam testes rápidos e que os resultados obtidos são semelhantes aos de outros vertebrados, inclusive para o ser humano (BAMBINO; CHU, 2017; FALCÃO et al., 2018).

De acordo com a metodologia do teste FET, os embriões devem ser avaliados por 96 horas de exposição ao produto químico em teste, sendo feitas avaliações a cada 24 horas dos indicadores de letalidade, como a coagulação do embrião, falta de

somitom, não descolamento da base cauda e falta de batimentos cardíacos, a fim de determinar a concentração letal média ( $CL_{50}$ ) (BRAUNBECK et al., 2014).

Devido ao fato de que a  $CL_{50}$  para 96 horas de exposição de embriões/larvas de peixe-zebra ao AMTAC-17 foi maior que 300  $\mu$ M, pode-se concluir que este composto apresenta baixa toxicidade nesse modelo, visto que o valor da  $CL_{50}$  é maior que dez vezes o valor da  $CI_{50}$  em células tumorais da linhagem HCT-116, isto é, o AMTAC-17 é seletivamente mais tóxico às células tumorais do que aos embriões de peixe-zebra. Na mesma perspectiva, o composto espiro-acridínico AMTAC-07 apresentou baixa toxicidade no mesmo modelo avaliado (BATISTA, 2019). O composto híbrido tiofeno-acridínico, ACS03, exibiu algumas alterações morfológicas nos embriões, porém apenas em concentrações a partir de 126,42  $\mu$ M, cerca de cinco vezes maiores que a  $CI_{50}$  da substância para células HCT-116 (LISBOA et al., 2020)

Posteriormente, foi realizado o teste de toxicidade não clínica aguda em camundongos, o qual buscou determinar doses seguras a serem utilizadas nos ensaios farmacológicos, sendo esta a primeira etapa a ser realizada em estudos de toxicidade não clínica para selecionar novos candidatos a fármacos (OECD, 2001). Ainda, neste ensaio também foi realizada a triagem psicofarmacológica com o objetivo de observar efeitos sobre o SNC e o SNA (ALMEIDA et al., 1999).

Considerando que o AMTAC-17 apresentou  $DL_{50}$  maior que 5000 mg/kg em camundongos, sendo classificado na categoria 5 de acordo com o *Globally Harmonized Classification System* (GHS), bem como o único efeito observado na avaliação comportamental foi constipação, que desapareceu após 4 horas do tratamento com a dose de 2000 mg/kg, pode-se inferir que o AMTAC-17 possui baixa toxicidade não clínica aguda em camundongos, por via intraperitoneal.

Estes resultados corroboram com os observados por Batista (2019) para o composto espiro-acridínico AMTAC-07, que também mostrou baixa toxicidade aguda, uma vez que sua  $DL_{50}$  também foi estimada como maior que 5000 mg/kg. Similarmente, outro derivado acridínico, ACS-AZ10, exibiu baixa toxicidade aguda, visto que a  $DL_{50}$  foi estimada como maior que 2000 mg/kg (MANGUEIRA et al., 2017). Para o derivado acridínico ACS-AZ, a  $DL_{50}$  foi estimada em torno de 500 mg/kg (MANGUEIRA, 2019), enquanto que para o derivado ACMD foi estimada em torno de 1000 mg/kg (SOUSA, 2019). Contudo, relatos da literatura mostram que alguns

derivados acridínicos podem também apresentar alta toxicidade aguda (PAN et al., 2007).

Adicionalmente, foi avaliada a genotoxicidade, que é um efeito colateral comumente observado com o uso de drogas antineoplásicas em resposta aos danos ao DNA, causando morte celular (QUISPE-TINTAYA et al., 2018). Contudo, células normais também podem ser afetadas, podendo provocar alterações genéticas e indução de tumores secundários em pacientes em tratamento (GAJSKI et al., 2016).

Entre os ensaios responsáveis por analisar a genotoxicidade, temos o ensaio do micronúcleo, o qual é muito utilizado para avaliar a indução de aberrações cromossômicas em sangue periférico de roedores (HAYASHI, 2016). O micronúcleo é um pequeno corpo de cromatina extranuclear, envolvido a um envelope nuclear, localizado no citoplasma da célula, formado por conta da não incorporação de um cromossomo, ou parte dele, nos núcleos das células formadas durante a divisão celular (TOBÓLSKA et al., 2018).

Observando que o AMTAC-17 (2000 mg/kg, i.p.) não induziu aumento significativo no número de micronúcleos, pode-se inferir que o mesmo não possui efeito genotóxico *in vivo*, nas condições experimentais avaliadas. Este resultado corrobora com os dados encontrados para os derivados acridínicos AMTAC-07 (2000 mg/kg, i.p.), ACS-AZ (150 mg/kg, i.p.), ACS-AZ10 (2000 mg/kg, i.p.) e ACMD (300 mg/kg, i.p.), os quais não apresentaram potencial genotóxico em sangue periférico de camundongos (BATISTA, 2019; MANGUEIRA et al., 2017; SOUSA, 2019). Todavia, a literatura mostra que derivados da acridina, incluindo a m-AMSA, podem exibir potencial mutagênico em células saudáveis (ATTIA, 2011; DI GIORGIO et al., 2011; HSU et al., 2016).

Considerando que o AMTAC-17 apresentou baixa toxicidade nos modelos *in vivo* estudados, obteve-se segurança para a avaliação da atividade antitumoral do composto em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich (CAE), um adenocarcinoma mamário murino transplantável, que desenvolve uma carcinomatose peritoneal de maneira muito rápida e agressiva, apresentando grande acúmulo de fluido no abdome do animal (ascite) por conta da reação inflamatória local promovida pelo tumor, com consequente aumento da permeabilidade vascular peritoneal (FASTAIA; DUMONT, 1976; FERNANDES et al., 2015).

Nesse sentido, o CAE se constitui como um viável modelo *in vivo*, pois permite uma investigação detalhada do perfil inibitório do tumor, promovido pela substância em estudo, sendo então um modelo bem estabelecido para a investigação de novos compostos bioativos (FERNANDES et al., 2015; LISBOA et al., 2020; MANGUEIRA et al., 2017; SANTOS et al., 2018).

A droga antitumoral padrão utilizada foi o 5-FU, um antimetabólito, análogo da pirimidina, que apresenta a substituição do hidrogênio na posição C-5 da base nitrogenada uracila por um flúor. Ele exerce seu efeito antitumoral pela sua conversão em metabólitos ativos, como 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato (FdUMP) – responsável pela inibição da enzima timidilato sintase, que resulta na diminuição da produção da base timina, necessária para a síntese e reparo do DNA – (TORÉN et al., 2018), 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-trifosfato (FdUTP) e 5-fluorouridina-5'-trifosfato (FUTP) – capazes de se incorporar ao DNA e RNA, respectivamente, interferindo no processo de replicação do material genético e no processo de síntese proteica por produzir RNAs alterados (THOMAS et al., 2016).

Nesse estudo, o tratamento de sete dias com o AMTAC-17 em animais transplantados com CAE provocou redução significativa dos parâmetros viabilidade e total celular, sendo possível concluir que o AMTAC-17 também apresenta atividade antitumoral *in vivo*. Pelo fato de não terem sido observadas diferenças significativas entre as doses testadas (12,5, 25 e 50 mg/kg), a dose de 12,5 mg/kg foi selecionada para a investigação dos possíveis mecanismos de ação do composto em estudo.

Derivados acridínicos apresentam reconhecida atividade antitumoral *in vivo* (GALDINO-PITTA et al., 2013; KUKOWSKA, 2017; MANGUEIRA et al., 2017). Em um estudo de FU e colaboradores (2017) foi mostrado que um derivado acridínico, LS-1-10, demonstrou atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* em células de câncer de cólon, por meio de inibição da degradação autofágica e indução de apoptose. O derivado tiofeno-acridínico ACS03 exibiu potente atividade antitumoral *in vitro* na linhagem celular HCT-116 e *in vivo* em modelo de CAE (12,5 mg/kg, i.p.) (LISBOA et al., 2020). Os derivados acridínicos AMTAC-07, ACS-AZ e ACMD, também exibiram atividade antitumoral *in vivo* em modelo de CAE, todos na dose de 50 mg/kg (i.p.) (BATISTA, 2019; MANGUEIRA, 2019; SOUSA, 2019).

Corroborando com o resultado obtido nos ensaios *in vitro*, o tratamento dos animais por sete dias com AMTAC-17 (12,5 mg/kg) induziu aumento no pico sub-G1, associado a uma diminuição da porcentagem de células na fase G0/G1, indicativo do processo de apoptose, como descrito anteriormente. A literatura mostra que derivados da acridina também apresentam como um dos seus mecanismos de ação *in vivo* a indução da parada no ciclo celular para promover seus efeitos antitumorais, como é o caso do ACS-AZ10, que induziu a parada do ciclo celular na fase G2/M, com consequente redução na porcentagem de células nas fases G0/G1 e S, em modelo de CAE (MANGUEIRA et al., 2017). Por outro lado, o composto espiro-acridínico AMTAC-07 não exibiu efeitos sobre o ciclo celular como parte do seu mecanismo de ação antitumoral (BATISTA, 2019).

A formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, a angiogênese, é um processo essencial para o desenvolvimento do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011), sendo a terapia antiangiogênica um importante alvo para a ação de drogas antitumorais, uma vez que previne o crescimento tumoral por interromper o fornecimento de oxigênio e nutrientes, bem como impede o processo de metástase (LUGANO; RAMACHANDRAN; DIMBERG, 2019). O processo de angiogênese depende da coordenação de muitos fatores que estão presentes no microambiente tumoral, como indutores e inibidores, e, desse modo, o entendimento das interações entre esses componentes é uma importante estratégia terapêutica contra o câncer (HINSHAW; SHEVDE, 2019; MAJNOONI et al., 2019).

O composto AMTAC-17 induziu uma diminuição na microdensidade dos vasos peritoneais, sugerindo que seu mecanismo de ação antitumoral envolve um efeito antiangiogênico, corroborando com os resultados encontrados para outros derivados acridínicos, como o AMTAC-07, o ACMD, o ACS-AZ e o ACS-AZ10, que igualmente diminuiram a microdensidade vascular no mesmo modelo experimental (BATISTA, 2019; MANGUEIRA et al., 2017; MANGUEIRA, 2019; SOUSA, 2019).

Diferentes derivados acridínicos apresentam atividade antiangiogênica relatada, como os derivados 9-aminoacridina, que exibiram potente inibição das tirosinas cinases VEGFR-2 e Src nas linhagens celulares K562 (leucemia mieloide crônica), HepG-2 (carcinoma hepatocelular), e MCF-7 (LUAN et al., 2011). Pérez e colaboradores (2017) também mostraram novos derivados acridínicos com potente

efeito antiangiogênico em um ensaio de formação de tubo endotelial em células EA.hy926 (linhagem de células da veia umbilical humana).

No microambiente tumoral são encontrados diversos mediadores que contribuem para o desenvolvimento tumoral, por meio da interação de células tumorais com células do estroma e diversos mediadores, como citocinas, quimiocinas, EROs, entre outros (AGGARWAL et al., 2019; WANG et al., 2017a). As citocinas são importantes mediadores que favorecem a comunicação intercelular, desempenhando um papel dual de induzir o crescimento tumoral, ou ainda podem estar envolvidas na atividade antitumoral (RIBEIRO FRANCO et al., 2020; ZAMARRON; CHEN, 2011).

Nesse contexto, o AMTAC-17 promoveu aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-12. IL-12 é uma citocina conhecida pela sua ação antitumoral e antiangiogênica, por meio da redução da produção do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e da metaloproteinase-9 (LU, 2017; TUGUES et al., 2015). Desse modo, o efeito causado pelo AMTAC-17 na microdensidade dos vasos pode ser dependente da ação antiangiogênica desempenhada pela IL-12.

IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  são conhecidas por desempenhar efeitos antitumorais, uma vez que representam citocinas de perfil Th1, conhecidas por seu efeito citotóxico contra células tumorais (SANTOS et al., 2018; XU, 2014). Este efeito pode envolver ativação de células da imunidade inata, como macrófagos neutrófilos e células dendríticas, para ativar a fagocitose, e adaptativa, como os linfócitos – para secretar mais citocinas pró-inflamatórias – e a ativação de células T citotóxicas (PELKA; DE NARDO, 2018; PETTY; YANG, 2017; WELCH; FISHER, 2016), além de favorecer respostas inflamatórias e serem importantes indutoras da apoptose das células tumorais (SHEN et al., 2017; YUAN et al., 2018). Considerando que ocorreu aumento dessas citocinas após o tratamento com AMTAC-17, é possível inferir que esse composto promove imunomodulação do microambiente tumoral a induzir efeitos citotóxicos contra as células tumorais.

Ainda, observou-se que o composto não alterou os níveis de IL-4, o que é interessante porque esta é uma citocina que apresenta reconhecido perfil de favorecimento do crescimento tumoral, uma vez que é responsável por polarizar a

resposta imune para um perfil Th2 e desempenhar papel antiapoptótico (LI et al., 2008; SUZUKI et al., 2015).

Dados relacionados ao perfil imunomodulador de derivados acridínicos são escassos na literatura. Contudo, Harada e colaboradores (2017) mostraram que o derivado acridínico quinacrina promove o aumento de TNF- $\alpha$  em células A549 (carcinoma de pulmão humano), responsável pela inibição da expressão da molécula de adesão intercelular-1, que tem importante papel na progressão do câncer e indução de metástase. Ainda, foi observado que o composto AMTAC-07 induziu aumento de IL-1 $\beta$ , IL-4, TNF- $\alpha$  e CCL-2 (BATISTA, 2019), o derivado acridínico ACMD promoveu aumento nas concentrações de IL-12 e TNF- $\alpha$  (SOUSA, 2019), enquanto que o composto ACS-AZ promoveu aumento de TNF- $\alpha$  e de IL-4 (MANGUEIRA, 2019), todos em modelo *in vivo* de CAE, sendo possível inferir que os derivados acridínicos podem modular a resposta inflamatória contra células tumorais por meio da expressão de citocinas pró-inflamatórias.

Diferentemente do que foi exibido *in vitro*, o AMTAC-17 não induziu alterações significativas nos níveis de EROs, inferindo que, no modelo *in vivo*, não ocorre a modulação do estresse oxidativo como parte do seu mecanismo de ação. Sugerimos que este fato pode estar relacionado a metabolização da molécula, pelo processo de O-desalquilação, capaz de transformar os grupamentos metoxilas em hidroxilas, pela perda dos grupamentos alquílicos (CH<sub>3</sub>), e essas hidroxilas podem manter a atividade antitumoral do composto, porém as metoxilas apresentam maior potencial antioxidante (JIANG et al., 2019), como foi observado nos estudos *in vitro*.

Desse modo, estes resultados *in vivo* do AMTAC-17 mostram que este composto apresenta atividade antitumoral em modelo de CAE, associada ao aumento no pico sub-G1, um indicativo de apoptose, além de apresentar efeito antiangiogênico e imunomodulador para um perfil Th1 de resposta.

Considerando a importância da avaliação da toxicidade para determinar a aplicabilidade de um candidato a fármaco, buscou-se avaliar a toxicidade desse composto, uma vez que os fármacos antitumorais apresentam uma série de efeitos adversos, sendo este um dos principais problemas da quimioterapia citotóxica (CLAVO et al., 2019). Para isso, avaliou-se o perfil de toxicidade do AMTAC-17 após

sete dias de tratamento em modelo de CAE, o que caracteriza o acúmulo da substância no organismo.

Com relação ao consumo de água, de alimento e a evolução ponderal, parâmetros que oferecem indícios de toxicidade sistêmica, constatou-se que não ocorreram alterações nos animais tratados com a dose de 12,5 mg/kg de AMTAC-17. Esse resultado é de suma importância, uma vez que, entre os fármacos anticâncer, é um achado comum a presença de distúrbios gastrointestinais, provocando náuseas, vômitos, diarreia e, conseqüentemente, desnutrição (DAVIDSON et al., 2012). Outros derivados acridínicos apresentaram resultados semelhantes ao AMTAC-17, como o ACS-AZ10 (MANGUEIRA et al., 2017), o AMTAC-07 (BATISTA, 2019) e o ACMD (SOUSA, 2019), os quais não induziram quaisquer alterações nos parâmetros citados, enquanto que o derivado ACS-AZ apresentou como único efeito a redução no consumo de água pelos animais (MANGUEIRA, 2019).

Os índices dos órgãos coração, baço, timo, fígado e rins dos animais não foram alterados após sete dias de tratamento com o AMTAC-17. De maneira semelhante, os derivados acridínicos AMTAC-07, ACMD, ACS-AZ e ACS-AZ10 também não foram observadas alterações nos índices desses órgãos estudados (BATISTA, 2019; MANGUEIRA et al., 2017; MANGUEIRA, 2019; SOUSA, 2019). Para aprofundar os estudos sobre uma possível toxicidade de AMTAC-17 em nível tecidual, foi realizada análise histológica em fígado e rins dos animais experimentais.

O fígado é o principal órgão responsável pelo metabolismo de fármacos, além de promover a geração de metabólitos ativos ou tóxicos (TREFTS; WILLIAMS; WASSERMAN, 2015), enquanto que os rins são o principal órgão excretor, essenciais para a manutenção da homeostase do organismo (NAWATA; PANNABECKER, 2018). Diferentes quimioterápicos são conhecidos por causarem lesões hepáticas, bem como induzir nefrotoxicidade. Dentre estes, podem ser citados a ciclofosfamida, que provoca hepatotoxicidade (BHAT et al., 2018), e a cisplatina, que é frequentemente associada à danos renais (DUFFY et al., 2018).

Normalmente, para realizar diagnósticos que verificam as condições do fígado, são realizados exames bioquímicos que incluem a avaliação das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), que se encontram em alta concentração nas células do fígado, as quais conseguem demonstrar possíveis

danos que podem ocorrer no órgão e, a depender do padrão de aumento, podem favorecer diferentes diagnósticos, uma vez que lesões nas células hepáticas promovem a liberação dessas enzimas no plasma. Contudo, a AST também pode ser encontrada em outras células, como no músculo, pulmões, rins, pâncreas e eritrócitos, não sendo considerado um marcador específico de lesão hepática (LALA; MINTER, 2019; XU; HIGGINS; CEMBROWSKI, 2015).

O tratamento com AMTAC-17 causou diminuição nos níveis da enzima ALT em comparação ao controle transplantado e ao grupo sadio. Contudo, este valor (66,99 U/L) está dentro dos parâmetros bioquímicos normais para a espécie em estudo (25 – 100 U/L) (GAD, 2007). Esses dados corroboram com a análise histopatológica, na qual foi possível observar discretas alterações histológicas, como a presença de pouco infiltrado linfoplasmocitário e discreta esteatose hepática microgoticular. A esteatose é tipicamente observada no início de lesões hepáticas (RUTKOWSKI, 2019), sendo este achado também presente no grupo controle transplantado, sugerindo que seja uma reação ao próprio tumor (PITA, 2010).

Corroborando com os dados encontrados nesse estudo, os derivados acridínicos AMTAC-07, ACS-AZ10 e ACMD demonstraram baixa toxicidade hepática em estudos com o mesmo modelo experimental (BATISTA, 2019; MANGUEIRA et al., 2017; SOUSA, 2019). O derivado acridínico ACS-AZ induziu moderada toxicidade hepática, caracterizada pelo acúmulo de lipídeos citoplasmáticos característico de esteatose hepática e processos degenerativos (MANGUEIRA, 2019). Ainda, em estudo realizado em 2007, Pan e colaboradores evidenciaram efeitos hepatotóxicos do derivado acridínico Bis(7)-tacrine, com aumento nos níveis de ALT e AST.

Com relação a análise da função dos rins, esta pode ser realizada pelos exames bioquímicos que mensuram as concentrações plasmáticas de ureia e creatinina, visto que, em condições normais, seus níveis permanecem constantes, porém, em casos de disfunção renal, estes produtos que deveriam ser eliminados pelos rins se acumulam, provocando aumento nos seus níveis plasmáticos (NAYAK; RAI, 2017; ZHANG; GUO; ZHANG, 2017).

Após o tratamento com o AMTAC-17 não houve alteração nos níveis de ureia e creatinina. Corroborando com este resultado das análises bioquímicas, a análise histopatológica dos rins dos animais experimentais não evidenciou quaisquer

alterações neste órgão, podendo-se inferir que este composto apresenta baixa toxicidade renal. Resultados semelhantes foram encontrados para os derivados acridínicos ACS-AZ10 (MANGUEIRA et al., 2017), ACS-AZ (MANGUEIRA, 2019) e AMTAC-07 (BATISTA, 2019), que não induziram alterações nos níveis sanguíneos de ureia e creatinina. Por outro lado, o derivado acridínico ACMD provocou aumento na concentração sérica de ureia e creatinina, sugestivo de disfunção renal (SOUSA, 2019).

Com respeito as análises hematológicas, observa-se que o tratamento de sete dias com AMTAC-17 não promoveu alteração em nenhum dos parâmetros avaliados, diferentemente da maioria dos fármacos antineoplásicos, os quais apresentam toxicidade não seletiva para as células tumorais, provocando efeitos em células saudáveis (BARRETO et al., 2014). Contudo, ocorreu aumento nos níveis de CHCM (concentração hemoglobínica corpuscular média) e no percentual dos neutrófilos em relação ao grupo sadio, porém é possível inferir que estas alterações observadas no grupo tratado com o AMTAC-17 não teriam relação com o tratamento em si, podendo estar relacionadas à própria doença, visto que o grupo controle transplantado também apresentou estas alterações com relação ao grupo sadio (PITA, 2010).

Informações a respeito de toxicidade hematológica dos derivados acridínicos são escassas na literatura. Todavia, resultados semelhantes foram observados para os derivados acridínicos AMTAC-07 e ACS-AZ, os quais não apresentaram toxicidade hematológica após tratamento de sete dias em modelo de tumor de Ehrlich (BATISTA, 2019; MANGUEIRA, 2019). Por outro lado, o composto ACMD apresentou redução na concentração de hemoglobina e do hematócrito, o que é sugestivo de anemia (SOUSA, 2019), e o composto ACS-AZ10 exibiu diminuição nas porcentagens de linfócitos e neutrófilos, comparados ao controle transplantado (MANGUEIRA et al., 2017).

Estes resultados são de grande importância, uma vez que a maioria dos antineoplásicos encontrados na clínica provocam toxicidade hematológica, com efeitos como anemia (RODGERS; GILREATH, 2019) e mielossupressão (BARRETO et al., 2014), normalmente causando alterações graves, os quais limitam a dose e o tempo do tratamento, podendo causar a morte do indivíduo. Este fato pode ser confirmado com os resultados obtidos pela droga padrão utilizada, 5-FU, que

provocou alterações em diferentes parâmetros analisados (CHCM, leucócitos totais, linfócitos, neutrófilos e monócitos), como já descrito na literatura (JEONG et al., 2019).

Considerando todos os dados apresentados, é possível inferir que o novo composto espiro-acridínico AMTAC-17 apresenta significativa atividade antitumoral em estudos *in vitro* e *in vivo*, com mecanismos envolvendo alterações no ciclo celular, indução de apoptose, bem como ação antioxidante, antiangiogênica e imunomoduladora, associado a baixa toxicidade. Esses resultados estimulam a continuação dos estudos com esta molécula, visando contribuir com o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos para o tratamento do câncer.

**Conclusão**

---

## 7 Conclusão

Com base nos estudos realizados é possível concluir que o novo composto espiro-acridínico AMTAC-17:

- Apresenta atividade antitumoral *in vitro* em linhagem celular de carcinoma colorretal humano (HCT-116), associada à interferência no ciclo celular, indução de apoptose e ação antioxidante;
- Possui índice de seletividade para células tumorais (HCT-116) superior à droga padrão doxorrubicina;
- Apresenta baixa toxicidade não clínica aguda em embriões/larvas de peixe-zebra e em camundongos, bem como baixo potencial genotóxico;
- Apresenta atividade antitumoral *in vivo* em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich, por interferir no ciclo celular e exercer efeitos antiangiogênicos e imunomoduladores;
- Apresenta baixa toxicidade *in vivo*, considerando parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos dos animais transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich submetidos ao tratamento de sete dias.

# Referências

## REFERÊNCIAS

- ABBOTT, M.; USTOYEV, Y. Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 35, n. 5, p. 150923, 2019.
- AGGARWAL, V. et al. Role of Reactive Oxygen Species in Cancer Progression: Molecular Mechanisms and Recent Advancements. **Biomolecules**, v. 9, n. 11, p. 735, 2019.
- AGRAWAL, S. S. et al. Cytotoxic and antitumor effects of brucine on Ehrlich ascites tumor and human cancer cell line. **Life Sciences**, v. 89, n. 5–6, p. 147–158, 2011.
- AGUILAR-CAZARES, D. et al. Contribution of Angiogenesis to Inflammation and Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 9, n. December, p. 1–10, 2019.
- AGUILAR, V.; FAJAS, L. Cycling through metabolism. **EMBO Molecular Medicine**, v. 2, n. 9, p. 338–348, 2010.
- AL-ABD, A. M. et al. Anti-angiogenic agents for the treatment of solid tumors: Potential pathways, therapy and current strategies - A review. **Journal of Advanced Research**, v. 8, n. 6, p. 591–605, 2017.
- ALMEIDA, R. N. DE et al. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 80, p. 72–76, 1999.
- ALMEIDA, S. M. V. DE et al. New spiro-acridines: DNA interaction, antiproliferative activity and inhibition of human DNA topoisomerases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 467–475, 2016.
- ALMEIDA, S. M. V. DE et al. DNA binding and Topoisomerase inhibition: How can these mechanisms be explored to design more specific anticancer agents? **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 1538–1556, 2017.
- AMBER, K. T. et al. TNF- $\alpha$ : A treatment target or cause of sarcoidosis? **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 29, n. 11, p. 2104–2111, 2015.
- ASLAM, M. S. et al. Side Effects of Chemotherapy in Cancer Patients and Evaluation of Patients Opinion about Starvation Based Differential Chemotherapy. **Journal of Cancer Therapy**, v. 05, n. 08, p. 817–822, 2014.

- ATTIA, S. M. Molecular cytogenetic evaluation of the mechanism of genotoxic potential of amsacrine and nocodazole in mouse bone marrow cells. **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, n. 6, p. 426–433, 2013.
- BABU, K. R.; TAY, Y. The Yin-Yang regulation of reactive oxygen species and microRNAs in cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 21, p. 5335, 2019.
- BAGHDADI, H. H. Targeting Cancer Cells using 3 - bromopyruvate for Selective Cancer Treatment. **Saudi Journal of Medicine & Medical Sciences**, v. 5, p. 9–19, 2017.
- BAHRAMI, A. et al. The therapeutic potential of targeting the BRAF mutation in patients with colorectal cancer. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 3, p. 2162–2169, 2018.
- BAJT, M. L. et al. Nuclear translocation of endonuclease G and apoptosis-inducing factor during acetaminophen-induced liver cell injury. **Toxicological Sciences**, v. 94, n. 1, p. 217–225, 2006.
- BAKER, K. J.; HOUSTON, A.; BRINT, E. IL-1 Family Members in Cancer; Two Sides to Every Story. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1–16, 2019.
- BAKHOUM, S. F.; LANDAU, D. A. Chromosomal instability as a driver of tumor heterogeneity and evolution. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 6, p. a029611, 2017.
- BAMBINO, K.; CHU, J. Zebrafish in Toxicology and Environmental Health. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 124, p. 331–367, 2017.
- BARRETO, J. N. et al. Antineoplastic Agents and the Associated Myelosuppressive Effects : A Review. **Journal of Pharmacy Practice**, v. 27, n. 5, p. 440–446, 2014.
- BATISTA, T. M. Toxicidade e atividade antitumoral do derivado acridínico (E)-1'-{(4-flúorbenzilideno)-amino}-5'oxo-1,5'diidro-10H-espiro[acridina- 9,2'-pirrol]-4'carbonitrila (AMTAC-07). **Tese de Doutorado. Universidade Federal da Paraíba**, p. 127, 2019.
- BELLATI, F. et al. Monoclonal antibodies in gynecological cancer: A critical point of view. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2011, n. Table 1, 2011.
- BELMONT, P. et al. Acridine and Acridone Derivatives, Anticancer Properties and Synthetic Methods: Where Are We Now? **Anti-Cancer Agents in Medicinal**

**Chemistry**, v. 7, n. 2, p. 139–169, 2007.

BENEVENTO, I. et al. The Addition of Target Therapy to Neoadjuvant Chemoradiotherapy in Locally Advanced Rectal Cancer : A Review. **Chemotherapy**, v. 62, p. 314–322, 2017.

BERNSTEIN, J. L. et al. ATM, radiation, and the risk of second primary breast cancer. **International Journal of Radiation Biology**, v. 93, n. 10, p. 1121–1127, 2017.

BERRETTA, M. et al. Angiogenesis inhibitors for the treatment of hepatocellular carcinoma. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. NOV, p. 1–11, 2016.

BHAT, N. et al. Toxic Effects of Different Doses of Cyclophosphamide on Liver and Kidney Tissue in Swiss Albino Mice: A Histopathological Study. **Ethiopian Journal of Health Science**, v. 26, n. 6, p. 711–716, 2018.

BHATIA, A.; KUMAR, Y. Cancer stem cells and tumor immunoediting : putting two and two together. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 12, n. 6, p. 605–607, 2016.

BHATTACHARYA, B.; MUKHERJEE, S. Cancer Therapy Using Antibiotics. **Journal of Cancer Therapy**, v. 06, n. 10, p. 849–858, 2015.

BIRKINSHAW, R. W.; CZABOTAR, P. E. The BCL-2 family of proteins and mitochondrial outer membrane permeabilisation. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 72, p. 152–162, 2017.

BLASIAK, J. DNA-Damaging Anticancer Drugs – A Perspective for DNA Repair-Oriented Therapy. **Current Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 15, p. 1488–1503, 2017.

BONDAR, T.; MEDZHITOV, R. The origins of tumor-promoting inflammation. **Cancer Cell**, v. 24, n. 2, p. 143–144, 2013.

BOROWA-MAZGAJ, B. et al. The overexpression of CPR and P450 3A4 in pancreatic cancer cells changes the metabolic profile and increases the cytotoxicity and pro-apoptotic activity of acridine antitumor agent, C-1748. **Biochemical Pharmacology**, v. 142, p. 21–38, 2017.

BOSCH, P. et al. New Poly(Propylene Imine) Dendrimer Modified with Acridine and Its Cu(II) Complex: Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity. **Materials**, v. 12, n. 18, p. 3020, 2019.

BOSE, S.; LE, A. Glucose Metabolism in Cancer. **Advances in Experimental**

**Medicine and Biology**, v. 1063, p. 3–12, 2018.

BRANDÃO, H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359–1369, 2010.

BRAUMÜLLER, H. et al. T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. **Nature**, v. 494, n. 7437, p. 361–365, 2013.

BRAUNBECK, T. et al. The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 21, p. 16247–16261, 2014.

BURKE, P. J. Mitochondria, Bioenergetics and Apoptosis in Cancer. **Trends in Cancer**, v. 3, n. 12, p. 857–870, 2017.

CAMPBELL-SALOME, G.; RAUSCHER, E. A. Family storytelling about hereditary cancer: Framing shared understandings of risk. **Journal of Genetic Counseling**, v. 00, p. 1–13, 2020.

CASTAÑEDA-GILL, J. M.; VISHWANATHA, J. K. Antiangiogenic mechanisms and factors in breast cancer treatment. **Journal of carcinogenesis**, v. 15, n. 1, p. 1, 2016.

CHAUHAN, D. et al. BAX/BAK-Induced Apoptosis Results in Caspase-8-Dependent IL-1 $\beta$  Maturation in Macrophages. **Cell Reports**, v. 25, n. 9, p. 2354- 2368.e5, 2018.

CHAVDA, S.; YONG, K. Multiple myeloma. **British Journal of Hospital Medicine**, v. 78, n. 2, p. C21–C27, 2017.

CHAZIN, E. D. L. et al. An Overview on the Development of New Potentially Active Camptothecin Analogs Against Cancer. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 953–962, 2014.

CHEN, F. et al. New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, p. 45, 2015a.

CHEN, G. et al. Effects of IL-4-590C/T (rs2243250) Polymorphism on the Susceptibility of Smoking-Related Cancer: A Meta-Analysis Involving 11,407 Subjects. **BioMed Research International**, v. 2019, p. 1–13, 2019.

CHEN, J. et al. Microtubule depolymerization and phosphorylation of c-Jun N-terminal kinase-1 and p38 were involved in gambogic acid induced cell cycle arrest and apoptosis in human breast carcinoma MCF-7 cells. **Life Sciences**, v. 83, n. 3–4, p. 103–109, 2008.

- CHEN, J. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic and Progression. p. 1–16, 2016.
- CHEN, K. et al. New benzimidazole acridine derivative induces human colon cancer cell apoptosis in vitro via the ROS-JNK signaling pathway. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 36, n. 9, p. 1074–1084, 2015b.
- CHIO, I. I. C.; TUVESON, D. A. ROS in Cancer: The Burning Question. **Trends in Molecular Medicine**, v. 23, n. 5, p. 411–429, 2017.
- CHOI, B. K. et al. Cancer immunotherapy using tumor antigen-reactive T cells. **Immunotherapy**, v. 10, n. 3, p. 235–245, 2018.
- CHOUDHARY, G. S.; AL-HARBI, S.; ALMASAN, A. Caspase-3 Activation Is a Critical Determinant of Genotoxic Stress-Induced Apoptosis. **Apoptosis and Cancer: Methods and Protocols: Second Edition**, v. 1219, p. 1–9, 2014.
- CHUFAROVA, N. et al. New tacrine–acridine hybrids as promising multifunctional drugs for potential treatment of Alzheimer’s disease. **Archiv der Pharmazie**, v. 351, n. 7, p. 1–11, 2018.
- CLAVO, B. et al. Modulation of Oxidative Stress by Ozone Therapy in the Prevention and Treatment of Chemotherapy-Induced Toxicity: Review and Prospects. **Antioxidants**, v. 8, n. 12, p. 588, 2019.
- CLEAL, K.; NORRIS, K.; BAIRD, D. Telomere Length Dynamics and the Evolution of Cancer Genome Architecture. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 482, 2018.
- COSSARIZZA, A. et al. Simultaneous analysis of reactive oxygen species and reduced glutathione content in living cells by polychromatic flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 4, n. 12, p. 1790–1797, 2009.
- COUSSENS, L. M.; ZITVOGEL, L.; PALUCKA, A. K. Neutralizing Tumor-Promoting Chronic Inflammation: A Magic Bullet? **Science**, v. 339, n. 6117, p. 286–291, 2013.
- CRUSZ, S. M.; BALKWILL, F. R. Inflammation and cancer: advances and new agents. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 12, n. 10, p. 584–596, 2015.
- D’ARCY, M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell Biology International**, v. 43, n. 6, p. 582–592, 2019.
- DAI, X. et al. Cancer Hallmarks , Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. **Journal of Cancer**, v. 7, n. 10, p. 1281–1294, 2016.
- DAVALLI, P. et al. Targeting Oxidatively Induced DNA Damage Response in Cancer:

- Opportunities for Novel Cancer Therapies. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 1–21, 2018.
- DAVIDSON, W. et al. Malnutrition and Chemotherapy-Induced Nausea and Vomiting: Implications for Practice. **Oncology Nursing Forum**, v. 39, n. 4, p. E340–E345, 2012.
- DAVIES, H. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, v. 417, n. 6892, p. 949–54, 2002.
- DE ALMEIDA, S. et al. Synthesis, DNA Binding, and Antiproliferative Activity of Novel Acridine-Thiosemicarbazone Derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 12, p. 13023–13042, 2015.
- DE ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Quimica Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.
- DE OLIVEIRA JÚNIOR, V. F. et al. Influência dos Anestésicos locais na imunomodulação e recorrência do câncer: uma revisão de literatura. **Materials and Methods**, v. pt4, 2014.
- DEA, N. et al. Spine Oncology – Primary Spine Tumors. **Neurosurgery**, v. 80, n. 3S, p. S124–S130, 2017.
- DEMEUNYNCK, M.; CHARMANTRAY, F.; MARTELLI, A. Interest of Acridine Derivatives in the Anticancer Chemotherapy. **Current Pharmaceutical Design**, v. 7, p. 1703–1724, 2001.
- DENNY, W. Chemotherapeutic Effects of Acridine Derivatives. **Medicinal Chemistry Reviews - Online**, v. 1, n. 3, p. 257–266, 2004.
- DI GIORGIO, C. et al. Evaluation of the mutagenic/clastogenic potential of 3,6-disubstituted acridines targeted for anticancer chemotherapy. **FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY**, v. 49, n. 11, p. 2773–2779, 2011.
- DOLAI, N. et al. Evaluation of antitumor activity and in vivo antioxidant status of *Anthocephalus cadamba* on Ehrlich ascites carcinoma treated mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 3, p. 865–870, 2012.
- DUFFY, E. A. et al. Nephrotoxicity: Evidence in patients receiving cisplatin therapy. **Clinical Journal of Oncology Nursing**, v. 22, n. 2, p. 175–183, 2018.
- EFREMOVA, M. et al. Targeting immune checkpoints potentiates immunoediting and

changes the dynamics of tumor evolution. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 32, 2018.

EGGERT, J. The Biology of Cancer: What Do Oncology Nurses Really Need to Know. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 27, n. 1, p. 3–12, 2011.

ENDERLING, H.; HLATKY, L.; HAHNFELDT, P. Immunoediting: Evidence of the multifaceted role of the immune system in self-metastatic tumor growth. **Theoretical Biology and Medical Modelling**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2012.

ERDEM, B. et al. Promoter hypermethylation of p16 and APC in gastrointestinal cancer patients. **Turkish Journal of Gastroenterology**, v. 25, n. 5, p. 512–517, 2014.

FABBRIZI, M. R. et al. Molecular and epigenetic regulatory mechanisms of normal stem cell radiosensitivity. **Cell Death Discovery**, v. 4, n. 1, p. 117, 2018.

FABREGAT, I. et al. TGF-Beta Signaling in Cancer Treatment. **Current pharmaceutical design**, v. 20, n. August, p. 1–14, 2013.

FALCÃO, M. A. P. et al. Zebrafish as an alternative method for determining the embryo toxicity of plant products: a systematic review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 35, p. 35015–35026, 2018.

FALTAS, B. Cornering metastases: therapeutic targeting of circulating tumor cells and stem cells. **Frontiers in Oncology**, v. 2, n. 68, p. 1–7, 2012.

FASTAIA, J.; DUMONT, A. E. Pathogenesis Of Ascites In Mice With Peritoneal Carcinomatosis. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 56, n. 3, p. 547–550, 1976.

FAUZEE, N. J. S.; DONG, Z.; WANG, Y. L. Taxanes: Promising anti-cancer drugs. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 12, n. 4, p. 837–851, 2011.

FERGUSON, L. R.; DENNY, W. A. The genetic toxicology of acridines. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 258, n. 2, p. 123–160, 1991.

FERLAY, J. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International Journal of Cancer**, v. 00, p. 1–13, 2018.

FERNANDES, P. D. et al. Characterization of the inflammatory response during Ehrlich ascitic tumor development. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 71, p. 83–89, 2015.

- FLEGG, J. A. et al. A Current Perspective on Wound Healing and Tumour-Induced Angiogenesis. **Bulletin of Mathematical Biology**, v. 82, n. 2, p. 23, 2020.
- FORRESTER, S. J. et al. Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. **Circulation Research**, v. 122, n. 6, p. 877–902, 2018.
- FRIDMAN, W. H. et al. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 14, n. 12, p. 717–734, 2017.
- FU, W. et al. A novel acridine derivative, LS-1-10 inhibits autophagic degradation and triggers apoptosis in colon cancer cells. **Cell Death & Disease**, v. 8, n. 10, p. e3086–e3086, 2017.
- FUS, Ł. P.; GÓRNICKA, B. Role of angiogenesis in urothelial bladder carcinoma. **Central European Journal of Urology**, v. 69, n. 3, p. 258–263, 2016.
- GACCHE, R. N.; MESHRAM, R. J. Targeting tumor micro-environment for design and development of novel anti-angiogenic agents arresting tumor growth. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 113, n. 2, p. 333–354, 2013.
- GAD, S. C. **Animal Models in Toxicology**. 2. ed. Flórida: CRC Press, 2007. v. 45
- GAJSKI, G. et al. Chemosphere Combined cyto/genotoxic activity of a selected antineoplastic drug mixture in human circulating blood cells. **Chemosphere**, v. 165, p. 529–538, 2016.
- GALADARI, S. et al. Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 104, n. August 2016, p. 144–164, 2017.
- GALDINO-PITTA, M. R. . et al. Niche for Acridine Derivatives in Anticancer Therapy. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 1256–1271, 2013.
- GALIMBERTI, V. E.; ROTHLIN, C. V.; GHOSH, S. Funerals and Feasts: The Immunological Rites of Cell Death. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 92, n. 4, p. 663–674, 2019.
- GHERMAN, A. et al. Molecular targeted treatment of metastatic colorectal cancer: the cardiovascular adverse effects of Bevacizumab and Cetuximab. **Medicine and Pharmacy Reports**, v. 90, n. 4, p. 377–384, 2017.
- GILLETTE, E. L.; GILLETTE, S. M. Principles of radiation therapy. **Seminars in veterinary medicine and surgery (small animal)**, v. 10, n. 3, p. 129–34, 1995.
- GIREK, M. et al. Novel tetrahydroacridine derivatives with iodobenzoic moieties

induce G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis in A549 non-small lung cancer and HT-29 colorectal cancer cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 460, n. 1–2, p. 123–150, 2019.

GIULIANO, S.; PAGÈS, G. Mechanisms of resistance to anti-angiogenesis therapies. **Biochimie**, v. 95, n. 6, p. 1110–1119, 2013.

GOLDAR, S. et al. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 6, p. 2129–2144, 2015.

GOUVEIA, R. et al. Synthesis, DNA and protein interactions and human topoisomerase inhibition of novel Spiroacridine derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 22, p. 5911–5921, 2018.

GREEN, D. S. et al. Combination immunotherapy with IL-4 Pseudomonas exotoxin and IFN- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  mediate antitumor effects in vitro and in a mouse model of human ovarian cancer. **Immunotherapy**, v. 11, n. 6, p. 483–496, 2019.

HAIDER, M. R. et al. Novel 9-(2-(1-arylethylidene)hydrazinyl)acridine derivatives: Target Topoisomerase 1 and growth inhibition of HeLa cancer cells. **Bioorganic Chemistry**, v. 88, n. March, p. 102962, 2019.

HANAHAN, D. Rethinking the war on cancer. **The Lancet**, v. 383, n. 9916, p. 558–563, 2014.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HAQUE, M. M.; DESAI, K. V. Pathways to Endocrine Therapy Resistance in Breast Cancer. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, n. August, p. 1–7, 2019.

HARADA, M. et al. Quinacrine Inhibits ICAM-1 Transcription by Blocking DNA Binding of the NF- $\kappa$ B Subunit p65 and Sensitizes Human Lung Adenocarcinoma A549 Cells to TNF- $\alpha$  and the Fas Ligand. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, p. 2603, 2017.

HARTNER, L. Chemotherapy for Oral Cancer. **Dental Clinics of NA**, v. 62, n. 1, p. 87–97, 2018.

HATINA, J. et al. Sarcoma Stem Cell Heterogeneity. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 1123, p. 95–118, 2019.

HAYASHI, M. The micronucleus test — most widely used in vivo genotoxicity test —.

**Genes and Environment**, v. 38, p. 18, 2016.

HE, L. et al. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 2, p. 532–553, 2017.

HERRERO, A. B. et al. Molecular mechanisms of p53 deregulation in cancer: An overview in multiple myeloma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, p. 2003, 2016.

HEVENER, K. et al. Recent developments in topoisomerase-targeted cancer chemotherapy. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 8, n. 6, p. 844–861, 2018.

HINSHAW, D. C.; SHEVDE, L. A. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. **Cancer Research**, v. 79, n. 18, p. 4557–4566, 2019.

HINZ, B.; LAGARES, D. Evasion of apoptosis by myofibroblasts: a hallmark of fibrotic diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 16, n. 1, p. 11–31, 2020.

HOFFMAN, R. M.; YANO, S. Tumor-specific S/G2-Phase cell cycle arrest of cancer cells by methionine restriction. **Methods in Molecular Biology**, v. 1866, p. 49–60, 2019.

HOLDSWORTH, S. R.; GAN, P.-Y. Cytokines: Names and Numbers You Should Care About. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 10, n. 12, p. 2243–2254, 2015.

HOLUBEC, L. et al. The role of cetuximab in the induction of anticancer immune response in colorectal cancer treatment. **Anticancer Research**, v. 36, n. 9, p. 4421–4426, 2016.

HSU, K. et al. Mutagenicity in a Molecule: Identification of Core Structural Features of Mutagenicity Using a Scaffold Analysis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0148900, 2016.

HU, Z. et al. Assessing the carcinogenic potential of low-dose exposures to chemical mixtures in the environment: focus on the cancer hallmark of tumor angiogenesis. **Carcinogenesis**, v. 36, n. Suppl 1, p. S184–S202, 2015.

HYNDMAN, I. J. Review : the Contribution of both Nature and Nurture to Carcinogenesis and Progression in Solid Tumours. **Cancer Microenvironment**, p. 63–69, 2016.

ICHIM, G.; TAIT, S. W. G. A fate worse than death: Apoptosis as an oncogenic process. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 8, p. 539–548, 2016.

INCA. ABC DO CÂNCER: Abordagens Básicas para o Controle do Câncer.

**Ministério da Saúde**, p. 128, 2011.

INCA. **Estimativa 2020 – Incidência de câncer no Brasil**. Disponível em:

<<https://www.inca.gov.br/noticias/brasil-tera-625-mil-novos-casos-de-cancer-cada-ano-do-trienio-2020-2022>>. Acesso em: 4 feb. 2020.

IORGA, A.; DARA, L.; KAPLOWITZ, N. Drug-induced liver injury: Cascade of events leading to cell death, apoptosis or necrosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 5, 2017.

ISRAEL, Y. et al. Benign and malignant salivary gland tumors-clinical and demographic characteristics. **Anticancer Research**, v. 36, n. 8, p. 4151–4154, 2016.

ITO, S. Et al. IL-4 blockade alters the tumor microenvironment and augments the response to cancer immunotherapy in a mouse model. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 66, n. 11, p. 1485–1496, 2017.

IWAMOTO, T. Clinical Application of Drug Delivery Systems in Cancer Chemotherapy: Review of the Efficacy and Side Effects of Approved Drugs. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 5, p. 715–718, 2013.

JAFRI, M. A. et al. Roles of telomeres and telomerase in cancer , and advances in telomerase- targeted therapies. **Genome Medicine**, v. 8, p. 69, 2016.

JAYAT, C.; RATINAUD, M. H. Cell cycle analysis by flow cytometry: Principles and applications. **Biology of the Cell**, v. 78, n. 1–2, p. 15–25, 1993.

JEON, J.-S. et al. Regulation of the Intracellular ROS Level Is Critical for the Antiproliferative Effect of Quercetin in the Hepatocellular Carcinoma Cell Line HepG2. **Nutrition and Cancer**, v. 71, n. 5, p. 861–869, 2019.

JEONG, J. et al. Mitigating Effect of 1-Palmitoyl-2-Linoleoyl-3-Acetyl-Rac-Glycerol (PLAG) on a Murine Model of 5-Fluorouracil-Induced Hematological Toxicity. **Cancers**, v. 11, p. 1811, 2019.

JERNEI, T. et al. Synthesis, Structure and In Vitro Cytotoxic Activity of Novel Cinchona — Chalcone Hybrids with 1,4-Disubstituted- and 1,5-Disubstituted 1,2,3-Triazole Linkers. **Molecules**, v. 24, p. 4077, 2019.

JIANG, B. et al. Structure-antioxidant activity relationship of active oxygen catalytic lignin and lignin-carbohydrate complex. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 139, p. 21–29, 2019.

- JIANG, X.; WANG, X. Cytochrome C -Mediated Apoptosis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 87–106, 2004.
- JOERGER, M. Treatment regimens of classical and newer taxanes Cytotoxic Reviews Godefridus J. Peters and Eric Raymond. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 77, n. 2, p. 221–233, 2016.
- JOHNSON, J. et al. Europe PMC Funders Group Targeting the RB-E2F pathway in breast cancer. **Oncogene**, v. 35, n. 37, p. 4829–4835, 2016.
- JOSEPHS, S. F. et al. Unleashing endogenous TNF-alpha as a cancer immunotherapeutic. **Journal of Translational Medicine**, v. 16, n. 1, p. 242, 2018.
- JULIUSSON, G.; HOUGH, R. Leukemia. **Progress in Tumor Research**, v. 43, p. 87–100, 2016.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. p. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- KACZANOWSKI, S. Apoptosis: Its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging. **Physical Biology**, v. 13, n. 3, p. 1–14, 2016.
- KALKAVAN, H.; GREEN, D. R. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, n. 1, p. 46–55, 2018.
- KATZ, H.; ALSHAREDI, M. Immunotherapy in triple - negative breast cancer. **Medical Oncology**, v. 35, p. 13, 2018.
- KETRON, A. C. et al. Amsacrine as a Topoisomerase II Poison: Importance of Drug–DNA Interactions. **Biochemistry**, v. 51, n. 8, p. 1730–1739, 2012.
- KEW, G. SEN; KOH, C. J. Strategies to Improve Persistent Adherence in Colorectal Cancer Screening. **Gut and Liver**, p. 1–7, 2019.
- KOTTSCHADE, L. A. The Future of Immunotherapy in the Treatment of Cancer. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 35, n. 5, p. 150934, 2019.
- KUKOWSKA, M. Amino acid or peptide conjugates of acridine/acridone and quinoline/quinolone-containing drugs. A critical examination of their clinical effectiveness within a twenty-year timeframe in antitumor chemotherapy and treatment of infectious diseases. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 109, p. 587–615, 2017.
- KUMAR, D. et al. Molecular signalling saga in tumour biology. **J Tumor**, v. 3, n. 2, p. 309–12, 2015.

- KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P. D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2018, n. 6, p. 095505, 2018.
- KUMAR, R.; KAUR, M.; KUMARI, M. Acridine: A versatile heterocyclic nucleus. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 69, n. 1, p. 3–9, 2012.
- KUMAR, S.; VOHRA, R.; MAHINDROO, N. Recent advances in cancer immunology and immunology-based anticancer therapies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 1491–1500, 2017.
- KUMARI, S. et al. Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival. **Biomarker Insights**, v. 13, p. 1–9, 2018.
- LAFAYETTE, E. A. et al. Synthesis, DNA Binding and Topoisomerase I Inhibition Activity of Thiazacridine and Imidazacridine Derivatives. **Molecules**, v. 18, p. 15035–15050, 2013.
- LALA, V.; MINTER, D. A. Liver Function Tests. In: **StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-**, p. 1–4, 2019.
- LEITE, C. A. V. G.; CALLADO, R. B.; RIBEIRO, R. A. Receptores tirosina-quinase: implicações terapêuticas no câncer. **revista Brasileira de Oncologia Clínica**, v. 8, n. 29, p. 130–142, 2012.
- LI, Z. et al. Endogenous interleukin-4 promotes tumor development by increasing tumor cell resistance to apoptosis. **Cancer Research**, v. 68, n. 21, p. 8687–8694, 2008.
- LIM, S.; KALDIS, P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. **Development**, v. 140, n. 15, p. 3079–3093, 2013.
- LIN, Y. et al. Autocrine VEGF signaling promotes cell proliferation through a PLC-dependent pathway and modulates Apatinib treatment efficacy in gastric cancer. v. 8, n. 7, p. 11990–12002, 2017.
- LISBOA, T. et al. Toxicity and Antitumor Activity of a Thiophene–Acridine Hybrid. **Molecules**, v. 25, n. 64, p. 1–12, 2020.
- LISSONI, P. Therapy implications of the role of interleukin-2 in cancer. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 13, n. 5, p. 491–498, 2016.
- LIU, J. et al. Improved efficacy of neoadjuvant compared to adjuvant immunotherapy to eradicate metastatic disease. **Cancer Discovery**, v. 6, n. 12, p. 1382–1399, 2016.
- LIU, J. The dualistic origin of human tumors. **Seminars in Cancer Biology**, v. 53, p.

1–16, 2018.

LOIZZI, V. et al. Biological Pathways Involved in Tumor Angiogenesis and Bevacizumab Based Anti-Angiogenic Therapy with Special References to Ovarian Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 9, p. 1967, 2017.

LU, X. Impact of IL-12 in Cancer. **Current Cancer Drug Targets**, v. 17, p. 682–697, 2017.

LUAN, X. et al. Exploration of acridine scaffold as a potentially interesting scaffold for discovering novel multi-target VEGFR-2 and Src kinase inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 11, p. 3312–3319, 2011.

LUGANO, R.; RAMACHANDRAN, M.; DIMBERG, A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. **Cellular and Molecular Life Sciences**, n. 0123456789, p. 1–26, 2019.

MAJIDI, J. et al. Target therapy of cancer: Implementation of monoclonal antibodies and nanobodies. **Human Antibodies**, v. 18, n. 3, p. 81–100, 2009.

MAJNOONI, M. B. et al. Antiangiogenic Effects of Coumarins against Cancer: From Chemistry to Medicine. **Molecules**, v. 24, n. 23, p. 4278, 2019.

MAJTNEROVÁ, P.; ROUŠAR, T. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. **Molecular Biology Reports**, v. 45, n. 5, p. 1469–1478, 2018.

MALMBERG, K. et al. Seminars in Immunology Natural killer cell-mediated immunosurveillance of human cancer. **Seminars in Immunology**, n. August, p. 0–1, 2017.

MAN, S. M. et al. Differential roles of caspase-1 and caspase-11 in infection and inflammation. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 45126, 2017.

MANGUEIRA, V. et al. A new acridine derivative induces cell cycle arrest and antiangiogenic effect on Ehrlich ascites carcinoma model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 90, p. 253–261, 2017.

MANGUEIRA, V. M. Efeitos antitumoral e antinocivo do n'-(6-cloro-2-metoxiacridin- 9-il)-2-cianoacetohidrazide (ACS-AZ), um novo derivado acridínico. **Tese de Doutorado. Universidade Federal da Paraíba**, p. 144, 2019.

MARCHI, S. et al. Mitochondrial and endoplasmic reticulum calcium homeostasis and cell death. **Cell Calcium**, v. 69, p. 62–72, 2018.

MARÇOLA, M.; RODRIGUES, C. E. Endothelial Progenitor Cells in Tumor

- Angiogenesis: Another Brick in the Wall. **Stem Cells International**, v. 2015, p. 1–10, 2015.
- MÁRMOL, I. et al. Colorectal carcinoma: A general overview and future perspectives in colorectal cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1, 2017.
- MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, N. L.; TAVÁREZ, S.; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, Z. I. In vitro toxicity assessment of zinc and nickel ferrite nanoparticles in human erythrocytes and peripheral blood mononuclear cell. **Toxicology in Vitro**, v. 57, n. January, p. 54–61, 2019.
- MATAMOROS, J. A. et al. Reduced Expression of IL-1 $\beta$  and IL-18 Proinflammatory Interleukins Increases the Risk of Developing Cervical Cancer. v. 20, p. 2715–2721, 2019.
- MATSON, J. P.; COOK, J. G. Cell cycle proliferation decisions: the impact of single cell analyses. **FEBS Journal**, v. 284, n. 3, p. 362–375, 2017.
- MAZZUCCO, M. B. et al. Antiviral activity of an N-allyl acridone against dengue virus. **Journal of Biomedical Science**, v. 22, n. 1, p. 29, 2015.
- MELINCOVICI, C. S. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) – key factor in normal and pathological angiogenesis. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 59, n. 2, p. 455–467, 2018.
- MENEZES, T. M. et al. Spiro-acridine inhibiting tyrosinase enzyme: kinetic, proteinligand interaction and molecular docking studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 289–297, 2018.
- MILLER, K. D. et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 66, n. 4, p. 271–289, 2016.
- MILLS, C. C.; KOLB, E.; SAMPSON, V. B. Development of chemotherapy with cell cycle inhibitors for adult and pediatric cancer therapy. **Cancer Research**, v. 78, n. 2, p. 320–325, 2018.
- MOKHTARI, R. B. et al. Combination therapy in combating cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 23, p. 38022–38043, 2017.
- MOLONEY, J. N.; COTTER, T. G. ROS signalling in the biology of cancer. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 80, p. 50–64, 2018.
- MORRIS, L. G. T.; CHAN, T. A. Therapeutic Targeting of Tumor Suppressor Genes.

**Cancer**, v. 121, n. 9, p. 1357–1368, 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MOUDI, M. et al. Vinca alkaloids. **International journal of preventive medicine**, v. 4, n. 11, p. 1231–5, 2013.

MOURA, A. P. G. et al. Essential oil from fruit of *Xylopia langsdorffiana*: antitumour activity and toxicity. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 12, p. 3093–3102, 2016.

MU, W.; LIU, L.-Z. Reactive Oxygen Species Signaling in Cancer Development. **Reactive Oxygen Species**, v. 4, n. 10, p. 251–265, 2017.

MUGNAINI, E. N.; GHOSH, N. Lymphoma. **Primary Care - Clinics in Office Practice**, v. 43, n. 4, p. 661–675, 2016.

MUKHOPADHYAY, S. et al. Autophagy and apoptosis: Where do they meet? **Apoptosis**, v. 19, n. 4, p. 555–566, 2014.

MURRAY, P. J. et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 14–20, 2014.

MUZ, B. et al. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. **Hypoxia**, v. 3, p. 83, 2015.

NAGATA, S.; TANAKA, M. Programmed cell death and the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 5, p. 333–340, 2017.

NAN, X. et al. EGFR TKI as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 43, p. 75712–75726, 2017.

NAWATA, C. M.; PANNABECKER, T. L. Mammalian urine concentration: a review of renal medullary architecture and membrane transporters. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 188, n. 6, p. 899–918, 2018.

NAYAK, R.; RAI, S. Renal Function Tests. **Essentials in Hematology and Clinical Pathology**, v. 10, p. 529–529, 2017.

NEGRONI, A.; CUCCHIARA, S.; STRONATI, L. Apoptosis, Necrosis, and Necroptosis in the Gut and Intestinal Homeostasis. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 1–10, 2015.

NICHOLSON, S. E.; KEATING, N.; BELZ, G. T. Natural killer cells and anti-tumor

- immunity. **Molecular Immunology**, n. November, p. 0–1, 2017.
- O' REILLY, E. et al. The Janus Face of Death Receptor Signaling during Tumor Immunoediting. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. OCT, p. 1–14, 2016.
- OECD. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. **OECD Guideline for the testing of chemicals**, p. 1–10, 1997.
- OECD. Acute oral toxicity – acute toxic class method. **OECD Guideline for Testing of Chemicals**, n. 423, p. 1–14, 2001.
- OECD. Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals n. 236. Paris: OECD Publishing**, p. 1–34, 2013.
- OSTROUMOV, D.; FEKETE, N.; MICHAEL, D. CD4 and CD8 T lymphocyte interplay in controlling tumor growth. **Cellular and Molecular Life Sciences**, n. 0123456789, 2017.
- OTHMAN, S.; KOZURKOVA, M. Sulfur Containing Acridine Derivatives in Preclinical Studies with Cancer Cell Lines. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 17, p. 1968–1975, 2018.
- OTTO, T.; SICINSKI, P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 2, p. 93–115, 2017.
- PAN, S. Y. et al. Evaluation of acute bis(7)-tacrine treatment on behavioral functions in 17-day-old and 30-day-old mice, with attention to drug toxicity. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 86, p. 778–783, 2007.
- PAPKE, B.; DER, C. J. Drugging RAS: Know the enemy. **Science**, v. 355, n. 6330, p. 1158–1163, 2017.
- PAPPO, A. S.; DIRKSEN, U. Rhabdomyosarcoma, ewing sarcoma, and other round cell sarcomas. **Journal of Clinical Oncology**, v. 36, n. 2, p. 168–179, 2018.
- PÁRAL, P. et al. Cell cycle and differentiation of Sca-1+ and Sca-1– hematopoietic stem and progenitor cells. **Cell Cycle**, v. 17, n. 16, p. 1979–1991, 2018.
- PASSARELLI, A. et al. Immune system and melanoma biology: a balance between immunosurveillance and immune escape. **Oncotarget**, v. 8, n. 62, p. 106132–106142, 2017.
- PELKA, K.; DE NARDO, D. Emerging concepts in innate immunity. **Methods in Molecular Biology**, v. 1714, p. 1–18, 2018.
- PÉREZ, S. A. et al. New Acridine Thiourea Gold(I) Anticancer Agents: Targeting the

- Nucleus and Inhibiting Vasculogenic Mimicry. **ACS Chemical Biology**, v. 12, p. 1524–1537, 2017.
- PETERS, J. M.; GONZALEZ, F. J. The Evolution of Carcinogenesis. **Toxicological Sciences**, v. 165, n. 2, p. 272–276, 2018.
- PETTY, A. J.; YANG, Y. Tumor-associated macrophages: implications in cancer immunotherapy. **Immunotherapy**, v. 9, p. 289–302, 2017.
- PI, R. et al. Tacrine-6-ferulic acid, a novel multifunctional dimer, inhibits amyloid- $\beta$ -mediated Alzheimer's disease-associated pathogenesis in vitro and in vivo. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. 1–8, 2012.
- PIHÁN, P.; CARRERAS-SUREDA, A.; HETZ, C. BCL-2 family: Integrating stress responses at the ER to control cell demise. **Cell Death and Differentiation**, v. 24, n. 9, p. 1478–1487, 2017.
- PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, 2015.
- PISTRITTO, G. et al. Apoptosis as anticancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. **Aging**, v. 8, n. 4, p. 603–619, 2016.
- PITA, J. C. L. R. Avaliação da atividade antitumoral e toxicidade do trachylobano-360 de *Xylopia langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (Annonaceae). **Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Paraíba**, p. 105, 2010.
- PLUMMER, C. et al. Treatment specific toxicities: Hormones, antihormones, radiation therapy. **Seminars in Oncology**, v. 46, n. 6, p. 414–420, 2019.
- POBEZINSKAYA, Y. L.; LIU, Z. The role of TRADD in death receptor signaling. **Cell Cycle**, v. 11, n. 5, p. 871–876, 2012.
- POOLE, C. J.; VAN RIGGELEN, J. MYC—Master Regulator of the Cancer Epigenome and Transcriptome. **Genes**, v. 8, n. 5, p. 142, 2017.
- POPRAC, P. et al. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 38, n. 7, p. 592–607, 2017.
- PRASAD, S.; SRIVASTAVA, S. K. Oxidative Stress and Cancer: Chemopreventive and Therapeutic Role of Triphala. **Antioxidants**, v. 9, n. 1, p. 72, 2020.
- PROKHOROVA, E. A. et al. Apoptosis regulation by subcellular relocation of caspases. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

- PUGAZHENDHI, A. et al. Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems. **Life Sciences**, v. 200, n. 2017, p. 26–30, 2018.
- PUYO, S.; MONTAUDON, D.; POURQUIER, P. From old alkylating agents to new minor groove binders. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 89, n. 1, p. 43–61, 2014.
- QUISPE-TINTAYA, W. et al. Bleomycin-induced genome structural variations in normal, non-tumor cells. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 16523, 2018.
- RENVOIZÉ, C. et al. Apoptosis: Identification of dying cells. **Cell Biology and Toxicology**, v. 14, n. 2, p. 111–120, 1998.
- RENZI, D.; VALTOLINA, M.; FORSTER, R. The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system. **Atla**, v. 21, p. 89–96, 1993.
- RIBEIRO FRANCO, P. I. et al. Tumor microenvironment components: Allies of cancer progression. **Pathology - Research and Practice**, v. 216, n. 1, p. 152729, 2020.
- RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1458–1461, 2006.
- RIEHELMANN, R.; GROTHEY, A. Antiangiogenic therapy for refractory colorectal cancer: Current options and future strategies. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 9, n. 2, p. 106–126, 2017.
- RILEY, B. D. et al. Essential elements of genetic cancer risk assessment, counseling, and testing: Updated recommendations of the National Society of genetic Counselors. **Journal of Genetic Counseling**, v. 21, n. 2, p. 151–161, 2012.
- RODGERS, G. M.; GILREATH, A. The Role of Intravenous Iron in the Treatment of Anemia Associated with Cancer and Chemotherapy. **Acta Haematologica**, v. 142, p. 13–20, 2019.
- ROMERO-LAORDEN, N.; CASTRO, E. Inherited mutations in DNA repair genes and cancer risk. **Current Problems in Cancer**, 2017.
- ROOS, W. P.; THOMAS, A. D.; KAINA, B. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 1, p. 20–33, 2016.
- RUTKOWSKI, D. T. Liver function and dysfunction - a unique window into the physiological reach of ER stress and the unfolded protein response. **The FEBS**

- Journal**, v. 286, n. 2, p. 356–378, 2019.
- SAFARZADEH, E.; SHOTORBANI, S. S.; BARADARAN, B. Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 4, n. SUPPL.1, p. 421–427, 2014.
- SAHA, S. K. et al. Correlation between Oxidative Stress, Nutrition, and Cancer Initiation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, p. 1544, 2017.
- SAITO, R. et al. **Fundamentos de Oncologia Molecular**. São Paulo: Atheneu, 2015.
- SALEM, O. M. et al. New spiro tria(thia)zolidine-acridines as topoisomerase inhibitors, DNA binders and cytostatic compounds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 690–700, 2016.
- SANKPAL, U. T. et al. Environmental factors in causing human cancers: Emphasis on tumorigenesis. **Tumor Biology**, v. 33, n. 5, p. 1265–1274, 2012.
- SANTOS, J. et al. Th1-Biased Immunomodulation and In Vivo Antitumor Effect of a Novel Piperine Analogue. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, p. 2594, 2018.
- SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular Research**, v. 45, n. 3, p. 528–537, 2000.
- SAWA-WEJKSZA, K.; KANDEFER-SZERSZEŃ, M. Tumor-Associated Macrophages as Target for Antitumor Therapy. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 66, n. 2, p. 97–111, 2018.
- SERAFIM, V. D. L. et al. New Thiophene-Acridine Compounds: Synthesis, Antileishmanial Activity, DNA Binding, Chemometric and Molecular Docking Studies. p. 0–2, 2018.
- SHALAPOUR, S.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil. **The journal of clinical investigation**, v. 125, n. 9, p. 3347–3355, 2015.
- SHARMA, G. N.; GUPTA, G.; SHARMA, P. A Comprehensive Review of Free Radicals, Antioxidants, and Their Relationship with Human Ailments. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, v. 28, n. 2, p. 139–154, 2018.
- SHEN, J. et al. IL-1 $\beta$  induces apoptosis and autophagy via mitochondria pathway in human degenerative nucleus pulposus cells. **Scientific Reports**, v. 7, n. August

2016, p. 1–12, 2017.

SHIELDS, M. Chemotherapeutics. **Pharmacognosy**, p. 295–313, 2017.

SHIROTA, H. et al. IL4 from T follicular helper cells downregulates antitumor immunity. **Cancer Immunology Research**, v. 5, n. 1, p. 61–71, 2017.

SIMONE, V. et al. Targeting angiogenesis in biliary tract cancers: An open option. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 2, 2017.

SISTIGU, A. et al. Deciphering the loop of epithelial-mesenchymal transition, inflammatory cytokines and cancer immunoediting. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 36, p. 67–77, 2017.

SMITH, E. M.; PENDLEBURY, D. F.; NANDAKUMAR, J. Structural biology of telomeres and telomerase. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, n. 1, p. 61–79, 2020.

SOLÍS-MARTÍNEZ, R. et al. Macrófagos asociados a tumores contribuyen a la progresión del cáncer de próstata. **Gaceta Mexicana de Oncología**, v. 14, n. 2, p. 97–102, 2015.

SOMMA, S. DI et al. G-Quadruplex Binders Induce Immunogenic Cell Death Markers in Aggressive Breast Cancer Cells. **Cancers**, v. 11, p. 1797, 2019.

SONG, Y.; YANG, J. M. Role of interleukin (IL)-17 and T-helper (Th)17 cells in cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, n. II, 2017.

SORENSEN, E. W. et al. IL-12 Suppresses Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3 Expression on Tumor Vessels by Two Distinct IFN- $\gamma$ -Dependent Mechanisms. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 4, p. 1858–1866, 2010.

SOUSA, T. K. G. DE. Potencial antitumoral e toxicidade do 5'-oxo-1'-fenil-1',5'-diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (ACMD). **Tese de Doutorado. Universidade Federal da Paraíba**, p. 175, 2019.

STRATIGOS, M. et al. Targeting angiogenesis in small cell lung cancer. **Translational Lung Cancer Research**, v. 5, n. 4, p. 389–400, 2016.

STRAUSS, J. et al. First-in-human phase I trial of a tumor-targeted cytokine (NHS-IL12) in subjects with metastatic solid tumors. **Clinical Cancer Research**, v. 25, n. 1, p. 99–109, 2019.

STURROCK, M. et al. Anti-angiogenic drug scheduling optimisation with application to colorectal cancer. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 2018.

- SUGITANI, N. et al. XPA: A key scaffold for human nucleotide excision repair. **Norie. DNA Repair**, v. 44, p. 123–135, 2016.
- SUZUKI, A. et al. Targeting of IL-4 and IL-13 receptors for cancer therapy. **Cytokine**, v. 75, n. 1, p. 79–88, 2015.
- SZAKÁCS, G. et al. Targeting the Achilles Heel of Multidrug-Resistant Cancer by Exploiting the Fitness Cost of Resistance Gergely Szaka c. **Chemical reviews**, v. 114, p. 5753–5774, 2014.
- TAIT, S. W. G.; GREEN, D. R. Mitochondria and cell death: Outer membrane permeabilization and beyond. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 9, p. 621–632, 2010.
- TALMADGE, J. E.; FIDLER, I. J. The biology of cancer metastasis: historical perspective. **Cancer research**, v. 70, n. 14, p. 5649–69, 2010.
- TAN, B. L.; NORHAIZAN, M. E. Manilkara zapota (L.) P. Royen leaf water extract triggered apoptosis and activated caspase-dependent pathway in HT-29 human colorectal cancer cell line. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 110, n. June 2018, p. 748–757, 2019.
- TAN, E. P.; DUNCAN, F. E.; SLAWSON, C. The sweet side of the cell cycle. **Biochemical Society Transactions**, v. 45, n. 2, p. 313–322, 2017.
- TAN, P. PAN et al. Mitochondria-Mediated Pathway Regulates C2C12 Cell Apoptosis Induced by Fluoride. **Biological Trace Element Research**, v. 185, n. 2, p. 440–447, 2018.
- THOMAS, S. A. et al. Adverse effects of 5-fluorouracil: Focus on rare side effects. **Cancer Cell & Microenvironment**, v. 3, p. e1266, 2016.
- TIWARI, M. Antimetabolites: Established cancer therapy. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 8, n. 4, p. 510, 2012.
- TOBÓLSKA, S. et al. Genotoxicity and mutagenicity of inosine pranobex. **Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 2, p. 207–213, 2018.
- TOLBA, M. F.; OMAR, H. A. Immunotherapy, an evolving approach for the management of triple negative breast cancer: Converting non-responders to responders. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 122, n. November 2017, p. 202–207, 2018.
- TOMPKINS, K. D.; THORBURN, A. Regulation of Apoptosis by Autophagy to

Enhance Cancer Therapy. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 92, n. 4, p. 707–718, 2019.

TORÉN, W. et al. Thymidylate synthase : a predictive biomarker in resected colorectal liver metastases receiving 5-FU treatment. **Future oncology**, v. 14, n. 4, p. 343–351, 2018.

TREFTS, E.; WILLIAMS, A. S.; WASSERMAN, D. H. Exercise and the Regulation of Hepatic Metabolism. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 135, p. 203–225, 2015.

TREPS, L.; GAVARD, J. L'angiogénèse tumorale. **médecine/sciences**, v. 31, n. 11, p. 989–995, 2015.

TUGUES, S. et al. New insights into IL-12-mediated tumor suppression. **Cell Death & Differentiation**, v. 22, n. 2, p. 237–246, 2015.

VAKIFAHMETOGLU-NORBERG, H.; OUCHIDA, A. T.; NORBERG, E. The role of mitochondria in metabolism and cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 482, n. 3, p. 426–431, 2017.

VAN HOUTEN, B.; SANTA-GONZALEZ, G. A.; CAMARGO, M. DNA repair after oxidative stress: Current challenges. **Current Opinion in Toxicology**, v. 7, n. 5, p. 9–16, 2018.

VIALLARD, C.; LARRIVÉE, B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. **Angiogenesis**, v. 20, n. 4, p. 409–426, 2017.

VICTORINO, V. et al. Oxidative Stress, Redox Signaling and Cancer Chemoresistance: Putting Together the Pieces of the Puzzle. **Current Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 28, p. 3211–3226, 2014.

VILKOVÁ, M.; PROKAIIOVÁ, M.; IMRICH, J. Spontaneous cyclization of (acridin-9-ylmethyl)thioureas to spiro [dihydroacridine-9'(10'H),5-imidazolidine]-2-thiones, a novel type of acridine spirocycles. **Tetrahedron**, v. 70, n. 4, p. 944–961, 2014.

VISCONTI, R.; DELLA MONICA, R.; GRIECO, D. Cell cycle checkpoint in cancer: a therapeutically targetable double-edged sword. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 35, n. 1, p. 153, 2016.

WANG, M. et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 5, p. 761–773, 2017a.

WANG, N. et al. Current Development of ROS-Modulating Agents as Novel Antitumor

- Therapy. **Current Cancer Drug Targets**, v. 17, n. 2, p. 122–136, 2017b.
- WANG, X. et al. Interdependent and independent multidimensional role of tumor microenvironment on hepatocellular carcinoma. **Cytokine**, v. 103, n. March 2018, p. 150–159, 2017c.
- WANG, X. et al. Imetelstat, a telomerase inhibitor, is capable of depleting myelofibrosis stem and progenitor cells. **Blood Advances**, v. 2, n. 18, p. 2378–2388, 2018a.
- WANG, Y. et al. The Application of Natural Products in Cancer Therapy by Targeting Apoptosis Pathways. **Current Drug Metabolism**, v. 19, n. 9, p. 739–749, 2018b.
- WÄSCH, R.; ROBBINS, J. A.; CROSS, F. R. The emerging role of APC/C Cdh1 in controlling differentiation, genomic stability and tumor suppression. **Oncogene**, v. 29, n. 1, p. 1–10, 2010.
- WATERS, J. P.; POBER, J. S.; BRADLEY, J. R. Tumour necrosis factor and cancer. **The Journal of Pathology**, v. 230, n. 3, p. 241–248, 2013.
- WEINSTEIN, A. M.; STORKUS, W. J. Therapeutic Lymphoid Organogenesis in the Tumor Microenvironment. **Advances in Cancer Research**, v. 128, p. 197–233, 2015.
- WELCH, D.; FISHER, P. Cytokine regulation of metastasis and tumorigenicity. In: **Molecular and Cellular Basis of Metastasis: Road to Therapy**. 1st. ed. Academic Press: Elsevier, 2016. p. 390.
- WENZEL, E. S.; SINGH, A. T. K. Cell-cycle checkpoints and aneuploidy on the path to cancer. **In Vivo**, v. 32, n. 1, p. 1–5, 2018.
- WHO | Cancer**. Disponível em:  
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 5 jan. 2020.
- WIMAN, K. G.; ZHIVOTOVSKY, B. Understanding cell cycle and cell death regulation provides novel weapons against human diseases. **Journal of Internal Medicine**, v. 281, n. 5, p. 483–495, 2017.
- WU, H. et al. Impact of germline and somatic BRCA1/2 mutations: Tumor spectrum and detection platforms. **Gene Therapy**, v. 24, n. 10, p. 601–609, 2017.
- XU, H. Th1 cytokine-based immunotherapy for cancer. **Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International**, v. 13, n. 5, p. 482–494, 2014.
- XU, Q.; HIGGINS, T.; CEMBROWSKI, G. S. Limiting the Testing of AST. **American**

- Journal of Clinical Pathology**, v. 144, n. 3, p. 423–426, 2015.
- XU, X. et al. Advances in Engineering Cells for Cancer Immunotherapy. **Theranostics**, v. 9, n. 25, p. 7889–7905, 2019.
- XUE, G. et al. IL-4 together with IL-1 $\beta$  induces antitumor Th9 cell differentiation in the absence of TGF- $\beta$  signaling. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1376, 2019.
- YADAV, L. et al. Tumour angiogenesis and angiogenic inhibitors: A review. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9, n. 6, p. XE01–XE05, 2015.
- YANG, H. et al. The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 37, n. 1, p. 1–10, 2018.
- YANG, H. W. et al. Competing memories of mitogen and p53 signalling control cell-cycle entry. **Nature**, v. 549, n. 7672, p. 404–408, 2017.
- YAO, M. et al. Cytokine Regulation of Metastasis and Tumorigenicity. **Advances in Cancer Research**, v. 132, p. 265–367, 2016.
- YARCHOAN, M. et al. Targeting neoantigens to augment antitumour immunity. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 4, p. 209–222, 2017.
- YEAGER, C. E.; OLSEN, E. A. Treatment of chemotherapy-induced alopecia. **Dermatologic Therapy**, v. 24, p. 432–442, 2011.
- YOU, F.; GAO, C. Topoisomerase Inhibitors and Targeted Delivery in Cancer Therapy. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 9, p. 713–729, 2019.
- YU, X.; CHE, Z.; XU, H. Recent Advances in the Chemistry and Biology of Podophyllotoxins. **Chemistry - A European Journal**, v. 23, n. 19, p. 4467–4526, 2017.
- YUAN, Y. et al. TNF- $\alpha$  induces autophagy through ERK1/2 pathway to regulate apoptosis in neonatal necrotizing enterocolitis model cells IEC-6. **Cell Cycle**, v. 17, n. 11, p. 1390–1402, 2018.
- ZAMARRON, B. F.; CHEN, W. Dual Roles of Immune Cells and Their Factors in Cancer Development and Progression. **International Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 5, p. 651–658, 2011.
- ZAVYALOVA, M. V et al. Intravasation as a Key Step in Cancer Metastasis. **BIOCHEMISTRY (Moscow)**, v. 84, n. 7, p. 762–772, 2019.
- ZHANG, B. et al. Acridine and its derivatives: a patent review (2009 – 2013). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 24, n. 6, p. 647–664, 2014.

- ZHANG, B. et al. Design, synthesis and biological research of novel N-phenylbenzamide-4-methylamine acridine derivatives as potential topoisomerase I/II and apoptosis-inducing agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 29, n. 23, p. 126714, 2019.
- ZHANG, G.-M.; GUO, X.-X.; ZHANG, G.-M. Limiting the testing of urea: Urea along with every plasma creatinine test? **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 31, n. 5, p. e22103, 2017.
- ZHANG, J.; BABIC, A. Regulation of the MET oncogene: Molecular mechanisms. **Carcinogenesis**, v. 37, n. 4, p. 345–355, 2015.
- ZHANG, L.; SHAY, J. W. Multiple Roles of APC and its Therapeutic Implications in Colorectal Cancer. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 109, n. 8, 2017.
- ZHAO, Z. et al. Cooperative loss of RAS feedback regulation drives myeloid leukemogenesis. **Nature Genetics**, v. 47, n. 5, p. 539–543, 2015.
- ZHENG, L. et al. Role of autophagy in tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis of osteoblast cells. **Journal of Investigative Medicine**, v. 65, n. 6, p. 1014–1020, 2017.
- ZHOU, Q. et al. 3-Nitroacridine derivatives arrest cell cycle at G0/G1 phase and induce apoptosis in human breast cancer cells may act as DNA-target anticancer agents. **Life Sciences**, v. 206, p. 1–9, 2018.
- ZHOU, Y. et al. The emerging roles and therapeutic potential of cyclin-dependent kinase 11 (CDK11) in human cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 26, 2016.
- ZHOU, Z.-F. et al. Intratumoral IL-12 Gene Therapy Inhibits Tumor Growth In A HCC-Hu-PBL-NOD/SCID Murine Model. **OncoTargets and Therapy**, v. 12, p. 7773–7784, 2019.
- ZHU, C. et al. Selective Intratumoral Drug Release and Simultaneous Inhibition of Oxidative Stress by a Highly Reductive Nanosystem and Its Application as an Anti-tumor Agent. **Theranostics**, v. 10, n. 3, p. 1166–1180, 2020.
- ZUNDLER, S.; NEURATH, M. F. Interleukin-12: Functional activities and implications for disease. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 26, n. 5, p. 559–568, 2015.

*Anexo*

---

## ANEXO A - Parecer da Comissão de Ética e Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde

UFPB - CENTRO DE CIÊNCIAS  
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DA PARAÍBA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ESTUDO DA TOXICIDADE DE PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) DE VOLUNTÁRIOS SADIOS

**Pesquisador:** MARIANNA VIEIRA SOBRAL CASTELLO BRANCO

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 22986519.0.0000.5188

**Instituição Proponente:** Centro De Ciências da Saúde

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.715.689

**Apresentação do Projeto:**

Bem apresentado

**Objetivo da Pesquisa:**

Bem definido

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Realizada

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Viável e de impacto

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Apresentados

**Recomendações:**

vide conclusões

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

A pesquisa pode ser iniciada

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou a execução do referido projeto de pesquisa. Outrossim,

**Endereço:** UNIVERSITARIO S/N

**Bairro:** CASTELO BRANCO

**CEP:** 58.051-900

**UF:** PB

**Município:** JOAO PESSOA

**Telefone:** (83)3216-7791

**Fax:** (83)3216-7791

**E-mail:** comitedeetica@ccs.ufpb.br

UFPB - CENTRO DE CIÊNCIAS  
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DA PARAÍBA



Continuação do Parecer: 3.715.689

informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à submissão do Relatório Final na Plataforma Brasil, via Notificação, para fins de apreciação e aprovação por este egrégio Comitê.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1428708.pdf	02/11/2019 18:11:31		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_PBMC_CEP_Versao_Final.pdf	02/11/2019 18:09:37	MARIANNA VIEIRA SOBRAL CASTELLO BRANCO	Aceito
Outros	Certidao_de_aprovacao_PgPNSB.PDF	15/09/2019 19:44:05	MARIANNA VIEIRA SOBRAL CASTELLO BRANCO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_de_Anuencia_CCS.PDF	15/09/2019 19:43:10	MARIANNA VIEIRA SOBRAL CASTELLO BRANCO	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.PDF	15/09/2019 19:34:05	MARIANNA VIEIRA SOBRAL CASTELLO BRANCO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	05/09/2019 19:08:32	MARIANNA VIEIRA SOBRAL CASTELLO BRANCO	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

JOAO PESSOA, 20 de Novembro de 2019

---

Assinado por:  
Eliane Marques Duarte de Sousa  
(Coordenador(a))

Endereço: UNIVERSITARIO S/N  
Bairro: CASTELO BRANCO CEP: 58.051-900  
UF: PB Município: JOAO PESSOA  
Telefone: (83)3216-7791 Fax: (83)3216-7791 E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br

## ANEXO B - Certidão da Comissão de Ética no Uso de Animais para peixe-zebra (*Danio rerio*)



Universidade  
Federal da  
Paraíba

Comissão de Ética no  
Uso de Animais

Reitoria



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE NOVOS ANÁLOGOS SINTÉTICOS PIPERIDÍNICOS, QUINOLÍNICOS E ACRIDÍNICOS EM MODELO DE PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)", protocolada sob o CEUA nº 5900310718 (ID 000348), sob a responsabilidade de **Marianna Vieira Sobral e equipe; Davi Felipe Farias; Rafael Carlos Ferreira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 06/09/2018.

We certify that the proposal "EVALUATION OF TOXICITY OF NEW SYNTHETIC PIPERIDINIC, QUINOLINIC AND ACRIDINE ANALOGS IN PEIXE-ZEBRA MODEL (*Danio rerio*)", utilizing 2400 Fishes (males and females), protocol number CEUA 5900310718 (ID 000348), under the responsibility of **Marianna Vieira Sobral and team; Davi Felipe Farias; Rafael Carlos Ferreira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 09/06/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [09/2018](#) a [09/2021](#)

Área: [Ciências Farmacêuticas](#)

Origem: [Unidade de Produção de Organismos Modelo Não Convencionais \(UniPOM\)](#)

Espécie: [Peixes](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [1 a 3 horas](#)

N: [2400](#)

Linhagem: [Danio rerio](#)

Peso: [0 a 0 g](#)

Local do experimento: Laboratório de Avaliação de Risco de Novas Tecnologias (LabRisco). Este laboratório divide o espaço experimental com a UniPOM.

João Pessoa, 28 de dezembro de 2018

Profa. Dra. Islania Gisela Albuquerque Gonçalves  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra  
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Paraíba

## ANEXO C - Certidão da Comissão de Ética no Uso de Animais para camundongos *Swiss (Mus musculus)*



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**



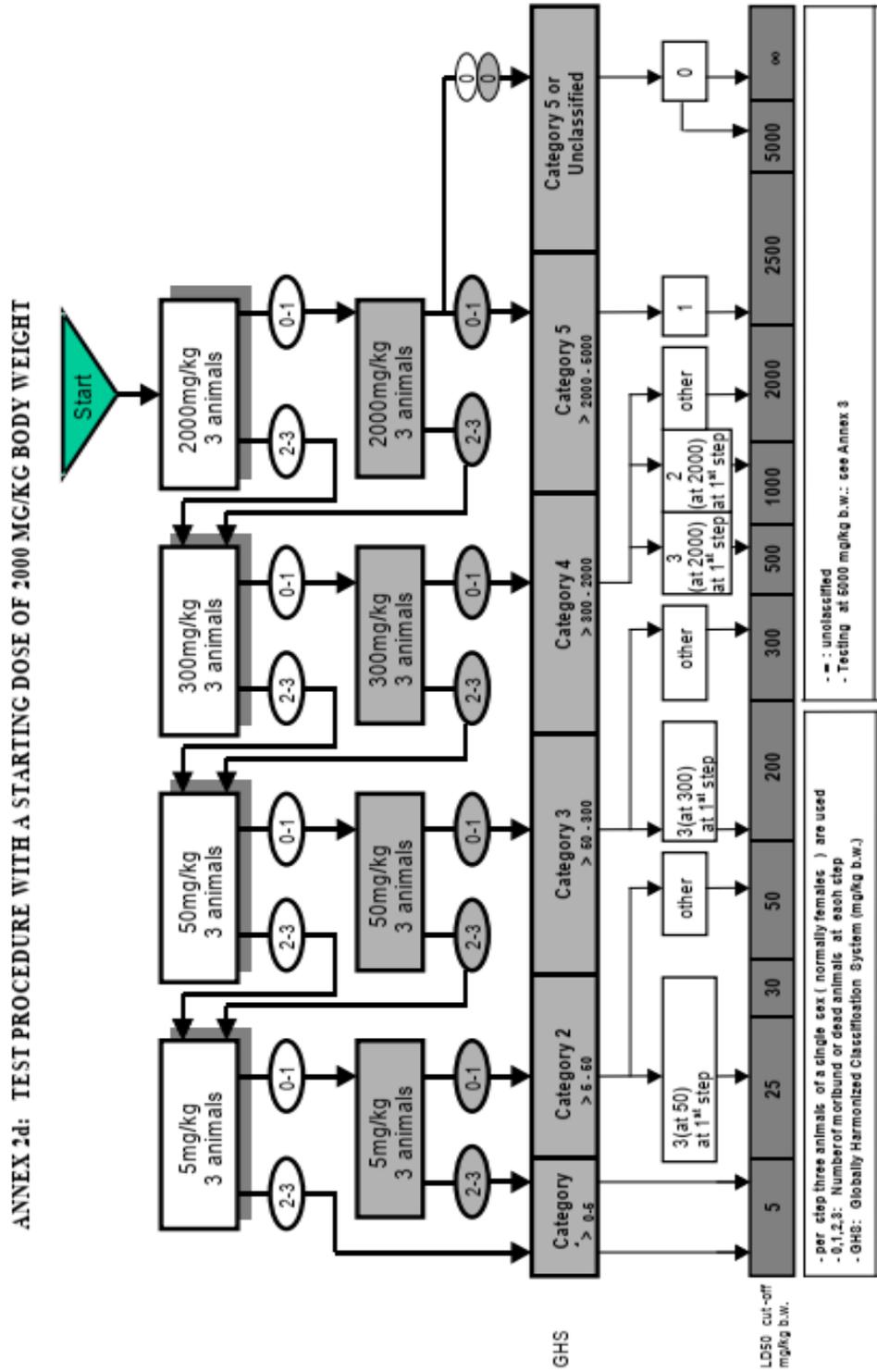
### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Estudo do efeito anticâncer e anti-Leishmania de uma nova série de compostos de selênio”, protocolo nº 163/2015 sob a responsabilidade do pesquisador Dr. **Marianna Vieira Sobral** – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB).

Vigência do Projeto	2016 – 2020
Espécie/linhagem	Camundongo
Número de animais	296
Idade/Peso	-
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Prof. Thomas George

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra  
CEUA-UFPB

**ANEXO D - Fluxograma de realização do teste de toxicidade aguda com dose inicial de 2000 mg/kg**



Fonte: OECD. Test nº 423: Acute oral toxicity – acute toxic class method, 2001.

## ANEXO E - Triagem Farmacológica Comportamental

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso				
	0 min	15 min	30 min	60 min	4 h
<b>1 – SNC</b>					
<b>a – Estimulante</b>					
Hiperatividade					
Irritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
Outras _____					
<b>b – Depressora</b>					
Hipnose					
Ptose					
Sedação					
Anestesia					
Ataxia					
Reflexo do endireitamento					
Catatonía					
Analgesia					
Resposta ao toque diminuído					
Perda do reflexo corneal					
Perda do reflexo auricular					
<b>c – Outros comportamentos</b>					
Ambulação					
Bocejo excessivo					
Limpeza					
Levantar					
Escalar					
Vocalizar					
Sacudir a cabeça					
Contorções abdominais					
Abdução das patas do trem posterior					
Pedalar					
Estereotípia					
<b>2 - SN AUTÔNOMO</b>					
Diarréia					
Constipação					
Defecação aumentada					
Respiração forçada					
Lacrimejamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tônus muscular					
Força para agarrar					
<b>3 – MORTE</b>					

**Fonte:** ALMEIDA et al. (1999)

*Apêndice*

---

Apêndice A – Artigo publicado na revista *Molecules* (Fator de impacto 3,060; Qualis A2 – Farmácia)



Communication

## Antitumor Effect of a Novel Spiro-Acridine Compound is Associated with Up-Regulation of Th1-Type Responses and Antiangiogenic Action

Daiana K. Frade Silva <sup>1</sup>, Sâmia S. Duarte <sup>1</sup>, Thaís M. H. Lisboa <sup>1</sup>, Rafael C. Ferreira <sup>1</sup>, Ana Luíza de O. Lopes <sup>1</sup>, Deyse C. M. Carvalho <sup>2</sup>, Sandra Rodrigues-Mascarenhas <sup>1,2</sup>, Patricia Mirella da Silva <sup>3</sup>, Miguel A. S. Pinheiro Segundo <sup>4</sup>, Ricardo O. de Moura <sup>5</sup>, Karina C. P. Medeiros <sup>6</sup> and Marianna V. Sobral <sup>1,7,\*</sup>

<sup>1</sup> Post Graduation Program in Bioactive Natural and Synthetic Products, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB 58051-970, Brazil; daiana.frade@gmail.com (D.K.F.S.); samiasduarte@gmail.com (S.S.D.); thaimangeon@gmail.com (T.M.H.L.); rafaelcarlos@ltf.ufpb.br (R.C.F.); ana.lopes0407@gmail.com (A.L.d.O.L.); sandra@cbiotec.ufpb.br (S.R.-M.)

<sup>2</sup> Multicenter Postgraduate Program in Physiological Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB 58051-970, Brazil; deysecmc@gmail.com

<sup>3</sup> Department of Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB 58051-970, Brazil; mirella\_dasilva@hotmail.com

<sup>4</sup> Post Graduation Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, PE 50670-901, Brazil; miguelsegundo@gmail.com

<sup>5</sup> Drug Development and Synthesis Laboratory, Department of Pharmacy, State University of Paraíba, João Pessoa, PB 58070-450, Brazil; ricardo.olimpiodemoura@gmail.com

<sup>6</sup> Department of Morphology, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, RN 59078-970, Brazil; karinapm@yahoo.com

<sup>7</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB 58051-970, Brazil

\* Correspondence: mariannavbs@gmail.com; Tel.: +55-83-98812-3555

Received: 26 November 2019; Accepted: 13 December 2019; Published: 20 December 2019



**Abstract:** Tumor cells have specific features, including angiogenesis induction, cell cycle dysregulation, and immune destruction evasion. By inducing a T helper type 2 (Th2) immune response, tumor cells may favor immune tolerance within the tumor, which allows progression of cancer growth. Drugs with potential antitumor activity are the spiro-acridines, which is a promising new class of acridine compounds. Herein, the novel spiro-acridine (*E*)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimethoxybenzylidene)amino)-1',5'-dihydro-10*H*-spiro[acridine-9,2'-pyrrole]-4'-carbonitrile (AMTAC-17) was synthesized and tested for antitumor effects. Toxicity evaluation was performed in mice after acute treatment (2000 mg/kg, intraperitoneally, i.p.). The Ehrlich ascites carcinoma model was used to investigate the antitumor activity of AMTAC-17 (12.5, 25, or 50 mg/kg, i.p.) after seven days of treatment. Effects on the cell cycle, angiogenesis, and inflammatory responses were investigated. LD<sub>50</sub> (lethal dose 50%) was estimated to be higher than 5000 mg/kg. AMTAC-17 reduced the Ehrlich tumor's total viable cancer cells count and peritumoral micro-vessels density, and induced an increase in the sub-G1 peak. Additionally, there was an increase of Th1 cytokine profile levels (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-12). In conclusion, the spiro-acridine compound AMTAC-17 presents low toxicity, and its *in vivo* antitumor effect involves modulation of the immune system to a cytotoxic Th1 profile and a reduction of tumor angiogenesis.

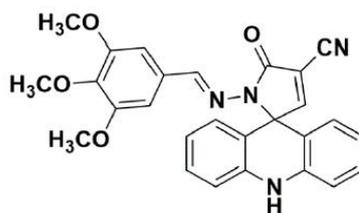
**Keywords:** spiro-acridine compound; angiogenesis; antitumor activity; immune response

## 1. Introduction

Cancer cells exhibit specific hallmarks including cell cycle dysregulation and angiogenesis induction, besides producing a tumor microenvironment where tumor cells are associated with bioactive molecules of inflammatory stromal cells to induce their proliferation, survival, and angiogenesis [1]. Cell cycle dysregulation is related with the maintenance of proliferative signaling and resistance to apoptosis [2]. In addition, angiogenesis induces the tumor growth by providing oxygen and nutrients as well as favoring metastasis [3].

Moreover, tumor cells can escape immune surveillance cells [4], promoting immune tolerance to the tumor by favoring the establishment of a Th2 immune response, expressing cytokines like IL-4, IL-10, and TGF- $\beta$  [5]. Previous studies show that a sustained immune change from Th2 to Th1 profiles is critical for tumor cell death [6].

Spiro-acridines are a promising new class of acridine derivatives [7], which have been obtained by spirocyclization reactions yielding a five-membered or six-membered spiro ring attached to acridine C-9 carbon [8]. These compounds have shown DNA binding capacity, inhibition of human topoisomerase II $\alpha$  and tyrosinase enzyme, and antiproliferative activity against tumor cell lines [8–10]. Herein, we described the synthesis of a novel spiro-acridine compound, (*E*)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimethoxybenzylidene)amino)-1',5'-dihydro-10*H*-spiro[acridine-9,2'-pyrrole]-4'-carbonitrile (AMTAC-17, Figure 1), and evaluated the mechanism of antitumor action on the Ehrlich ascites carcinoma model.



**Figure 1.** Structure of spiro-acridine compound (*E*)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimethoxybenzylidene)amino)-1',5'-dihydro-10*H*-spiro[acridine-9,2'-pyrrole]-4'-carbonitrile (AMTAC-17).

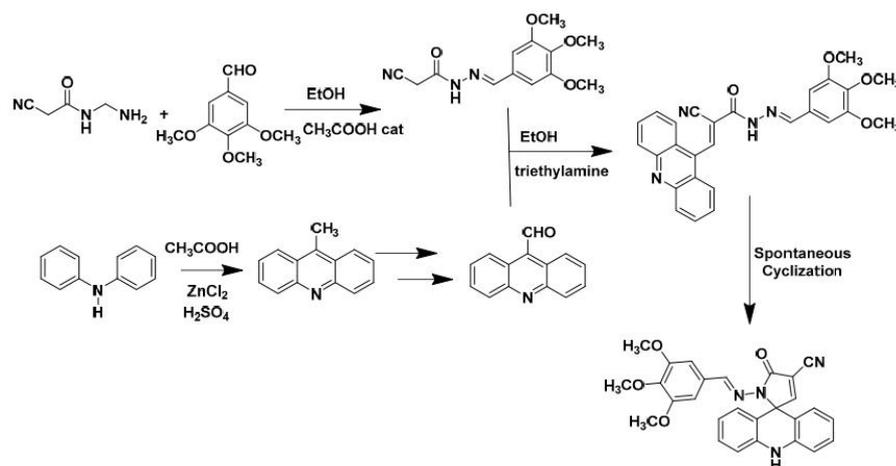
## 2. Results and Discussion

### 2.1. Chemistry

The compound AMTAC-17 was idealized from the results obtained by Almeida et al. (2016), who, in their previous studies, observed that the methoxylated spiro-acridine derivative in the benzylidene ring (AMTAC-02) presented the best result of antiproliferative activity, besides topoisomerase II $\alpha$  inhibitory activity, which is comparable to the amsacrine pattern. Thus, we believe that because AMTAC-02 has important ionizable chemical groups, it may possibly result in electrostatic attraction between the drug and biomolecular targets, or DNA/topoisomerase. Thus, we add two more methoxy groups, both in the meta position and one in the para position in relation to the benzylidene ring. We analyze the effects of these additions. The synthesized compound presents its spectral data and physicochemical characteristics described below.

The synthetic route used to obtain the spiro-acridine derivatives (Scheme 1) was parallel and convergent, where we will perform the synthesis of 2-cyano-*N'*-(3,4,5-trimethoxy-benzylidene)-acetohydrazide (JR-10) in parallel with the acridine aldehyde. To obtain the JR-10, we started from 2-cyano-acetohydrazide, which was condensed with 3,4,5-trimethoxy-benzaldehyde in ethanolic medium and molar equivalents acid catalytic at room temperature for 24 h. For the synthesis of acridine aldehyde, we start from diphenylamine, which undergoes a Friedel Crafts acylation reaction followed by cyclization in acid medium. This leads to the 9-methylacridine, which, after successive oxidations, we obtain the 9-carboxyaldehyde-acridinic. To obtain the spiro-acridine derivatives, we

started from the acridine aldehyde, which was condensed with the intermediate JR-10 in ethanolic and basic medium in molar equivalents at 78 °C for 6 h, which undergo spontaneous cyclization and leads to the final spiro-acridine derivatives.



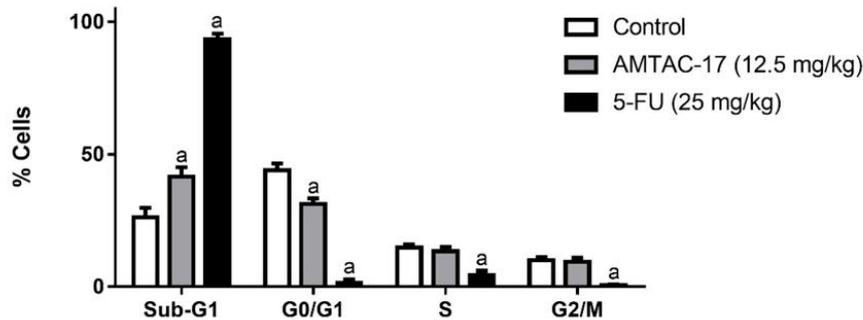
**Scheme 1.** Synthetic route to obtain spiro-acridine derivatives (AMTAC-17).

## 2.2. Biological Evaluation

In order to determine safe doses to be used for *in vivo* pharmacological tests, the acute non-clinical toxicity assay was performed. No death was recorded after AMTAC-17 (2000 mg/kg) treatment, according to the OECD guideline. The  $LD_{50}$  was estimated to be higher than 5000 mg/kg, which suggests low acute toxicity in mice [11].

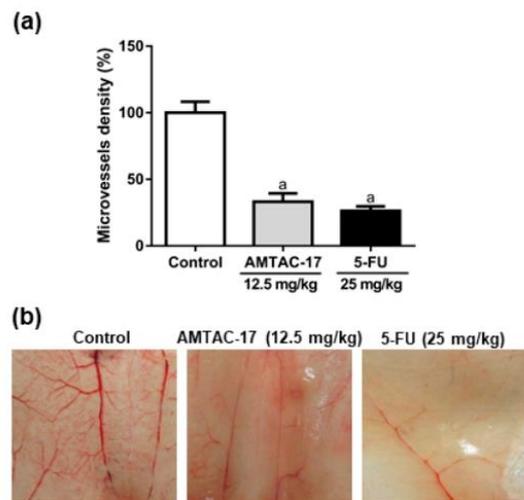
AMTAC-17 induced a significant reduction on total viable cancer cell count ( $46.47 \pm 4.78 \times 10^7$  cells,  $61.82 \pm 8.66 \times 10^7$  cells, and  $57.98 \pm 5.27 \times 10^7$  cells for 12.5, 25, and 50 mg/kg, respectively;  $p < 0.05$ ) when compared to the tumor control group ( $135.5 \pm 10.95 \times 10^7$  cells). The AMTAC-17 12.5-mg/kg dose was chosen to study the mechanism of antitumor action because no significant difference between the doses tested was observed. Literature data have shown the *in vivo* antitumor effects for acridine derivatives [12,13]. However, this is the first time that the mechanism of antitumor action of a spiro-acridine compound has been described.

On cell cycle analysis, AMTAC-17 induced an increase in the sub-G1 peak to 41.48% ( $p < 0.05$ ), associated with a decrease in the G0/G1 phase to 31.30% ( $p < 0.05$ ), when compared to a control group (26.16 and 43.98%, respectively) (Figure 2). Literature have shown that the increase in the sub-G1 peak is indicative of the apoptosis process [14,15]. In addition, previous studies suggested that acridine derivatives could induce cell cycle arrest and apoptosis [16].



**Figure 2.** Effects of AMTAC-17 and 5-FU on the cell cycle of Ehrlich ascites carcinoma cells. Percentage of Ehrlich cells in phases of the cell cycle after different treatments: 12% Tween-80 solution (control), AMTAC-17 (12.5 mg/kg), and 5-FU (25 mg/kg). Data presented as mean  $\pm$  SEM of six animals analyzed by ANOVA was followed by the Tukey test. <sup>a</sup>  $p < 0.05$  compared to the tumor control group.

AMTAC-17 (12.5 mg/kg) induced a decrease on microvessels' density ( $33.16 \pm 6.30\%$ ) as well as 5-FU ( $26.26 \pm 1.63\%$ ), when compared to the tumor control group ( $100.00 \pm 8.27\%$ ) (Figure 3).

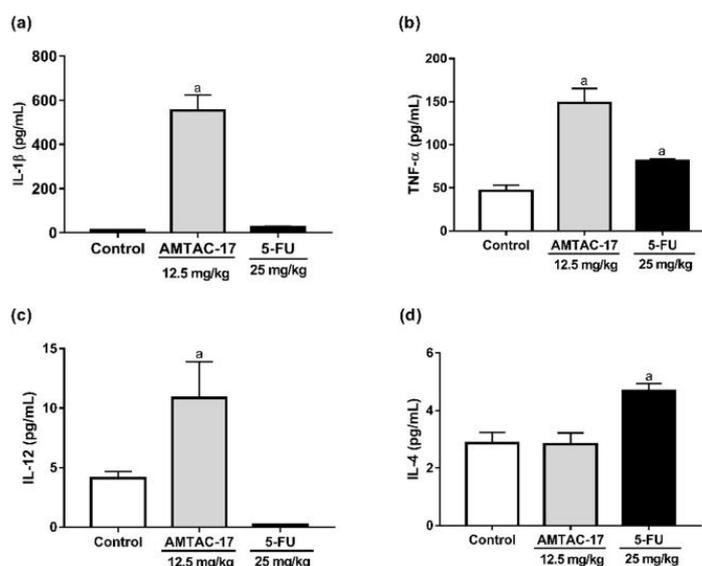


**Figure 3.** Effects of AMTAC-17 (12.5 mg/kg) and 5-FU (25 mg/kg) on microvessel density (%) in mice transplanted with Ehrlich tumor, after seven days of treatment. (a) Microvessel density (%) represents the blood vessel area per field in selected vascularized areas divided by the whole area. (b) Representative images of animals' peritoneum cut into a standard size (1 cm  $\times$  1 cm) showing the reduced neovascularization by AMTAC-17 and 5-FU treatments. Data presented as mean  $\pm$  SEM of six animals analyzed by ANOVA followed by the Tukey test. <sup>a</sup>  $p < 0.05$  compared to a tumor control group.

Tumor cells, together with inflammatory stromal cells, provide bioactive molecules, such as cytokines, chemokines, and other factors to the tumor microenvironment. This creates an immunosuppressive phenotype to favor its proliferation, survival, and angiogenesis [1,17]. The angiogenic process depending on the coordination of many factors is present in the tumor microenvironment and, therefore, understanding the interactions between these components is also relevant for therapeutic strategies against cancer [18,19]. Antiangiogenic therapy is an important target for antitumor drug action, since it prevents the emergence of new blood vessels that support tumor

growth and induce metastasis [20]. Our data suggest that the AMTAC-17 mechanism of antitumor action involves an antiangiogenic effect, as previously reported for acridines [12].

The AMTAC-17 effects on the inflammatory tumor microenvironment were also investigated. AMTAC-17 (12.5 mg/kg) promoted an increase in proinflammatory cytokine levels, such as IL-1 $\beta$  ( $553.12 \pm 70.57$  pg/mL,  $p < 0.05$ ), TNF- $\alpha$  ( $148.53 \pm 16.67$  pg/mL,  $p < 0.05$ ), and IL-12 ( $10.86 \pm 3.03$  pg/mL,  $p < 0.05$ ), when compared to the control ( $10.08 \pm 3.57$  pg/mL,  $46.59 \pm 6.43$  pg/mL, and  $4.12 \pm 0.84$  pg/mL, respectively). No significant change was observed for IL-4 levels after AMTAC-17 treatment. For 5-FU, increases in TNF- $\alpha$  ( $81.14 \pm 2.52$  pg/mL,  $p < 0.05$ ) and IL-4 ( $4.67 \pm 0.26$  pg/mL,  $p < 0.05$ ) levels were observed (Figure 4).



**Figure 4.** Effect of AMTAC-17 (12.5 mg/kg) and 5-FU (25 mg/kg) on the levels of IL-1 $\beta$  (a), TNF- $\alpha$  (b), IL-12 (c), and IL-4 (d) in the peritoneal lavage of Ehrlich ascites carcinoma transplanted mice. Data presented as mean  $\pm$  SEM of five animals were analyzed by ANOVA, which was followed by the Tukey test. <sup>a</sup>  $p < 0.05$  compared to the tumor control group.

IL-12 is known for the antiangiogenic action, which reduces the production of the vascular endothelial growth factor (VEGF) and metalloproteinase-9 [21]. Then, the AMTAC-17 effect on microvessels density may be dependent on IL-12 antiangiogenic action. Additionally, IL-12, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$  represent the Th1 cytokines profile, which is known for the cytotoxic effect against cancer cells [22,23]. This effect involves macrophage activation to secrete proinflammatory cytokines and produce reactive oxygen species and nitric oxide [24]. Therefore, the antitumoral effect of AMTAC-17 was also associated with immunomodulation of the tumor microenvironment to induce cytotoxic effects against tumor cells.

In conclusion, AMTAC-17, which is a novel spiro-acridine compound, exerts *in vivo* antitumor activity by modulation angiogenesis and induces Th1-biased immunomodulation.

### 3. Materials and Methods

#### 3.1. Synthesis Methodology

The spiro-acridine compound AMTAC-17 was synthesized at the Drug Development and Synthesis Laboratory (LDSF) of the State University of Paraíba, under the responsibility of Dr. Ricardo Olimpio

de Moura, according to the methodologies described previously [8,9]. It was duly characterized by spectroscopic techniques of <sup>1</sup>H Nuclear Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance on 500 MHz Bruker Avance, Ultrashield® spectrometers. Infrared (IR) (Recife, Pernambuco, Brazil) was obtained by the Attenuated Total Reflectance (ATR) technique in the range of 4000 to 650 cm<sup>-1</sup> in 63 Perkin Elmer, Spectrum 400 equipment. The results were interpreted by graphs plotted in Origin software 8.0. In addition, mass spectrometry was performed by the MALDI-TOF Autoflex III apparatus technique (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). This unambiguously characterizes the said structure (Figures S1–S5).

AMTAC-17: Yellow powder - C<sub>27</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>, W.M = 468.5040 g/mol, rdt = 81.28%, F.F = 237–239 °C theoretical logP = 3.14. RMN<sup>1</sup>H d6 500MHz. δ = 9.89 (s, 1H, NH), 8.63 (s, 1H, CH), 8.40 (s, 1H, N = CH), 7.29 (m, 2H, spiro-acridine), 7.04 (m, 4H, spiro-acridine), 6.86 (m, 2H, spiro-acridine), 6.70 (s, 2H, phenyl), 3.71 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.63 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), <sup>13</sup>C d6 100MHz δ = 161.6 (C, C = O), 160.8 (C, C = C), 148.8 (C, Ar), 139.2 (C, Ar), 137.2 (C, Ar), 131.7 (C, Ar), 130.2 (C, Ar), 127.3 (C, Ar), 124.1 (C, Ar), 123.1 (C, Ar), 122.1 (C, Ar), 120.6 (C, Ar), 115.4 (C, Ar), 112.9 (C, CN), 111.8 (C, Ar), 110.0 (adjacent CN), 69.7 (C, sp<sup>3</sup>). IVcm<sup>-1</sup> 3350 (N-H amida, 2235 (CN), 1708 (C = O), 1611 e 1479 (C = C phenyl), 1233 e 1130 (Ph-OCH<sub>3</sub>) 884 e 741 (C-H phenyl), M<sup>-1</sup> = 467.0608 (found).

### 3.2. Animals

Swiss albino mice (*Mus musculus*), which were females (28–32 g), obtained from the Dr. Thomas George Bioterium (Research Institute in Drugs and Medicines/Federal University of Paraíba, Paraíba, Brazil) were used. The animals were kept under controlled conditions (21 ± 1 °C, 12-h on/12-h off light-dark cycle). The Ethical Committee on the Use of Animals (CEUA)/UFPB (n°. 163/2015) previously approved all procedures.

### 3.3. Acute Non-Clinical Toxicity Assay

The acute toxicity assay was performed, according to the Guideline for Testing of Chemicals n. 423 of the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) (2001). Mice (*n* = 3/group) were subjected to a single dose of 2000 mg/kg AMTAC-17, intraperitoneally (i.p.). The control group was administered to the vehicle alone (12% (v/v) Tween-80 in saline). The dose responsible for the death of 50% of the experimental animals (LD<sub>50</sub>) was estimated.

### 3.4. In Vivo Antitumor Activity

The Ehrlich carcinoma cell line was generously provided by the Pharmacology and Toxicology Division, CPQBA, UNICAMP (Paulínia, Brazil). The cells were maintained in the peritoneal cavities of Swiss mice in the Dr. Thomas George Bioterium (Research Institute in Drugs and Medicines/Federal University of Paraíba, Paraíba, Brazil).

Five to seven-day-old Ehrlich tumor cells, 0.5 mL (2 × 10<sup>6</sup> cells/mL), were implanted in the peritoneal cavity of the mice (*n* = 6/group). During the next day, AMTAC-17 (12.5, 25, or 50 mg/kg) was administered for seven consecutive days (i.p.). 5-Fluorouracil (5-FU, 25 mg/kg) was used as a positive control. The tumor control group was treated with 12% (v/v) Tween-80 in saline. On the eighth day, the animals were anesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine hydrochloride (16 mg/kg), and then euthanized [25]. Total viable cancer cells were obtained as the product of the tumor volume (mL) by cell viability (number of cells × 10<sup>6</sup>/mL).

### 3.5. Peritoneal Angiogenesis

Animal's peritoneum of the tumor control, 12.5 mg/kg AMTAC-17, and 25 mg/kg 5-FU groups was cut open and the inner lining of the peritoneal cavity was examined and photographed. Microvessel density was calculated as the blood vessel area per field in selected vascularized areas divided by the whole area, using AVSOFT® software [26].

### 3.6. Cell Cycle Analyses

Cells from ascitic fluid ( $1 \times 10^6$  cells) of the tumor control, 12.5 mg/kg AMTAC-17, and 25 mg/kg 5-FU groups were harvested, gently fixed by using 70% ice-cold ethanol, and frozen overnight ( $-20^\circ\text{C}$ ). Samples were harvested by centrifugation ( $400 \times g$ , 10 min), and then incubated with RNase (0.1 mg/mL) and propidium iodide (PI) (0.05 mg/mL) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) ( $37^\circ\text{C}$ , 30 min) [22] with modifications. The DNA content was analyzed by flow cytometry (BD FACSCanto™ II, Woburn, MA, USA) and 10,000 events were acquired. After cell debris removal, a gate was placed on PE 585/42 nm-W (width) vs. the PE 585/42-A (area) graph to remove doublets on the right of single cell analysis. The gate with single cells was used to analyze the cell cycle as a histogram on PE 585/42-A. Flowing software version 2.0 was used to analyze the data.

### 3.7. Quantification of Cytokines

The determination of IL-1 $\beta$ , IL-12, TNF- $\alpha$ , and IL-4 cytokine levels was performed using the ascitic fluid collected from the peritoneal cavity of the tumor control, 12.5 mg/kg AMTAC-17, and 25 mg/kg 5-FU groups, using an ELISA kit following the manufacturer's instructions (ELISA – BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA, USA). Optical density was read at 450 nm using a microplate spectrophotometer (Microplate reader BioTek Instruments, Sinergy HT, Winooski, VT, USA).

### 3.8. Statistical Analysis

Data are presented as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM) and analyzed by the GraphPad Prism 7.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The differences between experimental groups were compared by analysis of variance (ANOVA). Lastly, the Tukey's test ( $p < 0.05$ ) was performed.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/1420-3049/25/1/29/s1>, Figure S1: Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance Spectrum of AMTAC-17 compound, Figure S2: Expanded Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance Spectrum of AMTAC-17 compound in the aromatic region, Figure S3: Carbon Nuclear Magnetic Resonance Spectrum 13 (DEPTQ) of AMTAC-17 compound, Figure S4: Infrared Spectrum of AMTAC-17 compound, Figure S5: Mass spectrum of AMTAC-17 compound.

**Author Contributions:** D.K.F.S., S.S.D., T.M.H.L., R.C.F., A.L.d.O.L., D.C.M.C., S.R.-M., P.M.d.S., K.C.P.M., and M.V.S. designed and performed the experiments, and analyzed the data. M.A.S.P.S. and R.O.d.M. synthesized and provided the AMTAC-17. D.K.F.S. and M.V.S. wrote the paper. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Acknowledgments:** The Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES)-Finance Code 001 and CNPq partly financed this study.

**Conflicts of Interest:** Authors declare no conflict of interest.

## References

1. Shalapour, S.; Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer: An eternal fight between good and evil. *J. Clin. Investig.* **2015**, *125*, 3347–3355. [[CrossRef](#)]
2. Bonelli, M.; Monica, S.L.; Fumarola, C.; Alfieri, R.; Bonelli, M.; Monica, S.L.; Fumarola, C.; Alfieri, R.; Alfieri, R. Multiple effects of CDK4/6 inhibition in cancer: From cell cycle arrest to immunomodulation. *Biochem. Pharmacol.* **2019**, *170*, 113676. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Al-abd, A.M.; Alamoudi, A.J.; Abdel-naim, A.B.; Neamatallah, T.A.; Ashour, O.M. Anti-angiogenic agents for the treatment of solid tumors: Potential pathways, therapy and current strategies—A review. *J. Adv. Res.* **2017**, *8*, 591–605. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Yarchoan, M.; Johnson III, B.A.; Lutz, E.R.; Laheru, D.A.; Jaffee, E.M. Targeting neoantigens to augment antitumour immunity. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Lin, C.; Zhang, J. Inflammasomes in Inflammation-Induced Cancer. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

6. Dai, M.; Hellstrom, I.; Yip, Y.Y.; Sjögren, H.O.; Hellstrom, K.E. Tumor Regression and Cure Depends on Sustained Th1 Responses. *J. Immunother.* **2018**, *41*, 369–378. [CrossRef] [PubMed]
7. Vilková, M.; Prokaiová, M.; Imrich, J. Spontaneous cyclization of (acridin-9-ylmethyl)thioureas to spiro [dihydroacridine-9'(10'H),5-imidazolidine]-2-thiones, a novel type of acridine spirocycles. *Tetrahedron* **2014**, *70*, 944–961. [CrossRef]
8. Almeida, S.M.V.d.; Lafayette, E.A.; Silva, W.L.; Serafim, V.d.L.; Menezes, T.M.; Neves, J.L.; Ruiz, A.L.T.G.; Carvalho, J.E.d.; Moura, R.O.d.; Beltrão, E.I.C.; et al. New spiro-acridines: DNA interaction, antiproliferative activity and inhibition of human DNA topoisomerases. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *92*, 467–475. [CrossRef]
9. Gouveia, R.; Galdino, A.; Ângelo, M.; Pinheiro, S.; Ricardo, T.; Lima, C.D.; Mônica, S.; Almeida, V.D.; Olímpio, R.; Moura, D. Synthesis, DNA and protein interactions and human topoisomerase inhibition of novel Spiroacridine derivatives. *Bioorganic Med. Chem.* **2018**, *26*, 5911–5921. [CrossRef]
10. Menezes, T.M.; Almeida, S.M.V.d.; Neves, J.L.; Moura, R.O.D.; Seabra, G.; Carmo, M. Spiro-acridine inhibiting tyrosinase enzyme: Kinetic, proteinligand interaction and molecular docking studies. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *122*, 289–297. [CrossRef]
11. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Guideline for Testing of Chemicals n. 423: Acute Oral Toxicity. Available online: [https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oced/oced\\_g423.pdf](https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oced/oced_g423.pdf) (accessed on 25 November 2019).
12. Mangueira, V.; Batista, T.; Brito, M.; Abrantes, R.; Sousa, T.; Cavalcanti, R.; Almeida, I.; Medeiros, D.; Karla, K.; Medeiros, D.P.; et al. A new acridine derivative induces cell cycle arrest and antiangiogenic effect on Ehrlich ascites carcinoma model. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *90*, 253–261. [CrossRef] [PubMed]
13. Kukowska, M. Amino acid or peptide conjugates of acridine/acridone and quinoline/quinolone-containing drugs. A critical examination of their clinical effectiveness within a twenty-year timeframe in antitumor chemotherapy and treatment of infectious diseases. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, *109*, 587–615. [CrossRef] [PubMed]
14. Jernei, T.; Duró, C.; Dembo, A.; Lajkó, E.; Takács, A.; Kohidai, L.; Schlosser, G.; Csámpai, A. Synthesis, Structure and In Vitro Cytotoxic Activity of Novel Cinchona — Chalcone Hybrids with 1,4-Disubstituted- and 1,5-Disubstituted 1,2,3-Triazole Linkers. *Molecules* **2019**, *24*, 4077. [CrossRef] [PubMed]
15. Somma, S.D.; Amato, J.; Iaccarino, N.; Pagano, B.; Randazzo, A.; Portella, G.; Malfitano, A.M. G-Quadruplex Binders Induce Immunogenic Cell Death Markers in Aggressive Breast Cancer Cells. *Cancers* **2019**, *11*, 1797. [CrossRef] [PubMed]
16. Olszewska, P.; Mikićuk-Olasik, E.; Błaszczak-Swiatkiewicz, K.; Szyman', J.; Ski, P.S. Novel tetrahydroacridine derivatives inhibit human lung adenocarcinoma cell growth by inducing G1 phase cell cycle arrest and apoptosis. *Biomed. Pharmacother.* **2014**, *68*, 959–967. [CrossRef] [PubMed]
17. Ribeiro Franco, P.I.; Rodrigues, A.P.; Menezes, L.B.d.; Miguel, M.P. Tumor microenvironment components: Allies of cancer progression. *Pathol. - Res. Pract.* **2019**, in press. [CrossRef]
18. Hinshaw, D.C.; Shevde, L.A. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 4557–4566. [CrossRef]
19. Majnooni, M.B.; Fakhri, S.; Smeriglio, A.; Trombetta, D.; Croley, C.R.; Bhattacharyya, P.; Sobarzo-s, E.; Farzaei, M.H.; Bishayee, A. Antiangiogenic Effects of Coumarins against Cancer: From Chemistry to Medicine. *Molecules* **2019**, *24*, 4278. [CrossRef]
20. Lugano, R.; Ramachandran, M.; Dimberg, A. Tumor angiogenesis: Causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell. Mol. Life Sci.* **2019**, 1–26. [CrossRef]
21. Tugues, S.; Burkhard, S.H.; Ohs, I.; Vrohings, M.; Nussbaum, K.; Berg, J.; Kulig, P.; Becher, B. New insights into IL-12-mediated tumor suppression. *Cell Death Differ.* **2014**, *22*, 237–246. [CrossRef]
22. Santos, J.; Brito, M.; Ferreira, R.; Moura, A.P.; Sousa, T.; Batista, T.; Mangueira, V.; Leite, F.; Cruz, R.; Vieira, G.; et al. Th1-Biased Immunomodulation and In Vivo Antitumor Effect of a Novel Piperine Analogue. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2594. [CrossRef] [PubMed]
23. Xu, H. Th1 cytokine-based immunotherapy for cancer. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* **2014**, *13*, 482–494. [CrossRef]
24. Petty, A.J.; Yang, Y. Tumor-associated macrophages: Implications in cancer immunotherapy. *Immunotherapy* **2017**, *9*, 289–302. [CrossRef] [PubMed]

25. Moura, E.C.R.; Leal, P.d.C.; Serra, I.C.P.B.; Ribeiro, B.d.P.; do Nascimento, J.R.; Nascimento, F.R.F.d.; Sakata, R.K. Tumor growth activity of duloxetine in Ehrlich carcinoma in mice. *BMC Res. Notes* **2018**, *11*, 525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Agrawal, S.S.; Saraswati, S.; Mathur, R.; Pandey, M. Cytotoxic and antitumor effects of brucine on Ehrlich ascites tumor and human cancer cell line. *Life Sci.* **2011**, *89*, 147–158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Sample Availability:** Samples of the compound are available from the authors.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## Apêndice B – Artigo publicado na revista *Molecules* (Fator de impacto 3,060; Qualis A2 – Farmácia)



Communication

### Toxicity and Antitumor Activity of a Thiophene–Acridine Hybrid

Thaís Lisboa <sup>1</sup>, Daiana Silva <sup>1</sup>, Sâmia Duarte <sup>1</sup>, Rafael Ferreira <sup>1</sup>, Camyla Andrade <sup>1</sup>, Ana Luiza Lopes <sup>1</sup>, Juliana Ribeiro <sup>2</sup>, Davi Farias <sup>2</sup>, Ricardo Moura <sup>3</sup>, Malu Reis <sup>3</sup>, Karina Medeiros <sup>4</sup>, Hemerson Magalhães <sup>1,5</sup> and Marianna Sobral <sup>1,5,\*</sup>

<sup>1</sup> Postgraduate Program in Bioactive Natural and Synthetic Products, Federal University of Paraíba, 58051-970 João Pessoa, Paraíba, Brazil; thaismangeon@gmail.com (T.L.); daiana.frade@gmail.com (D.S.); samiasduarte@gmail.com (S.D.); rafaelcarlos@ltf.ufpb.br (R.F.); camyla.andrade03@gmail.com (C.A.); ana.lopes0407@gmail.com (A.L.L.); hemersoniury@gmail.com (H.M.)

<sup>2</sup> Laboratory for Risk Assessment of Novel Technologies, Department of Molecular Biology, Federal University of Paraíba, Campus I, 58051-900 João Pessoa, Brazil; julianaacrs@hotmail.com (J.R.); daviffarias@gmail.com (D.F.)

<sup>3</sup> Drug Development and Synthesis Laboratory, Department of Pharmacy, State University of Paraíba, 58070-450 João Pessoa, PB, Brazil; ricardo.olimpiodemoura@gmail.com (R.M.); malureis\_farmacia@hotmail.com (M.R.)

<sup>4</sup> Department of Morphology, Federal University of Rio Grande do Norte, 59078-970 Natal, RN, Brazil; karinapm@yahoo.com

<sup>5</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, 58051-970 João Pessoa, Paraíba, Brazil

\* Correspondence: mariannavbs@gmail.com; Tel.: +55-83-98812-3555

Received: 2 December 2019; Accepted: 18 December 2019; Published: 24 December 2019



**Abstract:** The antitumor effects of thiophene and acridine compounds have been described; however, the clinical usefulness of these compounds is limited due to the risk of high toxicity and drug resistance. The strategy of molecular hybridization presents the opportunity to develop new drugs which may display better target affinity and less serious side effects. Herein, 2-((6-Chloro-2-methoxy-acridin-9-yl)amino)-5,6,7,8-tetrahydro-4H-cyclohepta[b]-thiophene-3-carbonitrile (ACS03), a hybrid thiophene–acridine compound with antileishmanial activity, was tested for toxicity and antitumor activity. The toxicity was evaluated *in vitro* (on HaCat and peripheral blood mononuclear cells) and *in vivo* (zebrafish embryos and acute toxicity in mice). Antitumor activity was also assessed *in vitro* in HCT-116 (human colon carcinoma cell line), K562 (chronic myeloid leukemic cell line), HL-60 (human promyelocytic leukemia cell line), HeLa (human cervical cancer cell line), and MCF-7 (breast cancer cell line) and *in vivo* (Ehrlich ascites carcinoma model). ACS03 exhibited selectivity toward HCT-116 cells (Half maximal inhibitory concentration, IC<sub>50</sub> = 23.11 ± 1.03 μM). In zebrafish embryos, ACS03 induced an increase in lactate dehydrogenase, glutathione S-transferase, and acetylcholinesterase activities. The LD<sub>50</sub> (lethal dose 50%) value in mice was estimated to be higher than 5000 mg/kg (intraperitoneally). *In vivo*, ACS03 (12.5 mg/kg) induced a significant reduction in tumor volume and cell viability. *In vivo* antitumor activity was associated with the nitric oxide cytotoxic effect. In conclusion, significant antitumor activity and weak toxicity were recorded for this hybrid compound, characterizing it as a potential anticancer compound.

**Keywords:** colorectal cancer; thiophene–acridine compound; antitumor; cytotoxicity; toxicity

#### 1. Introduction

Cancer in the broader sense refers to more than 277 different types of cancer disease [1] and is a leading cause of death and disability, with 18.1 million people diagnosed globally and more than

**Apêndice C – Artigo publicado na revista *Brazilian Journal of Development* (Qualis B2 – Farmácia)**

19109

***Brazilian Journal of Development***

**Synthesis and tumoral test of ( $\pm$ )-4-O-DemethylKadsurenin M a natural compound and analogues**

**Síntese e avaliação antitumoral do ( $\pm$ )-4-O-demethylKadsurenin M um composto natural e seus análogos**

DOI:10.34117/bjdv5n10-144

Recebimento dos originais: 10/09/2019  
Aceitação para publicação: 11/10/2019

**Bruno Hanrry Melo de Oliveira**

Biomédico especialista em Biologia molecular, mestrando em Biotecnologia pela Universidade Federal da Paraíba – UFPB / Centro de Biotecnologia.

Universidade Federal da Paraíba

Endereço: R. Tab. Stanislau Eloy, 41-769 - Conj. Pres. Castelo Branco III, João Pessoa - PB, 58033-455

Email: hanrygb@hotmail.com

**Luiz André Araujo Silva**

Programa de pós-graduação em desenvolvimento e inovação tecnológica em medicamentos pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Universidade Federal da Paraíba

Endereço: Campus I - Lot. Cidade Universitaria, PB, 58051-900

Email: luiz32@gmail.com

**Fernando Ferreira Leite**

Programa de pós-graduação em produtos naturais e sintéticos bioativos pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Universidade Federal da Paraíba

Endereço: R. Tab. Stanislau Eloy, 41-769 - Conj. Pres. Castelo Branco III, João Pessoa - PB, 58033-455

Email: fernandoferreira\_15@gmail.com

**Gabrielly Diniz Duarte**

Mestranda em biotecnologia pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Universidade Federal da Paraíba

Endereço: R. Tab. Stanislau Eloy, 41-769 - Conj. Pres. Castelo Branco III, João Pessoa - PB, 58033-455

Email: gabriellydduarte@gmail.com

**Sâmia Sousa Duarte**

Programa de pós-graduação em produtos naturais e sintéticos bioativos pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Universidade Federal da Paraíba

Endereço: R. Tab. Stanislau Eloy, 41-769 - Conj. Pres. Castelo Branco III, João Pessoa - PB, 58033-455

Email: samiasduarte@gmail.com

**Brazilian Journal of Development****Daiana Karla Frade Silva**

Programa de pós-graduação em produtos naturais e sintéticos bioativos pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB)  
Universidade Federal da Paraíba  
Endereço: R. Tab. Stanislau Eloy, 41-769 - Conj. Pres. Castelo Branco III, João Pessoa - PB, 58033-455  
Email: daiana.frade@hotmail.com

**Marianna Vieira Sobral**

Professora da Universidade Federal da Paraíba – UFPB / Programa de pós-graduação em produtos naturais e sintéticos bioativos pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB)  
Universidade Federal da Paraíba  
Endereço: R. Tab. Stanislau Eloy, 41-769 - Conj. Pres. Castelo Branco III, João Pessoa - PB, 58033-455  
Email: mariannavbs@gmail.com

**Luis César Rodrigues**

Professor da Universidade Federal da Paraíba – UFPB / Centro de biotecnologia.  
Universidade Federal da Paraíba  
Endereço: R. Tab. Stanislau Eloy, 41-769 - Conj. Pres. Castelo Branco III, João Pessoa - PB, 58033-455  
Email: luiscezarrodrigues@gmail.com

**ABSTRACT**

The synthesis of neolignan ( $\pm$ )-4-O-Demethylkadsurenin M 2 was achieved through the coupling oxidation of isoeugenol, follow epoxidation of Licarin-A compound 1, one neolignan intermediate. This natural product was analyzed and characterized by NMR  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ . Compounds 3-5 are derivatives of the compound 1 and together with compound 2 was tested against HL-60 (acute promyelocytic leukemia), HCT-116 (human colorectal carcinoma), MCF-7 (human breast adenocarcinoma) and K562 (chronic myeloid leukemia) cells to evaluate its tumoral activity.

**Keywords:** synthesis; kadsurenin; lignans; neolignans.

**RESUMO**

A síntese da neolignana ( $\pm$ )-4-O-DemetilKadsurenin M 2 foi realizada através da oxidação de acoplamento do isoeugenol, seguida da epoxidação do composto 1 Licarin-A, uma neolignana intermediária. Este produto natural foi analisado e caracterizado por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Os compostos 3-5 derivados do composto 1 e em conjunto com o composto 2 foram testados contra células HL-60 (leucemia promielocítica aguda), HCT-116 (câncer colorretal humano) e MCF-7 (adenocarcinoma mamário humano) para avaliar suas atividades tumorais.

**Palavras-chave:** Síntese; Kadsurenin; Lignanas; Neolignanas

## Apêndice D – Artigo publicado na revista *Chemical Biology & Drug Design* (Fator de impacto: 2,256; Qualis B1 – Farmácia)

Received: 3 October 2017 | Revised: 24 December 2017 | Accepted: 20 January 2018  
DOI: 10.1111/cbdd.13176



RESEARCH ARTICLE

WILEY

### New thiophene–acridine compounds: Synthesis, antileishmanial activity, DNA binding, chemometric, and molecular docking studies

Vanessa de Lima Serafim<sup>1,2</sup> | Mayara Barbalho Félix<sup>1,2</sup> | Daiana Karla Frade Silva<sup>1,2</sup> | Klinger Antônio da Franca Rodrigues<sup>1,2</sup> | Patrícia Nêris Andrade<sup>1,2</sup> | Sinara Mônica Vitalino de Almeida<sup>3</sup> | Sanderssonilo de Albuquerque dos Santos<sup>4</sup> | Jamerson Ferreira de Oliveira<sup>4</sup> | Maria do Carmo Alves de Lima<sup>4</sup> | Francisco Jaime Bezerra Mendonça-Junior<sup>2,5</sup> | Marcus Tullius Scotti<sup>2</sup> | Márcia Rosa de Oliveira<sup>1</sup> | Ricardo Olímpio de Moura<sup>5,6</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Leishmanioses, Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

<sup>3</sup>Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

<sup>4</sup>Laboratório de Química e Inovação Terapêutica (LQIT), Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

<sup>5</sup>Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

<sup>6</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba - Bodocongó, Campina Grande, PB, Brazil

#### Correspondence

Maria do Carmo Alves de Lima,  
Laboratório de Química e Inovação  
Terapêutica (LQIT), Departamento de  
Antibióticos, Universidade Federal de  
Pernambuco, Recife, PE, Brazil.  
Email: nenalima.mariadocarmo@gmail.  
com

#### Funding information

Coordenação de Aperfeiçoamento de  
Pessoal de Nível Superior

In this study, we synthesized eight new compounds containing the 2-amino-cycloalkyl[b]thiophene and acridine moieties (ACT<sub>01</sub> and ACS<sub>01</sub>-ACS<sub>07</sub>). None tested compounds presented human erythrocyte cytotoxicity. The new compounds presented antipromastigote activity, where ACS<sub>01</sub> and ACS<sub>02</sub> derivatives presented significant antileishmanial activity, with better performance than the reference drugs (tri and pentavalent antimonials), with respective IC<sub>50</sub> values of 9.60 ± 3.19 and 10.95 ± 3.96 μM. Additionally, these two derivatives were effective against antimony-resistant *Leishmania (Leishmania) amazonensis* strains. In addition, binding and fragmentation DNA assays were performed. It was observed that the antileishmanial activity of ACS<sub>01</sub> is not associated with DNA fragmentation of the promastigote forms. However, it interacted with DNA with a binding constant of 10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup>. In partial least-squares studies, it was observed that the most active compounds (ACS<sub>01</sub> and ACS<sub>02</sub>) showed lower values of amphiphilic moment descriptor, but there was a correlation between the lipophilicity of the molecules and antileishmanial activity. Furthermore, the docking molecular studies showed interactions between thiophene–acridine derivatives and the active site of pyruvate kinase enzyme with the major contribution of asparagine 152 residue for the interaction with thiophene moiety. Thus, the results suggested that the new thiophene–acridine derivatives are promising molecules as potential drug candidates.

#### KEY WORDS

2-amino-thiophene, acridine, DNA binding, leishmaniasis, molecular docking

## Apêndice E – Artigo publicado na revista *Biomedicine & Pharmacotherapy* (Fator de impacto: 3,743; Qualis B1 – Farmácia)

Biomedicine & Pharmacotherapy 108 (2018) 1670–1678



Contents lists available at ScienceDirect

Biomedicine & Pharmacotherapy

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bioph](http://www.elsevier.com/locate/bioph)



### SB-83, a 2-Amino-thiophene derivative orally bioavailable candidate for the leishmaniasis treatment



Klinger Antonio da Franca Rodrigues<sup>a,b,\*</sup>, Daiana Karla Frade Silva<sup>b</sup>, Vanessa de Lima Serafim<sup>b</sup>, Patrícia Nêris Andrade<sup>a</sup>, Adriano Francisco Alves<sup>c</sup>, Wagner Luis Tafuri<sup>c</sup>, Tatianne Mota Batista<sup>b</sup>, Vivianne Mendes Mangueira<sup>b</sup>, Marianna Vieira Sobral<sup>b</sup>, Ricardo Olímpio de Moura<sup>d</sup>, Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior<sup>b,d</sup>, Márcia Rosa de Oliveira<sup>e</sup>

<sup>a</sup> Coordenação do Curso de Medicina, Campus Ministro Reis Velloso, Universidade Federal do Piauí, 65202-020, Parnaíba, PI, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, 58051-970, João Pessoa, PB, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Patologia, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>d</sup> Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual da Paraíba, 58058-420, João Pessoa, PB, Brazil

<sup>e</sup> Departamento de Biologia Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, CEP 58059-900, Brazil

#### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
2-amino-thiophene  
Antileishmanial activity  
Drug development  
Oral bioavailability

#### ABSTRACT

Leishmaniasis, affecting more than 12 million people worldwide has become a severe public-health problem. The therapeutic arsenal against leishmaniasis is mainly administered by parenteral route; it is toxic, expensive, and associated with recurrence risk. The need for further therapeutic compounds research is pressing. In previous studies, we demonstrated the antileishmanial activities of ten 2-amino-thiophene derivatives, which evidenced the action of a compound, called SB-83, having expressive antileishmania activity in an *in vitro* infection model. In the present work, we describe preclinical studies of the thiophenic derivative SB-83, such as acute toxicity, genotoxicity, *in vivo* oral efficacy in a murine model, and *in vitro* antileishmanial activity against an *L. amazonensis* Sb<sup>III</sup>-resistant strain. Determining acute preclinical toxicity, the LD<sub>50</sub> of SB-83 was estimated at 2500 mg/kg orally, with few behavioral changes in Swiss mice. Further, treatment with 2000 mg/kg of SB-83 did not induce *in vivo* genotoxic activity in the peripheral blood micronucleus assay. In 7 weeks of oral treatment, SB-83 reduced paw lesion size in *L. amazonensis* infected mice by 52.47 ± 5.32%, and decreased the parasite load of the popliteal lymph node and spleen at the highest dose tested (200 mg/kg) respectively by 42.57 ± 3.14%, and 100%, without presenting weight change or other changes of clinical importance in the biochemical and hematological profiles. The treatment of promastigotes and intracellular amastigotes of Sb<sup>III</sup> sensitive and resistant strains with SB-83 did not produce differences in antileishmania activity, which suggests no cross-resistance. Thus, this work demonstrated that SB-83 has potential as a new active drug candidate even when orally administered, which may become a new therapeutic alternative for the treatment of leishmaniasis.

#### 1. Introduction

Leishmaniasis are infectious parasitic diseases caused by protozoa from the *Leishmania* genus, found in 98 countries in 5 continents, and causing 20,000 to 40,000 deaths per year [1]. The most affected countries include Afghanistan, Algeria, Bangladesh, Bolivia, Brazil, Columbia, Ethiopia, India, Iran, Peru, South Sudan, Sudan and Syria. The impact of leishmaniasis on human health has been grossly underestimated for many years, and WHO classifies leishmaniasis as a category 1 disease “emerging and uncontrolled” [1,2]. There are 2 main

forms of leishmaniasis, – cutaneous leishmaniasis (CL), ranging from localized cutaneous leishmaniasis (CL) to those producing diffuse-CL and disseminated-CL, mucocutaneous (MCL) and visceral leishmaniasis (VL), also known as kala-azar, the most serious form and potentially fatal [3].

Unfortunately, chemotherapeutic treatments bring cause for concern due to their restrictions, expense, many adverse effects and long treatment periods. In addition, administration routes are uncomfortable for the patient, being mostly parenteral [4]. Treatments based on pentavalent antimonial have been practiced since the 1940s yet present

\* Corresponding author at: Coordenação do Curso de Medicina, Campus Ministro Reis Velloso, Universidade Federal do Piauí, 65202-020, Parnaíba, PI, Brazil.  
E-mail address: [klinger.antonio@gmail.com](mailto:klinger.antonio@gmail.com) (K.A.d.F. Rodrigues).

<https://doi.org/10.1016/j.bioph.2018.10.012>

Received 26 July 2018; Received in revised form 19 September 2018; Accepted 3 October 2018  
0753-3322/ © 2018 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## Apêndice F – Artigo publicado na revista *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (Fator de impacto: 2,802; Qualis B1 – Farmácia)

Bioorganic & Medicinal Chemistry 24 (2016) 3972–3977



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bmc](http://www.elsevier.com/locate/bmc)



### Antileishmanial activity of new thiophene–indole hybrids: Design, synthesis, biological and cytotoxic evaluation, and chemometric studies



Mayara B. Félix<sup>a</sup>, Edson R. de Souza<sup>b</sup>, Maria do C. A. de Lima<sup>b</sup>, Daiana Karla G. Frade<sup>a</sup>,  
Vanessa de L. Serafim<sup>a</sup>, Klinger Antonio da F. Rodrigues<sup>c</sup>, Patrícia Lima do N. Nêris<sup>c</sup>, Frederico F. Ribeiro<sup>d</sup>,  
Luciana Scotti<sup>e</sup>, Marcus T. Scotti<sup>c</sup>, Thiago M. de Aquino<sup>f</sup>, Francisco Jaime B. Mendonça Junior<sup>g</sup>,  
Márcia R. de Oliveira<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biologia Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, Castelo Branco, João Pessoa, Paraíba CEP 58059-900, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE 50670-910, Brazil

<sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba 58059-900, Brazil

<sup>d</sup> Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, Campus I, Recife, PE 50670-901, Brazil

<sup>e</sup> Federal University of Paraíba, Campus I, João Pessoa, PB 58051-970, Brazil

<sup>f</sup> Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL 57072-970, Brazil

<sup>g</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual da Paraíba, CCBSA, João Pessoa, PB 58070-540, Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 23 February 2016

Revised 19 April 2016

Accepted 26 April 2016

Available online 26 April 2016

##### Keywords:

Leishmaniasis  
*Leishmania amazonensis*  
Cytotoxicity  
2-Aminothiophene  
Indole  
Chemometric studies

#### ABSTRACT

In the present work, thirty-two hybrid compounds containing cycloalka[b]thiophene and indole moieties (**TN5**, **TN5 1–7**, **TN6**, **TN6 1–7**, **TN7**, **TN7 1–7**, **TN8**, **TN8 1–7**) were designed, synthesized and evaluated for their cytotoxic and antileishmanial activity against *Leishmania amazonensis* promastigotes. More than half of the compounds (18 compounds) exhibited significant antileishmanial activity (IC<sub>50</sub> lower than 10.0 µg/L), showing better performance than the reference drugs (tri- and penta-valent antimonials). The most active compounds were **TN8-7**, **TN6-1** and **TN7** with respective IC<sub>50</sub> values of 2.1, 2.3 and 3.2 µg/mL. Demonstrating that all of the compounds were less toxic than the reference drugs, even at the highest evaluated concentration (400 µg/mL), no compound tested presented human erythrocyte cytotoxicity. Compound **TN8-7**'s effectiveness against a trivalent antimony-resistant culture was demonstrated. It was observed that **TN8-7**'s antileishmanial activity is associated with DNA fragmentation of *L. amazonensis* promastigotes. Chemometric studies (CPCA, PCA, and PLS) highlight intrinsic solubility/lipophilicity, and compound size and shape as closely related to activity. Our results suggest that hybrid cycloalka[b]thiophene–indole derivatives may be considered as lead compounds for further development of new drugs for the treatment of leishmaniasis.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Leishmaniasis can be defined as the array of diseases caused by protozoans of the genus *Leishmania* (Order Kinetoplastida, Family Trypanosomatidae).<sup>1,2</sup> It is considered a public health concern and afflicts over two million people each year. About 350 million people live in endemic areas under risk of infection.<sup>3</sup>

The life cycle of *Leishmania* sp. starts when the insect invertebrate host feeds on infected mammalian blood, thus imbibing amastigotes present within macrophages. In the vector–insect intestine, the amastigote form of the parasite becomes a procycli-

cal, and later a metacyclic promastigote. When the insect bites a mammalian host again, inoculated virulent promastigotes enter the blood stream and are internalized by macrophages, where they differentiate again into amastigotes, completing the cycle.<sup>4</sup>

In spite of its epidemiological importance, the recommended treatment for leishmaniasis is far from satisfactory. The conventional therapy (via parenteral) uses pentavalent antimonials.<sup>5,6</sup> The cure rate is high, but the treatment involves difficulties such as high toxicity and possible therapeutic failure.<sup>7</sup> There is an urgent need to find new antileishmanial drugs that are efficient against the pathogen yet present low toxicity to the patient.<sup>8</sup>

The thiophenes belong to a group of aromatic heterocyclic compounds,<sup>9,10</sup> among which 2-aminothiophene compounds are well

\* Corresponding author. Tel.: +55 83 3216 7436.

E-mail address: [mrosajp@gmail.com](mailto:mrosajp@gmail.com) (M.R. de Oliveira).