

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

THAIS MANGEON HONORATO LISBOA

**TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL DE UM HÍBRIDO TIOFÊNICO-
ACRIDÍNICO**

João Pessoa, PB
2020

THAIS MANGEON HONORATO LISBOA

**TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL DE UM HÍBRIDO TIOFÊNICO-
ACRIDÍNICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Hemerson Yuri Ferreira Magalhães

Co-orientadora: Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral

João Pessoa, PB

2020

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

L769t Lisboa, Thais Mangeon Honorato.

TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL DE UM HÍBRIDO
TIOFÊNICO ACRIDÍNICO / Thais Mangeon Honorato Lisboa. -
João Pessoa, 2020.
170 f. : il.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Câncer colorretal. 2. híbrido tiofênico-acridínico.
3. atividade antitumoral. 4. citotoxicidade. 5.
toxicidade. I. Título

UFPB/BC

THAIS MANGEON HONORATO LISBOA

TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL DE UM HÍBRIDO TIOFÊNICO-
ACRIDÍNICO

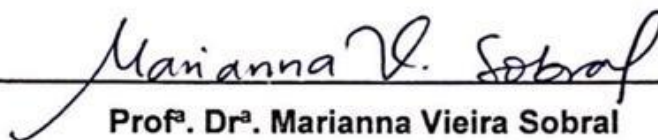
APROVADA EM: 30/06/2020

COMISSÃO EXAMINADORA



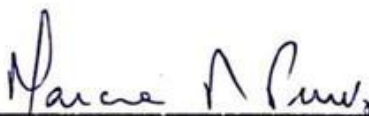
Prof. Dr. Hemerson Yuri Ferreira Magalhães

Orientador



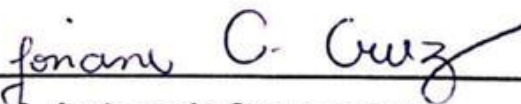
Profª. Drª. Marianna Vieira Sobral

Co-orientadora



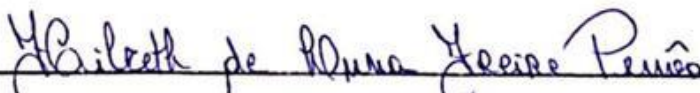
Profª. Drª. Marcia Regina Piuvezam

Membro interno



Profª. Drª. Josiane de Campos Cruz

Membro interno



Profª. Drª. Hilzeth de Luna Freire Pessoa

Membro externo



Prof. Dr. Klinger Antonio da Franca Rodrigues

Membro externo

Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore
nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você
andar"

Josué 1.9

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, dono de toda ciência sabedoria e poder, por me guiar em Seus caminhos e cumprir Suas promessas em minha vida e por me permitir glorificar o nome Dele por onde quer que eu vá.

Ao **meu esposo Victor**, por enfrentar todas as dores e alegrias dos caminhos que escolhemos percorrer juntos, por ser meu companheiro e viver os meus sonhos como se fossem dele e por me ensinar a estar sempre perto do nosso Pai.

À **minha mãe, Simone**, por ser exemplo de força e dedicar sua vida a me criar de forma digna e cheia de amor, por mesmo longe conseguir ser presente, acreditar, incentivar e derramar amor em todos os detalhes da minha vida.

Ao **meu pai, Ricardo**, pelo apoio e aconselhamento em todos os meus passos, por ser exemplo de Pai e profissional, me ensinando a fazer tudo com excelência e amor e por mesmo sem querer me fazer amar a ciência desde a minha infância.

Aos **meus avós, Remilson, Josefina e Hermelinda**, por serem meu apoio familiar aqui em João Pessoa por cuidarem tão bem de mim e fazerem tudo que for preciso pra me ver feliz.

A todos da minha família que de alguma forma me incentivaram e acreditaram em mim: **minha madrastra Fernanda, meus sogros**, todos os **tios e tias, primos**, às minhas irmãs, **Mariana e Julia** que sempre serão minha fonte de alegria e a **Ana Beatriz** minha irmã de coração que me acompanha em tudo e compartilha de todas as minhas loucuras e amores.

Aos meus orientadores **Hemerson Magalhães e Marianna Sobral** por acreditarem que juntos poderíamos fazer um excelente trabalho, por me receber, ensinar e acompanhar durante esses 3 anos. Em especial à **Marianna**, pelo tempo dedicado em reuniões, conversas e leituras e por acreditar que nada nos impediria de chegar até aqui.

Aos professores, **Ricardo Moura, Karina Medeiros, Davi Farias, Sandra Mascarenhas e Mirella Scardua** pela colaboração e todo o auxílio na análise dos resultados.

Aos membros da Banca Examinadora, **Marcia Pivezam, Klinger Rodrigues, Hilzeth Pessoa e Josiane Cruz** por aceitarem contribuir com o nosso trabalho.

Aos meus colegas de trabalho e amigos do Oncofar: **Tatianne, Tatyanna, Vivianne, Renata, Rafael, Valgrícia, Rawny, Camyla, Ana Luiza, Ramon, Paulo e Moisés**. Em especial a **Sâmia e Daiana**, pela maravilhosa equipe que formamos e pela amizade fortalecida durante os sofrimentos e alegrias.

A **Ana Paula** por toda dedicação e cuidado não só com o laboratório mas com as pessoas, por tantas vezes fazer muito além do que precisa com tanta humanidade, fé e amor.

À **Fátima de Lourdes Azevedo** por sempre está disponível para ajudar e acompanhar durante os experimentos.

Ao funcionário **Seu Josué** pela alegria diária, cuidado e preocupação e pelos serviços prestados.

As minhas amigas de sempre e para sempre, **Bruna, Déa e Rayssa** por acompanharem todos os momentos da minha vida e estarem sempre presentes.

A minha amiga **Rayssa Maciel**, por insistir tanto na minha vida , por todos os dias me levar para mais perto de Deus e me liderar com o amor e direção do Espírito Santo, pela compreensão nos momentos de ausência e por sempre insistir em estar perto.

As minhas irmãs em Cristo **Marília e Isabela**, por serem amor, cuidado e companheirismo em cada fase da vida.

Aos meus **pastores, líderes e irmãos em Cristo** que dedicaram tempo de conversa e oração que me fortaleceram para concluir essa etapa.

As amigas cariocas, **Sheyenne, Alice, Luisa e Isabela** por em meio a uma vida tão descartável fazerem questão de permanecer todos os dias. Em especial a **Yuka**, por escutar meus choros, lamentos e bobagens diários, rir, chorar e amar como se não houvesse distância.

As amigas, **Carolina, Cynthia, Emanuelle, Tatyane, Giovanna, Taísa e Analine**, por estarem sempre presentes em todos os detalhes e momentos importantes da minha vida.

A todos os **funcionários do IpeFarm** e as secretárias da Pós-graduação **Caroline Manguiera e Nilmar** pelos serviços prestados.

A **CAPES** pela bolsa concedida durante o período de doutorado.

A **Universidade Federal da Paraíba**, instituição maior, pelo desenvolvimento na minha carreira profissional.

E a todos que contribuíram de alguma forma para realização desse sonho.

Thaís Lisboa

RESUMO

O câncer, no sentido mais amplo, refere-se a mais de 277 tipos diferentes de doenças carcinogênicas que se caracterizam pelo crescimento desordenado e potencial metastático. Efeitos antitumorais de compostos tiofênicos e acridínicos são descritos na literatura, porém, a utilidade clínica desses compostos é limitada devido ao risco de alta toxicidade e resistência ao tratamento. Nesse contexto, a estratégia de hibridação molecular representa uma oportunidade de desenvolver novos fármacos que podem exibir melhor afinidade por alvo e efeitos indesejáveis reduzidos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade e atividade antitumoral do 2 - ((6-cloro-2-metoxi-acridin-9-il) amino) -5,6,7,8-tetra-hidro-4H-ciclo-hepta [b] -tiofeno-3-carbonitrila (ACS03), um híbrido tiofênico-acridínico que possui atividade antileishmania. A toxicidade foi avaliada *in vitro* (em linhagens de células não tumorais - HaCat e L929, e em células mononucleares de sangue periférico - PBMC) e *in vivo* (embriões de peixe-zebra e toxicidade aguda em camundongos). Diferentes linhagens de células tumorais humanas foram utilizadas para a avaliação da atividade antitumoral *in vitro* (HCT-116 - carcinoma de cólon, K562 - leucemia mieloide crônica, HL-60 - leucemia promielocítica, HeLa - câncer cervical e MCF -7 - câncer de mama), enquanto que *in vivo* foi utilizado o modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich, por meio do qual foi também avaliada a toxicidade após doses repetidas (sete dias). ACS03 exibiu seletividade em relação às células HCT-116 (concentração que inibe 50% do crescimento celular, $CI_{50} = 23,11 \pm 1,03 \mu M$), além de apresentar atividade significativamente maior ($p < 0,05$), em comparação aos compostos precursores. Em células HCT-116, ACS03 induziu redução de espécies reativas de oxigênio ($p < 0,05$), indicando efeito antioxidante, bem como alterações características de apoptose (aumento do pico sub-G1 e externalização de fosfatidilserina; $p < 0,05$). Em embriões de peixe-zebra, ACS03 não induziu letalidade durante o desenvolvimento embrionário e larval ($CL_{50} > 1.000 \mu M$), todavia, foi observado aumento nas atividades de lactato desidrogenase, glutatona S-transferase e acetilcolinesterase. No ensaio de toxicidade aguda, o valor de DL_{50} (dose letal 50%) em camundongos foi estimado em mais de 5000 mg/kg (via intraperitoneal – i.p.), e não foi observado alteração no número de eritrócitos micronucleados no ensaio de genotoxicidade (2000 mg/kg, i.p.). *In vivo*, ACS03 (12,5 mg/kg, i.p., sete dias de tratamento) induziu redução significativa no volume e massa tumoral, e na viabilidade e total celular ($p < 0,05$). Foi observado um aumento nos níveis de nitrito ($p < 0,05$) e redução da microdensidade vascular peritumoral ($p < 0,05$), associados a um efeito citotóxico e antiangiogênico, respectivamente. Em relação aos principais parâmetros de toxicidade (parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos), avaliados após tratamento antitumoral, foi observado que ACS03 (12,5 mg/kg) causou apenas alterações discretas. Em conclusão, os dados obtidos mostram atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* para o híbrido ACS03, bem como baixa toxicidade, caracterizando-o como um potencial composto anticâncer.

Palavras-chave: câncer colorretal; híbrido tiofênico-acridínico; atividade antitumoral; citotoxicidade; toxicidade; ACS03

ABSTRACT

Cancer, in the broadest sense, refers to more than 277 different types of carcinogenic diseases that are characterized by disordered growth and metastatic potential. Antitumor effects of thiophenic and acridine compounds are described in the literature, however, the clinical utility of these compounds is limited due to the risk of high toxicity and resistance to treatment. In this context, the molecular hybridization strategy represents an opportunity to develop new drugs that can exhibit better target affinity and reduced undesirable effects. The objective of this work was to evaluate the toxicity and antitumor activity of 2 - ((6-chloro-2-methoxy-acridin-9-yl) amino) -5,6,7,8-tetrahydro-4H-cyclohepta [b] -thiophene-3-carbonitrile (ACS03), a thiophene-acridine hybrid that has antileishmania activity. Toxicity was evaluated in vitro (in non-tumor cell lines - HaCat and L929, and in peripheral blood mononuclear cells - PBMC) and in vivo (zebrafish embryos and acute toxicity in mice). Different human tumor cell lines were used to evaluate antitumor activity in vitro (HCT-116 - colon carcinoma, K562 - chronic myeloid leukemia, HL-60 - promyelocytic leukemia, HeLa - cervical cancer and MCF -7 - breast cancer), while in vivo Ehrlich's ascitic carcinoma model was used, through which toxicity was also assessed after repeated doses (seven days). ACS03 exhibited selectivity in relation to HCT-116 cells (concentration that inhibits 50% of cell growth, $IC_{50} = 23.11 \pm 1.03 \mu M$), in addition to having significantly greater activity ($p < 0.05$), compared to compounds precursors. In HCT-116 cells, ACS03 induced a reduction in reactive oxygen species ($p < 0.05$), indicating an antioxidant effect, as well as characteristic changes in apoptosis (increased sub-G1 peak and externalization of phosphatidylserine; $p < 0.05$). In zebrafish embryos, ACS03 did not induce lethality during embryonic and larval development ($LC_{50} > 1,000 \mu M$), however, an increase in the activities of lactate dehydrogenase, glutathione S-transferase and acetylcholinesterase was observed. In the acute toxicity assay, the LD50 value (lethal dose 50%) in mice was estimated at more than 5000 mg / kg (intraperitoneal - ip), and no change in the number of micronucleated erythrocytes was observed in the genotoxicity assay (2000 mg / kg, ip). In vivo, ACS03 (12.5 mg / kg, i.p., seven days of treatment) induced a significant reduction in tumor volume and mass, and in viability and total cell ($p < 0.05$). An increase in nitrite levels ($p < 0.05$) and a reduction in peritumoral vascular microdensity ($p < 0.05$) was observed, associated with a cytotoxic and antiangiogenic effect, respectively. Regarding the main toxicity parameters (biochemical, hematological and histological parameters), evaluated after antitumor treatment, it was observed that ACS03 (12.5 mg / kg) caused only slight changes. In conclusion, the data obtained show antitumor activity in vitro and in vivo for the hybrid ACS03, as well as low toxicity, characterizing it as a potential anticancer compound.

Keywords: colorectal cancer; thiophene-acridine hybrid; antitumor activity; cytotoxicity; toxicity; ACS03

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características biológicas do câncer	26
Figura 2. Complexos de ciclina-Cdk do sistema de controle do ciclo celular ...	28
Figura 3. Via intrínseca e extrínseca da apoptose	33
Figura 4. Angiogênese tumoral	35
Figura 5. Estrutura do núcleo acridínico, que pode ser chamado de dibenzo[b,e]piridina, benzo[b] quinolina, 2,3,5,6-dibenzo-piridina ou 10-azaaantraceno.....	51
Figura 6. Estrutura do anel tiofênico.....	52
Figura 7. Efeito do ACS03* e doxorrubicina** (2,5 µM) na distribuição de células HCT-116 nas diferentes fases do ciclo celular, após 48 h de tratamento	81
Figura 8. Efeito do ACS03* e doxorrubicina** (2,5 µM) na produção de espécies reativas de oxigênio em HCT-116	83
Figura 9. Efeito do ACS03* e doxorrubicina** (2,5 µM) na apoptose em HCT-116 após 48h	82
Figura 10. Embriões e larvas de peixe-zebra expostos ao ACS03*, na concentração de 250 µM, ou aos controles meio E3 e DMSO** a 0,5% durante 96 h	84
Figura 11. Atividades de biomarcadores em larvas de peixe-zebra após 96 h de exposição a diferentes concentrações de ACS03*. (A) atividade de LDH; (B) atividade de GSH; (C) atividade de AChE.....	87
Figura 12. Efeitos do tratamento de sete dias (i.p.) com ACS03* (3,125; 6,25 ou 12,5 mg/kg) e 5-FU** em camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich	90
Figura 13. Efeito do tratamento com ACS03* (12,5 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) na microdensidade dos vasos peritoneais de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.....	92
Figura 14. Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com ACS03 (12,5 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) na concentração de citocinas no lavado peritoneal de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich	94
Figura 15. Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com ACS03* (12,5 mg/kg) na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em modelo de tumor ascítico de Ehrlich	95

Figura 16. Efeito de ACS03* (12,5 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) na quantificação de nitrito no fluido peritoneal de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich	96
Figura 17. Efeito do tratamento de sete dias com ACS03* (12,5 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) na distribuição de células de carcinoma ascítico de Ehrlich nas diferentes fases do ciclo celular	97
Figura 18. Histopatologia do fígado de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich após tratamento de sete dias (i.p.) com ACS03 (12,5 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg)	102
Figura 19. Histopatologia dos rins de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich após tratamento de sete dias (i.p.) com ACS03 (12,5 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg)	105

LISTA DE FLUXOGRAMA

Fluxograma 1. Representação esquemática dos métodos utilizados no estudo da toxicidade e atividade antitumoral do 2 - ((6-Cloro-2-metoxiacridina-9-Il) amino) - 5,6,7,8-tetra-hidro-4H-ciclo-hepta [b] -tiofeno-3-carbonitrila (ACS03) 64

LISTA DE ESQUEMA

Esquema 1. Esquema de síntese do 2 - ((6-cloro-2-metoxiacridina-9- il) amino) - 5,6,7,8-tetra-hidro-4H-ciclo-hepta [b] -tiofeno-3-carbonitrila (ACS03) a partir de 6,9-dicloro-2-metoxiacridina e de 2-amino-5,6,7,8-tetra-hidro-4H-ciclo-hepta [b] tiofeno-3-carbonitrila.....	59
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos da série ACS e suas respectivas características físico-químicas.....	59
Tabela 2. Citotoxicidade de ACS03* e doxorrubicina (2,5 µM)** frente linhagens de células tumorais e não tumorais pelo ensaio de MTT	79
Tabela 3. Citotoxicidade de ACS03* e seus precursores (2-amino-tiofeno e 6,9-dicloro-2-metoxi-acridina) contra células HCT-116 pelo ensaio de MTT após 72 horas de exposição	80
Tabela 4. Efeitos da administração de dose única (i.p.) de ACS03* em camundongos.....	88
Tabela 5. Número de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos tratados com ACS03* e ciclofosfamida.....	89
Tabela 6. Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com ACS03 (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	98
Tabela 7. Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com ACS03 (12,5 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) nos parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich	99
Tabela 8. Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com ACS03* (12,5 mg/kg) e 5-FU* (25 mg/kg) nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich	100

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	21
2.1 Aspectos gerais do câncer: conceito, epidemiologia e etiologia	21
2.2 Ciclo celular e sua desregulação no câncer e apoptose	26
2.3 Angiogênese tumoral	34
2.4 Microambiente Tumoral.....	38
2.5 Estresse oxidativo e câncer	42
2.6 Terapia do câncer	47
2.7 Derivados tiofênicos-acridínicos.....	50
3 3 OBJETIVOS	56
3.1 Objetivo Geral	56
3.2 Objetivos específicos	56
4 MATERIAL E MÉTODOS	58
4.1 Local de pesquisa	58
4.2 Material	58
4.2.1 Substância teste.....	58
4.2.2 Linhagens celulares	60
4.2.3 Células mononucleares do sangue periférico (PBMC).....	61
4.2.4 Embriões de peixe-zebra	62
4.2.5 Animais	63
4.3 Métodos	64
4.3.1 Ensaios <i>in vitro</i>	65
4.3.2 Ensaios <i>in vivo</i>	68
4.4 Análise estatística	76
5 RESULTADOS	78
5.1 Ensaios <i>in vitro</i>	78
5.1.1 Avaliação da citotoxicidade de ACS03 em células tumorais e não tumorais 78	
5.1.2 Investigação do mecanismo de ação antitumoral <i>in vitro</i>	80
5.2 Ensaios <i>in vivo</i>	83

5.2.1	Avaliação do efeito toxicológico de ACS03 <i>in vivo</i>	83
5.2.2	Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich	89
5.2.3	Investigação do mecanismo de ação antitumoral <i>in vivo</i>	91
5.2.4	Avaliação da toxicidade em animais transplantados com células de carcinoma ascítico de Ehrlich após o tratamento com ACS03.....	97
6	DISCUSSÃO	110
7	CONCLUSÃO.....	127
	REFERÊNCIAS.....	129
	ANEXOS	161
	APÊNDICE	167

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O câncer, no sentido mais amplo, refere-se a mais de 277 tipos diferentes de doenças carcinogênicas (HASSANPOUR; DEHGHANI, 2017), sendo uma das principais causas de morte e incapacidade, com 18,1 milhões de pessoas diagnosticadas globalmente e mais de 9,5 milhões de mortes em 2018 (IARC, 2020). A variedade de doenças em nível tecidual é um grande desafio para o diagnóstico específico do câncer e subsequente eficácia do tratamento (FISHER; PUSZTAI; SWANTON, 2013; MEACHAM; MORRISON, 2013; SENAPATI et al., 2018).

O desenvolvimento do câncer envolve alterações celulares e moleculares como a ativação de proto-oncogenes, inativação de genes supressores de tumor e/ou de genes reparadores de DNA, desenvolvimento de resistência aos sinais inibidores do crescimento, proliferação sem dependência de fatores estimuladores do crescimento, evasão da apoptose, aquisição de propriedades invasivas e angiogênicas e a evasão a resposta imune que produzem células com a capacidade de proliferar descontroladamente e disseminar para outras partes do organismo produzindo metástases (ADAMI et al., 2018; HANAHAHAN; WEINBERG, 2011).

As terapias convencionais para o tratamento do câncer são quimioterapia, radioterapia e cirurgia, além de terapias mais recentes como imunoterapia e terapia alvo (DICKENS; AHMED, 2018). A quimioterapia ainda é uma das principais escolhas para o tratamento do câncer (MARTINS et al., 2015). Apesar de constante estudo e avanços científicos na área a quimioterapia do câncer ainda apresenta muitas limitações devido principalmente a toxicidade dos fármacos para células saudáveis e desenvolvimento de resistência, que em conjunto limitam o aumento da dose e eficiência do tratamento (EL-FAR et al., 2018; PAJUELO-LOZANO et al., 2018; SALEM; ATTIA; GALAL, 2016). Diante dessa problemática, a pesquisa e o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos antitumorais continuam sendo necessários para superar esses obstáculos.

Acridinas são estruturas heterocíclicas que são alvos muito procurados devido à sua variedade de propriedades biológicas, pois são usadas como agentes antitumorais, antiparasitários e antibacterianos. Durante décadas, estas substâncias têm sido amplamente exploradas no campo da terapêutica

antineoplásica, especialmente contra a leucemia (BELMONT et al., 2008; ZHANG et al., 2014). Esses compostos, incluindo a amsacrina (m-AMSA), exibem atividade intercalante de DNA e inibidora de topoisomerase (CRENSHAW; GRAVES; DENNY, 1995; KAO-SHAN et al., 1984).

Já o tiofeno constitui um anel heterocíclico de cinco membros que contém enxofre e atraiu a atenção devido à sua presença em alguns medicamentos comercializados, incluindo antiasmáticos, diuréticos, anti-histamínicos e anticâncer (GRAMEC; PETERLIN MAŠIČ; SOLLNER DOLENC, 2014; JOSHI et al., 2004). Demonstrou-se que os compostos de tiofeno exibem citotoxicidade em várias linhagens celulares de câncer (GHORAB; BASHANDY; ALSAID, 2014; ROMAGNOLI et al., 2014). A literatura mostra que esses compostos podem induzir parada do ciclo celular e apoptose, além de afetar a polimerização da tubulina (DOS SANTOS et al., 2017).

No entanto, a utilidade clínica dos compostos acridínicos e tiofênicos é limitada devido a alta toxicidade e ao desenvolvimento de resistência ao tratamento (GENSICKA-KOWALEWSKA; CHOLEWIŃSKI; DZIERZBICKA, 2017; ZHAO et al., 2019).

A estratégia de hibridação molecular tem potencial para o planejamento e desenvolvimento de novos medicamentos. Essa técnica baseia-se na combinação de características estruturais específicas de diferentes frações bioativas para produzir novos compostos que podem exibir melhor afinidade-alvo e eficácia biológica, perfil de seletividade modificado e efeitos colaterais menos graves quando comparados aos seus precursores (ZHANG et al., 2014).

Um novo híbrido tiofeno-acridina, o 2 - ((6-Cloro-2-metoxiacridina-9-il) amino) -5,6,7,8- tetra-hidro-4H-ciclo-hepta [b] -tiofeno-3-carbonitrila (ACS03), foi sintetizado anteriormente. Este composto mostrou atividade antileishmania e nenhuma citotoxicidade contra eritrócitos. Além disso, outros compostos híbridos de tiofeno-acridina foram caracterizados com a capacidade de interagir com o DNA de Leishmania (DE LIMA SERAFIM et al., 2018).

Então, considerando a necessidade constante de pesquisa por antineoplásicos eficientes e menos tóxicos, e ainda considerando o potencial farmacológico dos derivados acridínicos e tiofênicos no contexto do câncer, levantou-se a hipótese de que ACS03 possui atividade antitumoral, podendo exercer seu efeito *in vitro* e *in vivo* por interferir em processos como a

desregulação do ciclo celular, a indução de angiogênese, o estresse oxidativo, bem como a formação de um microambiente que sustenta o crescimento tumoral.

Fundamentação Teórica

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Aspectos gerais do câncer: conceito, epidemiologia e etiologia

As neoplasias são caracterizadas pelo crescimento anormal de células, o que, usualmente, resultam na formação de uma massa celular, caracterizada como neoplasma ou tumor, que, por sua vez, podem ser divididos em benignos ou malignos (KASALA et al., 2015).

O tumor benigno é caracterizado por um crescimento celular que permanece confinado na sua localização original, geralmente envolvido em uma cápsula, este não invade o tecido circundante normal, nem se espalha para outros sítios do corpo. Apresenta, em geral, um crescimento lento e suas células se assemelham morfológicamente ao seu precursor celular. Sendo assim, os tumores benignos podem ser removidos por cirurgia e não apresentam risco de vida ao indivíduo acometido, exceto quando estão em localizações inoperáveis, como alguns tumores cerebrais (COOPER, 1992; TALMADGE; FIDLER, 2010).

Em contraste, o tumor maligno é capaz de invadir tecidos adjacentes espalhando-se para outros tecidos e órgãos. Além disso, raramente encapsulam, crescem rapidamente e têm anormalidades morfológicas, de modo que seu tecido de origem pode ser irreconhecível (TALMADGE; FIDLER, 2010). Apenas os tumores malignos podem ser considerados cânceres, e a sua habilidade de invadir tecidos normais e se espalhar pelo corpo (metástase) é o que torna o câncer tão perigoso. Sendo assim, o câncer é um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos podendo espalhar-se para outras regiões do organismo (BORTNER; CIDLOWSKI, 2014; KANDOTH et al., 2013).

Os tumores malignos podem ser classificados de acordo com o seu tecido de origem. Sendo classificados, principalmente, em: carcinomas, tumores que surgem das células epiteliais que formam os revestimentos das glândulas e as superfícies dos órgãos, como pele e mucosas; sarcomas, surgem de células que compõem o tecido conjuntivo, como fibroblastos, ossos, músculos, cartilagem e células de gordura; leucemias, são os tumores que surgem das células brancas do sangue, caracterizadas pela proliferação anormal de células progenitoras; linfomas, são tumores da linhagem linfóide que formam agregados sólidos,

frequentemente nos gânglios linfáticos; e mielomas, surgem dos plasmócitos no sangue (BADAL MCCREATH; DELGODA, 2017; ONO et al., 2009).

De acordo com estimativas mundiais do projeto Globocan 2018, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) da Organização Mundial da Saúde (OMS), houve 18,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 9,6 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo, no ano de 2018 (BRAY et al., 2018). Os tipos de câncer mais incidentes no mundo foram o de pulmão (2,1 milhões), mama (2,1 milhões) e colorretal (1,8 milhões). Nos homens, os mais frequentes foram pulmão (14,5%), sendo a principal causa de morte por câncer em homens (22%), seguido de próstata (13,5%), colorretal (10,9%), fígado (10,2%) e câncer de estômago (9,5%). Em mulheres, a maior frequência encontrada foi de câncer de mama (24,2%), sendo também a principal causa de morte (15%), seguido de pulmão (13,8%) e câncer colorretal (9,5%) (BRAY et al., 2018). Em 2030, a estimativa de carga global é de 21,4 milhões de novos casos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer. No Brasil, a estimativa para o triênio 2020-2022, aponta a ocorrência de 625 mil casos novos de câncer para cada ano reforçando a magnitude do problema do câncer no país (INCA, 2019).

O câncer pode ser ocasionado por diversos fatores, externos ou internos ao organismo. Os fatores externos, conhecidos como carcinógenos podem ser de origem química (ex.: cigarro), física (radiação ultravioleta) ou biológica (ex.: infecções por vírus ou bactérias). Os fatores internos estão associados a mudanças genéticas (ex.: mutações na sequência de DNA) ou epigenéticas (ex.: metilação, modificações nas histonas) (RYUNO; NAGURO; KAMIYAMA, 2017).

Existem vários mecanismos causais em cada tipo de câncer (RYUNO; NAGURO; KAMIYAMA, 2017). Porém, a maioria dos cânceres está associado com fatores ambientais (80-90%), estilo de vida ou exposição a carcinógenos conhecidos ou suspeitos (RILEY et al., 2012; STEWART et al., 2014). Esses fatores são capazes de causar alterações genéticas e/ou epigenéticas que contribuem para o desenvolvimento da doença. De fato, estima-se que 15% a 20% dos cânceres são impulsionados por agentes infecciosos; 20% a 30% são causados pelo uso do tabaco; e 30% a 35% estão associados à dieta, atividade física e/ou balanço energético (por exemplo, obesidade) (ANAND et al., 2008; IARC, 2012; WILLETT, 2000). A radiação ultravioleta (UV) da luz solar, o álcool

e muitas outras substâncias (por exemplo, amianto, benzeno, radônio) também desempenham um papel, sozinhos ou em combinação, embora o risco relativo dependa da intensidade e da duração da exposição, e dos fatores genéticos de cada indivíduo (BHATT; REDINBO; BULTMAN, 2017).

A carcinogênese é um processo de múltiplas etapas no qual uma célula adquire alterações essenciais que ditam a transformação progressiva de células saudáveis em células cancerosas, o que progride com hiperproliferação e culmina na aquisição de propriedades angiogênicas, potencial invasivo, e estabelecimento de lesões metastáticas (SINGH et al., 2013). Dessa forma, a carcinogênese é caracterizada por alterações em nível celular, genético e epigenético, causando a divisão celular anormal e alterando os processos de proliferação, diferenciação e morte celular (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011; IVANOVA et al., 2013).

O processo de carcinogênese pode ser dividido em quatro estágios. O primeiro deles é a iniciação que envolve a mutação de genes que ocorre espontaneamente ou induzida pela exposição a um agente cancerígeno. Os agentes iniciadores causam danos ao DNA e, portanto, podem ativar proto-oncogenes (como, por exemplo, o KRAS) e inativar genes supressores de tumor (TSGs), como o TP53 (HYNDMAN, 2016).

As alterações genéticas podem resultar em desregulação de vias de sinalização bioquímicas associadas à proliferação, sobrevivência e diferenciação celular, que podem ser influenciadas por vários fatores, incluindo o metabolismo da célula cancerígena e a resposta da função de reparo do DNA (SIDDIQUI et al., 2015). No entanto, a iniciação não dará origem a um câncer por conta própria: é necessário um agente promotor. O agente promotor é um composto que tem pouco ou nenhum efeito cancerígeno, mas tem a capacidade de promover o crescimento do tumor quando aplicado após um fator iniciador (HYNDMAN, 2016). A promoção é considerada um processo relativamente longo e reversível em que as células pré-neoplásicas, que proliferam ativamente, se acumulam (SIDDIQUI et al., 2015).

A progressão tumoral e metástase ocorre como resultado de uma nova alteração genética, como mudanças na expressão de genes (HYNDMAN, 2016). A progressão é a fase entre uma lesão pré-maligna e o desenvolvimento de câncer invasivo, assim, é o estágio final da transformação neoplásica, onde

ocorrem alterações genéticas e fenotípicas, e proliferação celular intensa. Isso envolve um aumento rápido no tamanho do tumor, onde as células podem sofrer novas mutações com potencial invasivo e metastático. A metástase envolve a disseminação de células cancerígenas do local primário para outras partes do corpo através da corrente sanguínea ou do sistema linfático (SIDDIQUI et al., 2015). Esse processo inclui etapas como: proliferação, angiogênese, desprendimento/invasão local, entrada e saída da circulação e crescimento em um local distante (FIDLER, 2003; GUPTA et al., 2010). As mutações associadas ao câncer ocorrem principalmente nos proto-oncogenes e nos genes supressores de tumor, além dos genes reparadores de DNA. Os proto-oncogenes são genes que, em células saudáveis, atuam normalmente em diferentes níveis de proliferação celular, mas podem promover o crescimento tumoral quando mutados (IMRAN et al., 2017). A versão mutada dos proto-oncogenes é chamada de oncogene, que surge como resultado de mutações que aumentam o nível de expressão ou atividade de um proto-oncogene. A conversão de proto-oncogene em oncogene é causada devido à translocação, rearranjo cromossômico ou mutação no gene devido à adição, deleção ou duplicação gênica (BISTER, 2015). Assim, os oncogenes exibem uma produção aumentada e desregulada de proteínas envolvidas na proliferação, diferenciação e morte celular, levando ao aumento da divisão celular, a diminuição da diferenciação e inibição de morte celular (IMRAN et al., 2017). Podem ser citados diversos oncogenes que codificam diferentes proteínas, tais como: KRas, receptores tirosina kinase, receptor do fator de crescimento epidérmico, BRAf, entre outros (THOMAS et al., 2007).

De modo semelhante, a mutação de genes supressores de tumor impede a inibição da progressão do ciclo celular, facilitando assim o crescimento anormal de células. Ou seja, em caso de falha no processo de divisão os genes supressores de tumor codificam proteínas que impedem a progressão do ciclo celular para que a falha seja reparada ou a célula entre em processo de morte celular por apoptose (DAMMANN et al., 2017; LIPSICK, 2020). Sendo assim, os genes supressores de tumor atuam normalmente inibindo a proliferação celular e o desenvolvimento de tumores. Em muitos tumores, esses genes são perdidos ou inativados, removendo assim os reguladores negativos da proliferação celular e contribuindo para a proliferação anormal de células tumorais (CURTIN, 2012).

O principal gene supressor tumoral é o TP53, que desempenha um papel central no câncer humano. A proteína p53 pode detectar e ser ativada por uma grande variedade de sinais de estresse extra e intracelulares, incluindo danos ao DNA, ativação de oncogenes, hipóxia, alteração de nível de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*), entre outros (MULLER; VOUSDEN, 2014; PFLAUM; SCHLOSSER; MÜLLER, 2014). Então, o p53 atua como fator de transcrição regulando uma variedade de processos celulares importantes, incluindo apoptose (OZAKI; NAKAGAWARA, 2011), parada do ciclo celular (SENTURK; MANFREDI, 2013), senescência (FENG; LEVINE, 2010), segregação cromossômica (JANSSEN et al., 2011), função antioxidante e regulação metabólica (BUDANOV, 2014).

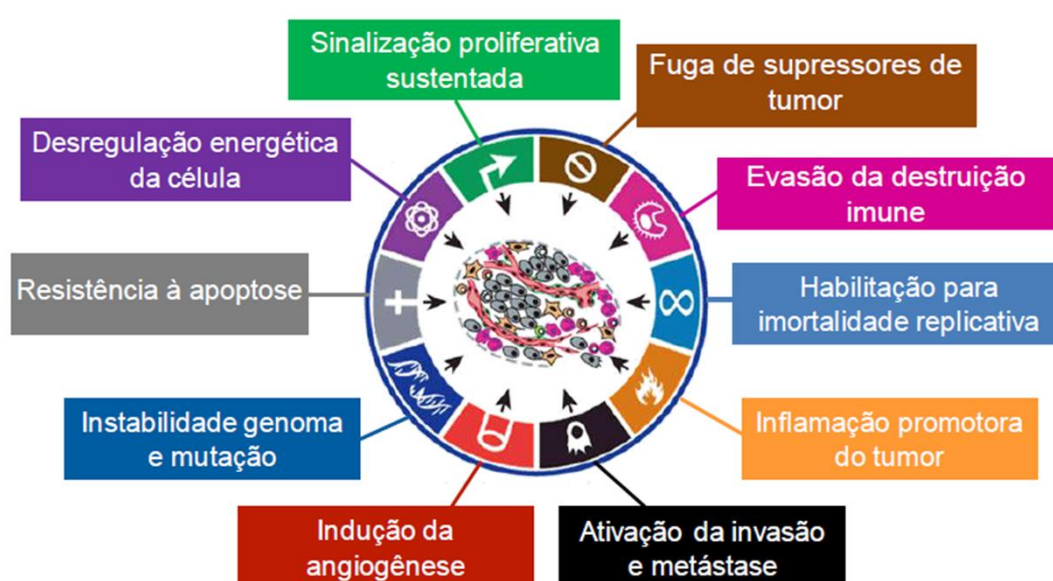
Já os genes reparadores de dano ao DNA desempenham papéis vitais na manutenção de um genoma saudável. O DNA é continuamente danificado por agentes genotóxicos gerados no ambiente (por exemplo, luz UV, radiação ionizante, etc.) ou intracelularmente (por exemplo, espécies reativas de oxigênio como subprodutos de processos metabólicos celulares) (ROMERO-LAORDEN; CASTRO, 2017), todavia, esses mecanismos reparadores conferem a integridade do DNA. Por outro lado, células cancerígenas podem surgir com o acúmulo de mutações nesses genes que conferem vantagens de crescimento e sobrevivência, por meio do acúmulo de erros de DNA e instabilidade genômica (LAHTZ; PFEIFER, 2011). Ainda, defeitos em genes reparadores de DNA representam o evento genético mais comumente envolvido na hereditariedade do câncer (ROMERO-LAORDEN; CASTRO, 2017; BROUSTAS; LIEBERMAN, 2014).

O exemplo mais conhecido de genes reparadores de DNA, possivelmente mutados no câncer, são os genes BRCA1 e BRCA2, que codificam proteínas envolvidas no reparo de rupturas de cadeia dupla de DNA por recombinação homóloga (FRIEDENSON, 2007). Quando qualquer um desses genes é mutado, de tal forma que seu produto proteico não é produzido ou não funciona corretamente, o dano do DNA pode não ser reparado adequadamente. Como resultado, as células são mais propensas a desenvolver alterações genéticas adicionais que podem levar ao câncer (CHAE et al., 2016).

Todas as alterações observadas para transformação celular e consequente desenvolvimento do câncer produzem modificações celulares que

fazem com que as células cancerígenas apresentem uma série de características específicas que as diferenciam das células saudáveis, a saber: sinalização sustentada para a proliferação celular, não responsividade a sinais supressores de crescimento, imortalidade replicativa, resistência à morte celular programada, reprogramação do metabolismo energético, evasão da destruição pelo sistema imune, ativação de invasão e metástase, instabilidade do genoma e indução de angiogênese (Figura 1)(HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Figura 1. Características biológicas do câncer



Fonte: Adaptado de HANAHAN; WEINBERG; 2011.

2.2 Ciclo celular e sua desregulação no câncer e apoptose

A regulação do ciclo celular é um processo diretamente relacionado com a geração e o desenvolvimento de neoplasias. O ciclo celular é uma sequência complexa de eventos coordenados que conduz a célula à divisão celular (FOSTER, 2008). É dividido em duas partes básicas: mitose e interfase. A mitose (divisão nuclear) correspondente à separação de cromossomos filhos, e termina com a divisão celular (citocinese). Existem diferentes etapas durante a mitose: a prófase, a prometáfase, a metáfase, a anáfase e a telófase. Os principais eventos que ocorrem na mitose são a condensação cromossômica na prófase, a formação do fuso durante a prometáfase, a fixação dos cromossomos no fuso

mitótico e sua organização na metáfase, a segregação dos cromossomos na anáfase e a formação de dois núcleos funcionais durante a telófase. Eventualmente, duas células filhas são produzidas por citocinese (MAES et al., 2017; MCINTOSH, 2016).

Durante a interfase, os cromossomos são descondensados e distribuídos por todo o núcleo, de modo que o núcleo aparece morfológicamente uniforme. Em nível molecular, no entanto, a interfase é o tempo durante o qual tanto o crescimento celular como a replicação do DNA ocorrem de forma ordenada na preparação da divisão celular passando por diferentes fases: G1, S (síntese), G2 e M (mitose) (MCINTOSH, 2016; VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

A fase G1 corresponde ao intervalo entre mitose e início da replicação do DNA. Durante G1, a célula é metabolicamente ativa e cresce continuamente, mas não replica seu DNA. G1 é seguida pela fase S (síntese), durante a qual a replicação do DNA ocorre. A conclusão da síntese de DNA é seguida pela fase G2 (intervalo 2), durante a qual o crescimento celular continua e as proteínas são sintetizadas em preparação para a mitose (MAES et al., 2017).

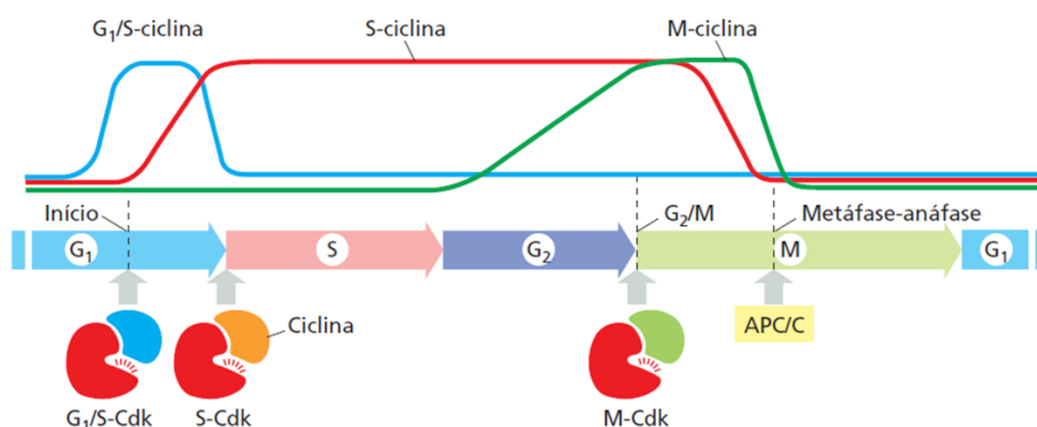
Os pontos de verificação (*checkpoints*) controlam os eventos ao longo do ciclo celular e são responsáveis pelo prosseguimento ou parada do ciclo, estes, por sua vez, são controlados por cinases dependentes de ciclina (Cdk), que são expressas quando a célula passa de G1 para S para G2 e para a fase M. Quando algum tipo de anormalidade é reconhecido nesses pontos, o ciclo celular para até a completa reparação do dano ou morte celular (VISCONTI; DELLA MONICA; GRIECO, 2016).

A atividade dessas cinases aumenta e diminui à medida que a célula avança através do ciclo. As oscilações levam diretamente a mudanças cíclicas na fosforilação de proteínas intracelulares que iniciam ou regulam os principais eventos do ciclo celular - replicação do DNA, mitose e citocinese. Um aumento na atividade de Cdk no início da mitose, por exemplo, leva a uma maior fosforilação de proteínas que controlam a condensação cromossômica, a quebra do envelope nuclear e a montagem do fuso (MAES et al., 2017).

Mudanças cíclicas na atividade de Cdk são controladas por uma complexa variedade de enzimas e outras proteínas. O mais importante regulador de Cdk são proteínas conhecidas como ciclinas. Cdks, como o próprio nome indica, são

dependentes de ciclinas para sua atividade: a menos que estejam fortemente ligados a uma ciclina, eles não têm atividade de proteína cinase (MAES et al., 2017). As ciclinas foram inicialmente designadas como tais porque elas sofrem um ciclo de síntese e degradação em cada ciclo celular. Os níveis de Cdk, ao contrário, são constantes. As mudanças cíclicas nos níveis de ciclina resultam na montagem cíclica e na ativação dos complexos de ciclina-Cdk; essa ativação, por sua vez, desencadeia os eventos do ciclo celular (LIM; KALDIS, 2013; MAES et al., 2017; MALUMBRES; BARBACID, 2009)(Figura 2).

Figura 2. Complexos de ciclina-Cdk do sistema de controle do ciclo celular



Fonte: ALBERTS; JOHNSON; LEWIS, 2000

Legenda: As concentrações dos três principais tipos de ciclinas oscilam durante o ciclo celular, enquanto as concentrações das Cdk's (não mostrado) não mudam e superam as quantidades de ciclinas. Na fase G₁ tardia, níveis crescentes de G₁/S-ciclina levam à formação de complexos G₁/S-Cdk que promovem a progressão através da transição de Início. Os complexos S-Cdk se formam no início da fase S e desencadeiam a replicação do DNA, assim como alguns eventos mitóticos iniciais. Os complexos M-Cdk se formam durante G₂, mas são mantidos em um estado inativo; eles são ativados no fim de G₂ e desencadeiam a entrada na mitose na transição G₂/M. Um complexo proteico separado, o APC/C, inicia a transição metáfase-anáfase.

No câncer, podem ser observadas diferentes modificações no controle do ciclo celular que resultam de alterações cromossômicas (amplificações e translocações de oncogenes e deleções de supressores de tumores) ou inativação epigenética (metilação de promotores de supressão tumoral). As Cdk's mal reguladas podem induzir sinalização mitogênica constitutiva e respostas defeituosas aos sinais anti-mitogênicos, levando a proliferação não programada e instabilidade genômica e cromossômica (MALUMBRES; BARBACID, 2009).

A proliferação não programada é causada principalmente pela desregulação na atividade das Cdks ou de seus reguladores (MALUMBRES; BARBACID, 2001, 2009), sendo a superexpressão de Cdk e ciclinas, e perda de CKI (inibidores de cinases dependentes de ciclinas) e da expressão de pRB (proteína do retinoblastoma) frequentemente relatadas em neoplasias humanas (MALUMBRES; BARBACID, 2001). A atividade aberrante de proteínas do ciclo celular e *checkpoints* resultam na desregulação da progressão do ciclo celular, que é uma das principais características do câncer (MAES et al., 2017). Esses defeitos incluem a proliferação não programada, instabilidade genômica (GIN, mutações de DNA aumentadas e aberrações cromossômicas) e a instabilidade cromossômica (CIN, mudanças no número do cromossomo) que causam a transformação maligna (MALUMBRES; BARBACID, 2009).

GIN é o resultado de alterações nas vias de resposta ao dano do DNA, causando a progressão do ciclo celular na presença de dano ao DNA. As mutações em proteínas de resposta ao dano do DNA e ativação constitutiva de Cdc25 levam a hiperativação de Cdks (MALUMBRES; BARBACID, 2009). Aneuploidia e outras alterações cromossômicas (CIN) são causadas por mutações em proteínas envolvidas na separação cromossômica durante a mitose. Várias proteínas da via SAC (ponto de verificação da montagem do fuso), controladoras da separação cromossômica, são frequentemente mutadas em câncer humano (MALUMBRES; BARBACID, 2009). Além disso, os tumores humanos apresentam defeitos no controle de transição G1 a S (DIAZ-MORALLI et al., 2013). Consequentemente, as Cdks envolvidas nesta transição, Cdk4, 6 e 2 são alteradas em mais de 80-90% dos tumores, sendo a regulação de sua atividade um passo importante durante o desenvolvimento do tumor (MALUMBRES, 2011; MALUMBRES; BARBACID, 2001).

A característica fundamental para o crescimento tumoral envolve a capacidade das células de sustentar a proliferação crônica. Nesse contexto, as células cancerígenas desregulam a produção e liberação dos sinais que promovem a entrada e progressão através do ciclo celular. Esses sinais são transmitidos, em geral, por fatores de crescimento que se ligam a receptores de superfície celular contendo domínios intracelulares de tirosina cinase, esses domínios emitem sinais intracelulares que promovem a progressão através do ciclo celular e o crescimento celular. As células cancerígenas utilizam de várias

estratégias para manter a proliferação celular, como: produção aumentada de fatores de crescimento, estímulo de células saudáveis próximas para produzir fatores de crescimento e aumento nos níveis de receptores exibidos nas células cancerígenas (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Dado que a principal característica das células tumorais é a desregulação do ciclo celular e a sua proliferação descontrolada, não é surpreendente que os principais atores dos mecanismos acima mencionados sejam frequentemente alterados no câncer. Portanto, a inibição do ciclo celular representa uma oportunidade para a intervenção terapêutica no tratamento de doenças proliferativas, como o câncer (MANCHADO; GUILLAMOT; MALUMBRES, 2012).

A maioria dos medicamentos contra o câncer perturba o ciclo de proliferação das células tumorais ao inibir/danificar os eventos do ciclo celular, que ativam os pontos de controle, prendem células em determinada fase do ciclo e induzem a apoptose (MANCHADO; GUILLAMOT; MALUMBRES, 2012). Por exemplo: os inibidores que tem como alvo a replicação do DNA (5-fluorouracil); a divisão celular (paclitaxel, estabilizador de microtúbulos) (WILLIAMS; STOEGER, 2012) e inibidores do ciclo celular como o flavopiridol (inibidor de CDK) (DICKSON; SCHWARTZ, 2009).

A apoptose é uma via de morte celular evolutivamente conservada que é responsável pelo descarte programado de células durante o desenvolvimento eucariótico normal e manutenção da homeostase do organismo (ELMORE, 2007). Para manter a fisiologia e a função tecidual normais, as células danificadas, disfuncionais ou desnecessárias são constantemente eliminadas por um processo regulado de morte celular (RATHMELL; THOMPSON, 2002; SEDGER et al., 2010).

A apoptose é considerada um componente vital de vários processos, incluindo renovação celular normal, desenvolvimento e funcionamento adequados do sistema imunológico, desenvolvimento embrionário e morte celular induzida por produtos químicos. A apoptose inadequada (para mais ou para menos) é um fator em muitas condições humanas, incluindo doenças neurodegenerativas, danos isquêmicos, distúrbios autoimunes e muitos tipos de cânceres (SINGH; LETAI; SAROSIEK, 2019).

As características morfológicas e bioquímicas da célula apoptótica incluem condensação da cromatina e fragmentação nuclear (picnose),

proteólise, formação de prolongamentos na membrana celular (*blebs* de membrana plasmática), encolhimento celular e ativação de caspases. Eventualmente, as células quebram em pequenos fragmentos cercados por membrana (corpos apoptóticos), que são eliminados pela fagocitose sem incitar uma resposta inflamatória (GALLUZZI et al., 2007; IORGA; DARA; KAPLOWITZ, 2017; REED, 2000).

Nos últimos anos, o mecanismo molecular responsável pela apoptose foi elucidado, revelando uma família de proteases intracelulares, as caspases, responsáveis direta ou indiretamente pelas alterações morfológicas e bioquímicas que caracterizam o fenômeno da apoptose (GIAMPAZOLIAS; TAIT, 2018).

As caspases possuem cisteína no seu sítio ativo e clivam seus substratos com resíduos de aspartato, como as pró-caspases, tornando-as ativas, caspases ativas participam da cascata de sinalização e mecanismos moleculares relacionados à morte celular (MUKHOPADHYAY et al., 2014; VAKIFAHMETOGLU-NORBERG; OUCHIDA; NORBERG, 2017), como perda da diferença de potencial de membrana, liberação de fatores pró-apoptóticos e de espécies reativas de oxigênio (ROS).

A fosfatidilserina é um componente fosfolipídico da membrana plasmática que também sofre alteração durante o processo apoptótico. Em células normais a fosfatidilserina é localizada na cama interna da membrana plasmática. Na maioria das células apoptóticas a fosfatidilserina é translocada para a camada externa da membrana plasmática e exposta na superfície celular sendo reconhecida por fagócitos (SHIRATSUCHI et al., 1998). A anexina V pertence a uma família de proteínas de ligação aos fosfolipídios, as anexinas. Liga-se na presença de íons Ca^{2+} com alta afinidade a fosfolipídios carregados negativamente como a fosfatidilserina (PS) (GRANDMAISON; NANOWSKI; VANCE, 2004). Na citometria de fluxo, a anexina V é comumente usada para detectar células apoptóticas por sua capacidade de se ligar à fosfatidilserina, um marcador de apoptose quando está no folheto externo da membrana plasmática (VAN GENDEREN et al., 2008).

Mais detalhadamente, a apoptose é iniciada por estímulos internos ou externos e mediada por duas vias distintas: a via intrínseca (mediada por

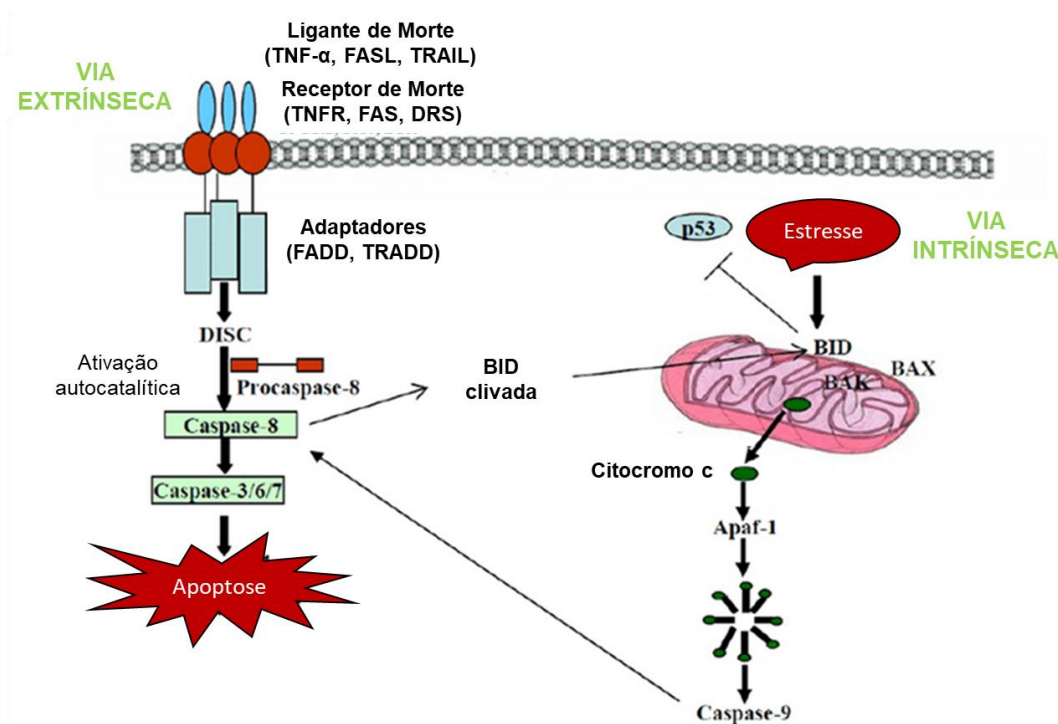
mitocôndrias) e a via extrínseca (mediada pelo receptor da morte) (SINGH; LETAI; SAROSIEK, 2019).

Como ressaltado, a via extrínseca é mediada por receptores de morte, proteínas transmembranares que detectam sinais extracelulares específicos de morte, pertencentes à superfamília do gene do receptor do fator de necrose tumoral (TNFR). Em seguida, moléculas adaptadoras, como FADD (do inglês, *Fas-Associated via Death Domain*) e TRADD (do inglês, *Tumor Necrosis Factor Receptor-1-Associated Death Domain*) são recrutadas para o domínio de morte do receptor formando o complexo de sinalização indutora de morte (DISC) (KISCHKEL et al., 1995), pro-caspases iniciadoras (pró-caspase -8 ou -10) são recrutadas ao DISC e levam à ativação autocatalítica e liberação da caspase ativa (RAMPAL et al., 2012). A caspase ativadora ativa caspases efetoras, especialmente caspase-3 e -7, a jusante que subsequentemente clivam substratos específicos, resultando em morte celular. Em outro mecanismo, o sinal precisa ser amplificado por vias apoptóticas dependentes de mitocôndrias, onde a caspase-8 medeia a clivagem da proteína pró-apoptótica, BID, que posteriormente libera fatores pró-apoptóticos mitocondriais que ligam a via extrínseca à intrínseca (LUO et al., 1998; MCARTHUR; KILE, 2018; RAMPAL et al., 2012) (Figura 3).

Estresses intrínsecos, como oncogenes, dano direto ao DNA, estresse oxidativo e fome podem ativar a via apoptótica intrínseca. As proteínas pró-apoptóticas no citoplasma, BAX e BID, se ligam à membrana externa das mitocôndrias ao receber o sinal de estresse. O BAK, outra proteína pró-apoptótica que reside dentro das mitocôndrias, interage com o BAX e o BID e causa a liberação do citocromo c e outros fatores pro-apoptóticos mitocondriais no citosol (GAHL; DWIVEDI; TJANDRA, 2016). O citocromo c se liga ao fator-1 de ativação da protease apoptótica (Apaf-1), que forma um apoptossomo que desencadeia a ativação do iniciador procaspase-9 (ACEHAN et al., 2002). A caspase-9 ativada inicia subsequentemente uma cascata de caspase envolvendo caspases efetoras a jusante, como caspase-3, caspase-7 e caspase-6, resultando finalmente em morte celular (MCARTHUR; KILE, 2018). A proteína supressora de tumor p53 é um sensor do estresse celular e é um ativador crítico da via intrínseca. A p53 inicia a apoptose ativando transcritionalmente os membros da família BAX proapoptótica e reprimindo as

proteínas Bcl2 antiapoptóticas (OZAKI; NAKAGAWARA, 2011). Ao contrário da via intrínseca, não há envolvimento da p53 na indução de apoptose na via extrínseca (RAVI et al., 2004) (Figura 3).

Figura 3. Via intrínseca e extrínseca da apoptose



Fonte: Adaptado de RAMPAL et al., 2012

Legenda: Na via extrínseca, os ligantes da morte se ligam aos receptores transmembranares da morte presentes na célula. A ligação do ligante aos receptores na célula alvo desencadeia o agrupamento de receptores na superfície celular. Essa agregação recruta as proteínas adaptadoras no local citoplasmático dos receptores, formando o complexo de sinalização indutora de morte (DISC). A formação do DISC aproxima as moléculas de pro-caspase, facilitando sua ativação autocatalítica e liberação no citoplasma onde ativam a cascata de caspase. A caspase-8 ativa também medeia a clivagem da proteína pro-apoptótica, a BID, que posteriormente libera fatores pro-apoptóticos mitocondriais que ligam as duas vias. No caso da via intrínseca, o sinal de estresse causa a ligação de proteínas citoplasmáticas, BAX e BID à membrana externa das mitocôndrias. Outra proteína mitocondrial BAK interage com BAX e BID, causando a liberação do citocromo c no citosol. Isso se liga ao Apaf-1, que forma um apoptossoma que desencadeia a ativação da procaspase-9. A caspase-9 ativada inicia ainda mais a cascata da caspase, levando à apoptose. A proteína supressora de tumor p53 é um sensor do estresse celular e desempenha um papel vital no início da apoptose, ativando transcricionalmente as proteínas proapoptóticas BID e BAX.

A apoptose ou morte celular programada é um processo fundamental no controle do desenvolvimento e progressão do câncer. A capacidade das células cancerígenas de escapar da apoptose é uma das características fundamentais do câncer e é um dos principais alvos do desenvolvimento da terapia do câncer (HANAHA; WEINBERG, 2011). Um dos avanços mais importantes na pesquisa do câncer nos últimos anos é o reconhecimento de que a morte celular principalmente por apoptose está crucialmente envolvida na regulação da formação de tumores e também determina criticamente a resposta ao tratamento. A morte de células tumorais pela maioria das estratégias anticâncer atualmente usadas em oncologia clínica, por exemplo, quimioterapia, radiação γ , terapia gênica ou imunoterapia, tem sido associada à ativação de vias de transdução de sinal de apoptose em células cancerígenas, tanto intrínseca quanto extrínseca (FULDA; DEBATIN, 2006).

2.3 Angiogênese tumoral

A angiogênese é o processo fisiológico por meio do qual novos vasos sanguíneos se formam a partir de vasos pré-existentes. É um processo normal e complexo controlado por certas biomoléculas produzidas no corpo (RAJABI; MOUSA, 2017). Os sinais químicos endógenos locais ou sistêmicos coordenam funções de células endoteliais e células musculares lisas. Nesse sentido, a geração de novos vasos sanguíneos provém de células sanguíneas preexistentes por meio da "brotação" de células endoteliais, expandindo assim a árvore vascular (RAJABI; MOUSA, 2017).

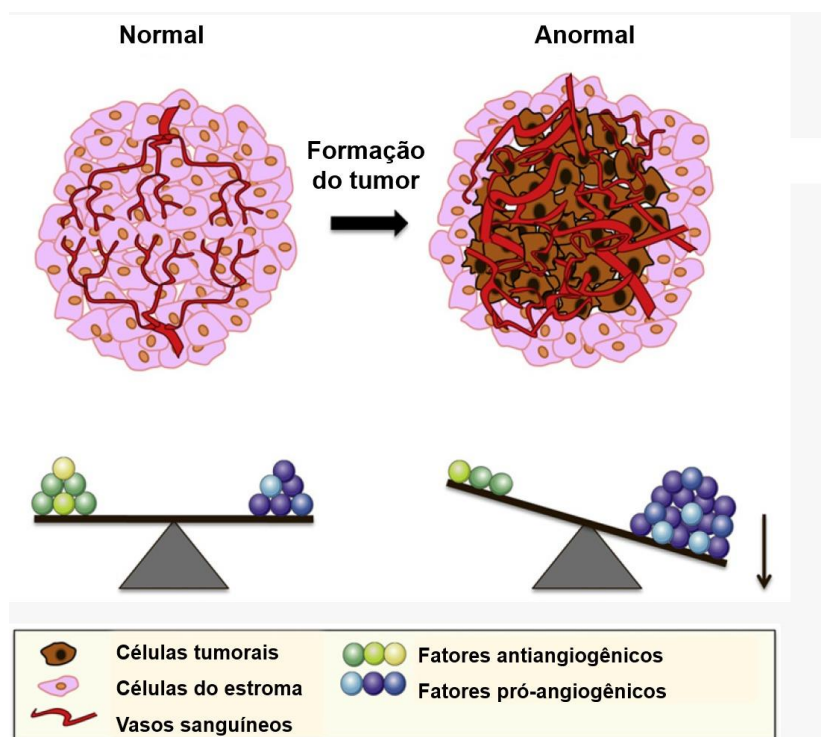
Os processos de angiogênese fisiológica são cruciais durante o desenvolvimento embrionário, cicatrização de feridas e formação colateral para melhorar a perfusão de órgãos (RAJABI; MOUSA, 2017). Contudo, processos angiogênicos anormalmente acelerados ou angiogênese patológica estão associados a várias enfermidades como artrite reumatoide, psoríase, diabetes *mellitus*, crescimento tumoral e disseminação metastática (CHENG; MA, 2015; ELSHABRAWY et al., 2015; HEIDENREICH; RÖCKEN; GHORESCHI, 2009; RAJABI; MOUSA, 2017).

Então, a angiogênese desempenha um papel crítico na progressão do câncer. À medida que os tumores crescem, sua vasculatura original pode ser

insuficiente para suprir a crescente massa de tecido e, conseqüentemente, a hipóxia local se desenvolve. Assim, a neovascularização é uma característica chave que determina o crescimento e metástase de tumores malignos (ZICHE; MORBIDELLI; MORBIDELLI, 2009).

O suprimento de sangue é necessário para suprir os tumores (com mais de 2 a 3 mm³) com oxigênio e nutrientes e remover resíduos metabólicos, permitindo que as células cancerígenas invadam tecidos próximos, se movam pelo corpo e formem novas colônias de células cancerígenas, chamadas metástases (LEWIS et al., 1995; RAJABI; MOUSA, 2017). Para isso, as células tumorais estimulam esse suprimento de sangue por meio da liberação de sinais químicos que estimulam a angiogênese, ou, estímulo de células saudáveis próximas a produzir moléculas de sinalização pró-angiogênicas (Figura 4) (RAJABI; MOUSA, 2017).

Figura 4. Angiogênese tumoral



Fonte: Adaptado de Giuliano;Pagès, 2013

Legenda: As células tumorais, juntamente com outras células hospedeiras, incluindo células inflamatórias e fibroblastos do estroma, produzem altos níveis de fatores pró-angiogênicos e níveis reduzidos de inibidores endógenos, inclinando a balança para um fenótipo pró-angiogênico.

Após a ativação das células endoteliais por estímulos angiogênicos, são produzidas enzimas proteolíticas que degradam a matriz extravascular (ECM) e a membrana basal. As células endoteliais proliferam e migram para a área perivascular, formando "brotos primários". O subsequente desenvolvimento desses brotos primários leva à formação de capilares, que é seguida pela síntese de uma nova membrana basal e amadurecimento dos vasos sanguíneos para completar as estruturas tipo tubo através do qual o sangue pode fluir (KOCH; DISTLER, 2007).

A angiogênese é regulada por moléculas ativadoras e inibidoras, fatores pró e antiangiogênicos. O *switch* angiogênico, ou seja, a mudança de um fenótipo para outro, envolve uma mudança no equilíbrio local entre os reguladores positivos e negativos da angiogênese. No câncer, em contraste ao que acontece em tecidos saudáveis, um *switch* angiogênico é quase sempre ativado estimulando o brotamento contínuo para a formação de novos vasos, sustentando a expansão do crescimento neoplásico e o desenvolvimento metastático (HANAHA; WEINBERG, 2011). De acordo com os dados experimentais e clínicos, a maioria dos tumores humanos não induzem angiogênese e existem *in situ*, esses tumores ficam sem suprimento de sangue por meses a anos, quando algumas células do tumor mudam para um fenótipo angiogênico (*switch* angiogênico). A base molecular deste mecanismo pode ser o aumento da produção de fatores angiogênicos ou a perda de inibidores da angiogênese (YADAV, 2015).

Dentre os principais fatores antiangiogênicos, podem ser citados o interferon, interleucinas, inibidores de MMPs (metaloproteinases de matriz), angiostatina e endostatina (CASTAÑEDA-GILL; VISHWANATHA, 2016).

Por outro lado, mais de uma dúzia de proteínas diferentes foram identificadas como ativadores angiogênicos, incluindo o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); o fator básico de crescimento de fibroblastos (FGF), que atua na promoção da proliferação celular, migração e diferenciação das células endoteliais vasculares; as angiopoietinas e o fator de crescimento transformante (TGF), que tem propriedades pró e antiangiogênicas a depender dos seus níveis; o fator de necrose tumoral (TNF), que atua como um fator de ativação de macrófagos que, por sua vez, secretam fatores angiogênicos; fator de crescimento endotelial derivado de plaquetas (PDGF), que está envolvido na

maturação dos vasos e recrutamento de pericitos; fator de crescimento de hepatócitos e fator de crescimento epidérmico (EGF), que ativa a via do seu receptor (EGFR) na regulação de fatores pró-angiogênicos, tais como o VEGF, sendo, portanto, visto como regulador indireto da angiogênese; e outros como, fator de crescimento placentário, interleucina-8 e fator estimulante de colônias de granulócitos (NISHIDA et al., 2006b).

A família VEGF e seus receptores (VEGFR) estão recebendo cada vez mais atenção no campo da vascularização neoplásica, sendo esse mediador liberado pelas células tumorais e células do estroma tumoral. O VEGF, que é superexpresso em muitas neoplasias malignas humanas, atua de diversas formas como regulador chave do processo angiogênico, induzindo proliferação, diferenciação e migração de células endoteliais, além de controlar a permeabilidade vascular (NISHIDA et al., 2006a; SHIBUYA, 2011; VAN DER VELDT et al., 2012).

Outro mediador importante no processo da angiogênese é o óxido nítrico (NO), um gás produzido de forma endógena e de vida curta, que atua como uma molécula de sinalização no corpo (KORDE CHOUDHARI et al., 2013). Assim, é um regulador pleiotrópico, crítico para vários processos biológicos, incluindo vasodilatação, neurotransmissão e imunidade mediada por macrófagos. O NO é sintetizado por três isoformas de Óxido Nítrico Sintases (NOS) codificadas diferencialmente em mamíferos: NOS neuronal (nNOS ou NOS-1), NOS induzível (iNOS ou NOS-2) e NOS endotelial (eNOS ou NOS-3). Todas as isoformas da NOS catalisam a reação de L-arginina, NADPH e oxigênio a NO, L-citrulina e NADP. O NO pode exercer sua ação celular por vias dependentes ou independentes de cGMP (MUNTANÉ; DE LA MATA, 2010).

Os efeitos do NO na biologia tumoral são amplos, abrangendo seu envolvimento na transformação celular, formação de lesões neoplásicas, iniciação e regulação da cascata metastática (KORDE CHOUDHARI et al., 2013). Estudos experimentais iniciais mostraram que a indução de iNOS (óxido nítrico sintase induzível) em células tumorais promove angiogênese (por aumento da expressão do VEGF), o que aumenta a densidade microvascular e a progressão tumoral (CHIN et al., 1997; FRANK et al., 1999; JADESKI et al., 2000; JENKINS et al., 1995; YANG et al., 2001).

Os efeitos do NO nos tumores parecem depender da atividade e localização das isoformas de NOS, concentração e duração da exposição ao NO e sensibilidade celular ao NO (BURKE et al., 2013). O NO endógeno promove o fluxo sanguíneo do tumor através da dilatação dos vasos arteriolas, diminui as interações adesivas endoteliais de leucócitos e aumenta a permeabilidade vascular (ZICHE; MORBIDELLI; MORBIDELLI, 2009). Ainda, NO pode promover a angiogênese por liberação e participação na via do VEGF, ativação da COX2, que estimula a produção de fatores pró-angiogênicos e prostaglandinas; além de limitar a proliferação de células leucocitárias que tem consequências adversas na resposta antitumoral do hospedeiro (BURKE et al., 2013; KORDE CHOUDHARI et al., 2013). A inibição de NOS, geneticamente ou com agentes farmacológicos, mostrou reduzir os níveis de VEGF e inibir a angiogênese tumoral (ANDRADE; HART; PIPER, 1992; MAEDA et al., 1994; MALONE et al., 2006; TOZER; PRISE; CHAPLIN, 1997).

Avanços recentes na compreensão do mecanismo angiogênico levaram ao desenvolvimento de vários agentes antiangiogênicos e antimetastáticos e que utilizam a estratégia de regulação do *switch* angiogênico (YADAV, 2015).

Os principais agentes antiangiogênicos utilizados na terapia do câncer são divididos em três principais classes: anticorpos monoclonais anti-VEGF ou anti-VEGFR (Bevacizumabe), os inibidores de tirosina-cinase (TKI) (Imatinibe) e os inibidores de proliferação de células endoteliais (Talidomida) (AL-ABD et al., 2017; CHIMOTE et al., 2014). A terapia antiangiogênica é uma forma de tratamento não curativo para o câncer e representa uma estratégia altamente eficaz contra o câncer, principalmente em combinação com agentes citotóxicos (YADAV, 2015). Essa combinação é eficaz, pois os fármacos antiangiogênicos permitem uma melhor penetração do fármaco, visto que normalizam a estrutura e função dos vasos do tumor, reduzindo a pressão do fluido intersticial (STURROCK et al., 2018). Porém esse fenômeno ainda não é bem conhecido e sua relevância clínica ainda não está clara (VASUDEV; REYNOLDS, 2014).

2.4 Microambiente Tumoral

Os tumores são circundados por matriz extracelular (ECM; do inglês, *extracellular matrix*) e células estromais, e o estado fisiológico do microambiente

tumoral (TME; do inglês, *tumor microenvironment*) estão intimamente ligados a cada passo da tumorigênese. Evidências sugerem que os componentes do TME são fibroblastos e miofibroblastos, células neuroendócrinas, células adiposas, células imunes e inflamatórias, o sangue e redes vasculares linfáticas e ECM (WANG et al., 2017). Os tumores podem influenciar o microambiente ao liberar sinais extracelulares, promovendo a angiogênese tumoral e induzindo tolerância imune periférica, enquanto as células imunes no microambiente podem afetar o crescimento e a evolução das células cancerosas (KORNEEV et al., 2017).

As células do sistema imune, em condições normais, protegem contra invasores, patógenos infecciosos e erradica células danificadas, incluindo células tumorais nascentes (DAVIS; MILNER, 2007). Porém, em condições de estabelecimento do tumor, as células do sistema imune persistem em locais de inflamação crônica. Essas células têm revelado uma grande participação em diferentes estágios do desenvolvimento tumoral, sendo capazes de imunoeditar as células tumorais e permitir o estabelecimento do tumor (O'SULLIVAN et al., 2012).

A imunoedição tumoral envolve células do sistema imune inato e adaptativo e é dividida em três estágios: eliminação, equilíbrio e evasão (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004). Na fase de eliminação o sistema imune visa erradicar as células tumorais antes mesmo que o tumor seja identificado clinicamente, esse processo é acompanhado por diferentes tipos celulares e moléculas de sinalização (MURDOCH et al., 2008; QIAN; POLLARD, 2010), mas há principalmente a participação de células do sistema imune inato (macrófagos e células *Natural Killer*) reconhecendo DAMPS (padrões moleculares associados a danos), antígenos tumorais e ligantes de NK e desencadeando mecanismos citolíticos e citotóxicos para eliminar a célula tumoral (EGEBLAD; NAKASONE; WERB, 2010; MANTOVANI, 2010; QIAN; POLLARD, 2010). No estágio de equilíbrio, as células tumorais não podem ser completamente eliminadas, mas o crescimento do tumor pode ser controlado por células do sistema imune adaptativo, principalmente linfócitos T. Para escapar da vigilância imunológica, as células cancerosas tendem a evoluir uma série de alterações fenotípicas nesta fase (RICCIARDI et al., 2015). Essas células, com vantagem de sobrevivência, acabariam por evadir-se do controle imunológico e se transformar em tumor primário (MITTAL et al., 2014).

Em outras palavras, o microambiente imune ajuda as células cancerosas a selecionar as células dominantes para que o tumor possa progredir na taxa mais rápida em um ambiente limitado (WANG et al., 2017). Na fase de escape as células do sistema imunológico criam um microambiente favorável ao crescimento das células tumorais e estabelecimento do tumor, reduzindo proteínas e citocinas antitumorais (PATHAK et al., 2016; TAO et al., 2016) e recrutando células que estabelecem um perfil imunossupressor, como células T reguladoras (Treg), células supressoras derivadas de células mielóides (MDSC) e macrófagos com fenótipo M2 (YARCHOAN et al., 2017).

As citocinas são mensageiros moleculares que permitem que as células do sistema imunológico se comuniquem entre si para gerar uma resposta coordenada, robusta, mas auto-limitada, a um antígeno alvo (LEE; MARGOLIN, 2011). As citocinas estimulam diretamente as células efectoras imunes e as células estromais no local do tumor e podem aumentar o reconhecimento de células tumorais por células efectoras citotóxicas, atuar como fatores de crescimento ou modular o sistema imune para evitar a destruição das células tumorais (LEE; MARGOLIN, 2011).

Nesse contexto, a inflamação no microambiente tumoral é um componente importante da resposta imune associada ao tumor. As células e moléculas inflamatórias podem funcionar para iniciar e manter a imunidade tumoral (MANTOVANI et al., 2008; SU et al., 2014). A diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ produz quatro subtipos de células: Th1, Th2, Th17 e T reguladoras (Treg) de acordo com seu repertório distinto de citocinas (HIRAHARA et al., 2010).

As células Th1 produzem interferon γ (IFN- γ), Interleucina -2 (IL-2), IL-12, IL-1 β e fator de necrose tumoral α (TNF- α), que estão envolvidas na resposta pró-inflamatória mediada por células. As citocinas associadas ao perfil Th1 exibem potentes efeitos antitumorais ativando linfócitos T citotóxicos CD8⁺ e citotoxicidade mediada pela células *Natural Killer* (NK), bem como aumentando a expressão do complexo principal de histocompatibilidade nas células apresentadoras de antígeno (XU et al., 2016).

Por outro lado, as células Th2 secretam citocinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13, que medeiam a resposta humoral anti-inflamatória e a supressão imune através da inibição da produção de citocinas do perfil Th1 (WEI et al., 2004).

As células Th17 são caracterizadas como células T CD4⁺ produtoras de IL-17, que também produzem IL-21, -22 e -26 (BETTELLI et al., 2006; DIGE et al., 2013; DONG, 2006; WANG et al., 2016), esse perfil pode apresentar um papel pró ou antitumoral e necessita ser melhor investigado (SONG; YANG, 2017). Além disso, as células Th17 podem exibir uma função crítica no desenvolvimento de auto-imunidade e reações alérgicas (MARUYAMA et al., 2010; OUYANG; KOLLS; ZHENG, 2008).

O TGFβ1, um membro da família TGFβ, que é predominantemente secretado por Tregs, é outra citocina multifuncional. Ele promove a progressão do tumor induzindo transição mesenquimatosa, escape tumoral ao antagonizar as funções de IL-2 e induzindo supressão imune (GAUR et al., 2014; WRZESINSKI; WAN; FLAVELL, 2007), invasão tumoral e metástase (JAKOWLEW, 2006; NEUZILLET et al., 2015).

Os macrófagos associados a tumores (TAMs), especificamente, são muitas vezes as células imunológicas que orquestram vários fatores no microambiente do tumor. Estes macrófagos anti-inflamatórios e pró-tumorigênicos modulam o microambiente local para facilitar o crescimento e metástase do tumor (PETTY; YANG, 2017). Em geral, os macrófagos podem ser polarizados em M1 ou M2. Os macrófagos M1 produzem citocinas pró-inflamatórias e imunoestimulatórias e estão envolvidos numa resposta de perfil Th1(YANG; ZHANG, 2017). Já os macrófagos M2 são mais comumente associados aos TAMs e participam de respostas de perfil Th2 desempenhando um papel importante na conexão da inflamação com o câncer. Podem promover proliferação, invasão e metástase de células tumorais, estimular a angiogênese tumoral e inibir a resposta imune antitumoral mediada por células T, seguida pela promoção da progressão tumoral (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010; SOLÍS-MARTÍNEZ et al., 2015).

Visto que a interação do sistema imunológico com as células tumorais no microambiente tumoral é um fator importante para o desenvolvimento do tumor, terapias voltadas para modular o sistema imunológico visando combater o crescimento tumoral vem sendo desenvolvidas. Algumas imunoterapias de câncer consistem em anticorpos que se ligam e inibem a função das proteínas expressas pelas células cancerígenas como o anti-HER2 (Trastuzumab); ou anticorpos que inibem segundos sinais inibitórios enviados as células T pelas

células cancerígenas, como os inibidores de checagem imunológica anti-PD1 (Nivolumab), anti-PDL1 (Avelumab) e anti-CTLA4 (Ipilimumab). Outras imunoterapias de câncer incluem vacinas antitumorais (anti-HPV e vacinação com células dendríticas) e infusões de células T (Transferência adotiva de células T) (YARCHOAN et al., 2017).

2.5 Estresse oxidativo e câncer

Espécies reativas de oxigênio, como ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($HO\bullet$), consistem em espécies de oxigênio radicais e não- radicais formadas pela redução parcial de oxigênio. A maioria das ROS endógenas produzidas nas células resulta de reações metabólicas que ocorrem dentro da mitocôndria ou peroxissomo. No entanto, existe um subconjunto de ROS que também são produzidas por nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NAPDH) oxidases (NOX), que são uma família de proteínas transmembranares que transportam elétrons através de membranas biológicas e catalisam a conversão de oxigênio em superóxido. O superóxido é então ainda mais reduzido pela superóxido dismutase (SOD) para produzir H_2O_2 . A ROS também pode ser produzida a partir de ciclo-oxigenases, lipoxigenases e timidina fosforilase (RAY; HUANG; TSUJI, 2012; STORZ, 2005).

O oxigênio atômico possui dois elétrons não emparelhados em órbitas separadas em sua camada externa de elétrons. Essa estrutura eletrônica torna o oxigênio suscetível à formação de radicais. A redução sequencial de oxigênio por meio da adição de elétrons leva à formação de vários ROS, incluindo: os radicais de oxigênio, como ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxila ($\bullet OH$), peroxila ($RO_2\bullet$) e alcoxila ($RO\bullet$), bem como espécies não radicais, que podem ser convertidos em radicais ou funcionar como agentes oxidantes, incluindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$), ozônio (O_3) e oxigênio singlete (1O_2) (YANG; ZHU; XI, 2018).

Quando ROS sobrecarregam o sistema de defesa antioxidante celular, seja por aumento nos níveis de ROS ou diminuição na capacidade antioxidante celular, ocorre estresse oxidativo. Para combater essas espécies produzidas normalmente as células contam com sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos para a manutenção da homeostasia oxidativa. O sistema enzimático

conta com a ação de enzimas como a catalase, a superóxido dismutase, a glutathione peroxidase e a ascorbato peroxidase que removem o O^{2-} e H_2O_2 , atuando como eficientes sistemas antioxidantes que protegem os componentes celulares. Dentre os antioxidantes não enzimáticos pode-se citar o ácido ascórbico, a glutathione, o tocoferol, carotenoides e melatonina, a coenzima Q, a ferritina e o ácido úrico (SILVA; JASIULIONIS, 2014).

Trabalhos recentes demonstraram que ROS têm um papel na sinalização celular, incluindo na apoptose, na expressão genética e na ativação de cascatas de sinalização celular, podendo servir como mensageiros intra e intercelulares (REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016; SIAUCIUNAITE et al., 2019; ZHANG et al., 2016).

No contexto do câncer, ROS são consideradas importantes moléculas de sinalização. Sabe-se que ROS desempenham um papel importante na tumorigênese e afetam múltiplos processos biológicos, como proliferação, instabilidade genômica, inflamação, resistência à apoptose e reprogramação metabólica. O que determinará os efeitos de ROS nas células cancerígenas é o a sua quantidade (KUMARI et al., 2018; LIOU; STORZ, 2010b; SZATROWSKI; NATHAN, 1991).

ROS são produzidas por células tumorais, mas também por componentes celulares que compõem o microambiente tumoral. Níveis aumentados de ROS são observados em várias células tumorais (WANG; ZHANG, 2019). Nesse sentido, embora altos níveis de ROS possam causar danos aos tecidos e morte celular, níveis menores de ROS podem ter um efeito proliferativo (WEINBERG; RAMNATH; NAGRATH, 2019).

Muitos fatores contribuem para o aumento dos níveis de ROS no câncer, que por sua vez levam a várias consequências biológicas. No geral, as teorias atuais sugerem que o aumento de ROS durante o desenvolvimento do câncer confere uma vantagem de sobrevivência (YANG et al., 2018).

De fato, ROS podem participar de todas as etapas do processo de carcinogênese. As células cancerígenas aumentam a geração de ROS, em comparação com suas contrapartes não cancerígenas. O aumento de ROS geralmente é acompanhado pela ativação do oncogene, que é a etapa inicial da transformação maligna. Ainda não se sabe se a ativação do oncogene é causada diretamente pelo aumento de ROS, porém, acredita-se que o dano oxidativo ao

DNA desempenhe um papel na carcinogênese e na transformação maligna. No entanto, o dano oxidativo ao DNA pode ser necessário, mas não suficiente, para o desenvolvimento do câncer (WEINBERG; RAMNATH; NAGRATH, 2019).

No que diz respeito ao papel de ROS na fase de promoção da carcinogênese, sabe-se que, em concentração moderada, ROS ativam a cascata de sinalização de sobrevivência das células cancerígenas envolvendo a proteína quinase ativada por mitógeno/proteína quinase regulada por sinal extracelular 1/2 (MAPK/ERK1/2), p38, c-Jun N-terminal kinase (JNK) e fosfoinositida-3-cinase/ proteína cinase B (PI3K/Akt), que por sua vez ativam o fator nuclear kappa-intensificador da cadeia leve de células B ativadas (NF-κB), metaloproteinases da matriz (MMPs) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (AGGARWAL et al., 2019). Sendo assim, o aumento de ROS pode mediar a sobrevivência, proliferação, resistência à apoptose, angiogênese e metástases em células pré-cancerosas, bem como em células cancerígenas, que podem promover tanto a iniciação quanto a progressão do câncer (WANG; YI, 2008).

Em contrapartida, a maioria dos quimioterápicos gera ROS nas células cancerígenas. É hipotetizado que o aumento dos níveis de ROS causado pelos quimioterápicos ultrapassa um limiar e induz a morte celular, este é o principal mecanismo proposto pelos quais múltiplas quimioterapias induzem a regressão tumoral (CONKLIN, 2004; KONG; BEEL; LILLEHEI, 2000; PELICANO; CARNEY; HUANG, 2004).

Antraciclinas, como Doxorrubicina, Daunorrubicina e Epirubicina, geram níveis mais altos de ROS celulares (MIZUTANI et al., 2005). Complexos de coordenação de platina, agentes alquilantes, camptotecinas, agentes de arsênico e inibidores da topoisomerase também induzem altos níveis de ROS (LI et al., 2016, 2013; WANG et al., 2013a), enquanto que taxanos, alcaloides da vinca, análogos de nucleotídeos e antimetabólitos, geram níveis mais baixos de ROS (CONKLIN, 2004; YANG et al., 2018).

Nesse contexto, apesar de bem caracterizado o efeito citotóxico de ROS, também vêm sendo estudadas terapias com efeito antioxidante. Devido ao papel crítico de ROS na iniciação e/ou promoção dos fenótipos malignos das células tumorais, o tratamento com antioxidantes é uma abordagem terapêutica aceita há muito tempo (KONG; LILLEHEI, 1998).

Por isso, estratégias como uso de antioxidantes na suplementação da alimentação (SEIFRIED et al., 2007), superexpressão de enzimas de eliminação de ROS (HYOUDOU et al., 2008; LIU et al., 2006; NELSON et al., 2006; NISHIKAWA et al., 2005; VENKATARAMAN et al., 2005), inibição de NAPH oxidase e uso de compostos de nitróxido vem sendo utilizados na terapia do câncer (FRUEHAUF; MEYSKENS, 2007; KUBO et al., 2006; SATO et al., 2006; SOULE et al., 2007).

Assim como ROS, o NO também tem um papel dicotômico no câncer. Modula diferentes eventos relacionados ao câncer, incluindo angiogênese, apoptose, ciclo celular, invasão e metástase (YING; HOFSETH, 2007). Em contraste com os efeitos promotores de tumores, também foi relatado que o NO tem efeitos antitumorais (KORDE CHOUDHARI et al., 2013).

O NO pode inibir a apoptose por meio de inibição direta da atividade de caspases, inibição da liberação do citocromo c, aumento da expressão de Bcl-2, supressão da geração de ceramida e ativação da ciclooxigenase. Além disso, a produção de NO via iNOS pode induzir diretamente mutações de GC para AT em TP53, o que pode contribuir para a perda de sua atividade repressora, bloqueando o processo apoptótico nessas células (UMANSKY; SCHIRRMACHER, 2001).

O NO desempenha um papel importante na progressão do tumor pela regulação da angiogênese. Estudos demonstraram que o VEGF produzido por células tumorais requer uma via NO/cGMP funcional dentro do compartimento final para promover o crescimento neovascular, assim, o NO endógeno promove o fluxo sanguíneo no tumor através da dilatação dos vasos arteriolar. Outro mecanismo pelo qual o NO promove a angiogênese é pela ativação da COX-2, que estimula a produção de fatores pró-angiogênicos e prostaglandinas (MARROGI et al., 2000). Por outro lado, estudos recentes têm relatado que o NO pode ter atividade antiangiogênica a depender de sua concentração na célula, porém o mecanismo envolvido nesse processo ainda não foi esclarecido (HUERTA, 2015).

O NO também possui um efeito estimulante de invasão, mediado pela regulação positiva de MMP-2 e MMP-9 (metaloproteinases da matriz) e regulação negativa de TIMP-2 e possivelmente TIMP-3 (inibidores teciduais de MMP) (JESPERSEN et al., 2009; LALA; ORUCEVIC, 1998).

O NO também participa de efeitos genotóxicos a partir da formação de espécies tóxicas e mutagênicas, modificação direta do DNA (quebras de cadeia, oxidação e desaminação de ácidos nucleicos e inibição de sistemas necessários para reparar lesões de DNA) (FELLEY-BOSCO, 1998). Considerando todos os aspectos abordados, pode-se inferir que o NO pode estar envolvido no crescimento e disseminação de tumores.

Embora poucos relatos tenham demonstrado o papel contrastante do NO na mediação da regressão tumoral, sabe-se que o NO também pode exercer efeitos (KORDE CHOUDHARI et al., 2013; O'SULLIVAN et al., 2014). Se o NO tem um efeito inibitório ou estimulador no processo de câncer, depende inicialmente da concentração de NO alcançada e também de outros fatores, como o tipo de célula exposta, o estado redox, a concentração intracelular final, a duração da exposição, etc., no leito do tumor (KORDE CHOUDHARI et al., 2013).

Foi relatado que o NO derivado de macrófagos, células de Kupffer, células *natural killer* e células endoteliais participa de atividade tumoricida contra muitos tipos de tumores, mostrando que o NO possui efeitos citotóxicos e citostáticos em células tumorais (KORDE CHOUDHARI et al., 2013; LECHNER; LIRK; RIEDER, 2005; LI et al., 1991; LOK et al., 2016). O efeito citotóxico do NO pode ser modulado por sua atividade supressora da síntese do DNA (LEPOIVRE; FLAMAN; HENRY, 1992; VERMA, 2018). Porém, a modulação pró-apoptótica é o efeito antitumoral mais conhecido do NO, por meio de ativação de caspases através da liberação do citocromo mitocondrial C no citosol, na regulação positiva da expressão de p53 e nas alterações na expressão de proteínas associadas à apoptose, incluindo a família Bcl-2 (CHOI et al., 2002; WANG et al., 2018). Nesse contexto, considerando os efeitos citostáticos e/ou citotóxicos do NO, estão sendo desenvolvidas estratégias para manipular os níveis de NO no microambiente tumoral para ganho terapêutico.

Os doadores de NO têm sido uma estratégia estudada para terapia anticâncer, sendo relatado que houve o aprimoramento de estímulos apoptóticos, inibição de metástases, inibição de angiogênese e inibição de hipóxia, dependendo da concentração de NO doador e sobre o tipo e estágio do câncer (HUERTA, 1992). Por isso os doadores de NO têm sido considerados novos agentes terapêuticos em potencial para o tratamento do câncer.

2.6 Terapia do câncer

O tratamento do câncer pode ser feito usando cirurgia, radioterapia, quimioterapia, imunoterapia, terapia alvo, hormonioterapia ou transplante de medula óssea. Dentre esses, a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia são considerados os métodos mais comuns de tratamento do câncer, usados isoladamente ou em combinação (SAFARZADEH; SANDOGHCHIAN SHOTORBANI; BARADARAN, 2014; SUDHAKAR, 2009). A escolha da terapia depende da localização, grau do tumor e do estágio da doença, bem como do estado geral do paciente (TAKIMOTO; CALVO, 2007).

Os quimioterápicos citotóxicos apresentam acentuada variação em sua estrutura e mecanismo de ação, e incluem: os agentes alquilantes, os antimetabólitos e os produtos naturais. Os *agentes alquilantes* atuam formando ligações transversais com a molécula de DNA, impedindo a sua replicação. Consequentemente, a célula fica incapaz de se dividir, o que acarreta na sua morte celular por apoptose. Seus principais representantes são a ciclofosfamida e a clorambucila (CHEUNG-ONG; GIAEVER; NISLOW, 2013; PAYNE; MILES, 2008), além da cisplatina como principal representante dos complexos de coordenação de platina (DASARI; BERNARD TCHOUNWOU, 2014; FLOREA; BÜSSELBERG, 2011; GALLUZZI et al., 2014).

Os *antimetabólitos* são compostos que carregam uma semelhança estrutural com metabólitos das células, como vitaminas, nucleotídeos ou aminoácidos. Tais compostos competem com o substrato natural pelo sítio ativo de uma enzima essencial ou de um receptor. Alguns, como o metotrexato, são incorporados diretamente ao DNA ou RNA (CHABNER et al., 2012; CHEUNG-ONG; GIAEVER; NISLOW, 2013). Outro representante importante da classe é o 5-fluorouracil que atua como um análogo das pirimidinas, esta é convertida em desoxinucleotídeo, o monofosfato de fluorodesoxiuridina (FdUMP) que, por sua vez, bloqueia a enzima, a timidilato sintase (TS), necessária para a conversão fisiológica de deoxiuridina monofosfato (dUMP) à timidina monofosfato (dTMP), um componente do DNA (CHON; STOVER; FIELD, 2017).

Os *produtos naturais* são substâncias orgânicas com uma grande diversidade estrutural e de mecanismos de ação no tratamento do câncer. Por isso, apresentam uma grande variedade de subclasses divididas de acordo com

sua estrutura e/ou mecanismo de ação, sendo as principais delas: os alcaloides da vinca (que bloqueiam a célula em mitose pela sua capacidade de ligar-se a tubulina e bloquear sua polimerização, como vimblastina e vincristina), os taxanos (que estabilizam a tubulina, como o paclitaxel), as epipodofilotoxinas (que se ligam à topoisomerase II e ao DNA e impedem o reparo de quebra que normalmente ocorre após a ligação da topoisomerase ao DNA, como o etoposídeo), os análogos da camptotecina (que ligam-se ao complexo de clivagem DNA-topoisomerase I e o estabilizam inibindo a religação do DNA e levando ao acúmulo de quebras de filamento único no DNA, como o irinotecan) e os antibióticos antitumorais (como a dactinomicina, que intercala o DNA e impede sua transcrição e replicação) (KINGHORN; CHIN; SWANSON, 2009; PRAKASH et al., 2013).

Com o conhecimento sobre as bases moleculares do câncer, os estudos e terapias para o tratamento da doença evoluíram. Assim, a estratégia de desenvolvimento de fármacos voltou-se ao planejamento para bloquear ou alterar mutações e aspectos fundamentais para o desenvolvimento e manutenção da doença, a chamada *terapia alvo*. Dois tipos de terapias alvo que estão sendo estudadas atualmente são as pequenas moléculas e os anticorpos monoclonais (HUGHES; CAENEPEEL; WU, 2016; PATHAK et al., 2018).

As pequenas moléculas são pequenas o suficiente para entrar facilmente nas células, então elas são direcionadas a alvos intracelulares envolvidos em processos que ajudam as células cancerígenas a se multiplicarem e espalharem. Essas moléculas focam na inibição das cinases e impedem a ativação de vias que estão desreguladas no câncer. A pequena molécula mais bem sucedida até agora foi o imatinibe (*Gleevec*®), que é usado para tratar leucemia mieloide crônica (LMC). A doença surge devido a uma translocação de cromossomos para gerar uma proteína anormal, BCR-ABL (região de *cluster* de ponto de interrupção - proto-oncogene de Abelson) e o imatinibe foi projetado para atingir esta proteína celular (BAUDINO, 2015).

O segundo tipo de terapia-alvo são os anticorpos monoclonais. Seu mecanismo de ação envolve a interrupção das interações entre o ligante e o receptor (extracelular), seja pelo anticorpo que bloqueia o local de interação ou pela proteína ligante que está sendo removida do sistema (GOLAY; INTRONA, 2012). Por exemplo, o bevacizumab (*Avastin*®), liga-se ao fator de crescimento

endotelial vascular (VEGF) inibindo a interação com seu receptor, interrompendo efetivamente as cascatas de sinalização (RANIERI et al., 2006).

O crescimento de tipos variados de câncer depende da regulação por hormônios endógenos. Assim, a *hormonioterapia* é um tratamento que utiliza a manipulação do sistema endócrino contra o câncer que usa hormônios para o seu crescimento. Essa terapia é utilizada principalmente no câncer de mama e de próstata e outros tumores com hormoniossensibilidade. A hormonioterapia utiliza moléculas que inibem a produção de hormônios ou a ligação a seus receptores e, por fim, bloqueiam a expressão de genes que promovem o crescimento e a sobrevivência de tumores. Dentre estes, se destacam o tamoxifeno, um modulador seletivo do receptor de estrogênio (ER) e os inibidores da aromatase (EBCTCG, 2015).

Outra modalidade de tratamento para o câncer é a *imunoterapia*, que consiste em utilizar o próprio sistema imunológico do seu corpo para ajudar a combater o câncer. Existem duas principais maneiras de administrar a imunoterapia: estimulando o próprio sistema imunológico para trabalhar mais ou para atacar mais as células cancerígenas, assim intensificar a resistência ao crescimento tumoral; ou utilizando componentes exógenos do sistema imunológico, tais como proteínas do sistema imunológico ou células mononucleares objetivando proporcionar capacidade imunológica de combate à doença. As principais formas de imunoterapia são anticorpos monoclonais, inibidores de pontos de controle imunológicos, vacinas e outras imunoterapias não específicas (MELLMAN; COUKOS; DRANOFF, 2011).

Os agentes quimioterapêuticos tradicionais são citotóxicos por meio da interferência na divisão celular, por isso, esses agentes atuam não apenas nas células cancerígenas mas, também, nas células saudáveis do organismo, causando efeitos colaterais, tais como, mielossupressão, náusea, vômito, diarreia e alopecia (IWAMOTO, 2013; SABAA et al., 2017).

Devido a não-especificidade dos quimioterápicos e seus consequentes efeitos adversos é necessário que os esforços no campo de pesquisa científica sejam direcionados ao desenvolvimento de novos fármacos com maior especificidade a fim de reduzir a toxicidade dos mesmos.

Além disso, a maioria dos tratamentos atuais enfrentam o mesmo problema comumente conhecido como resistência a múltiplas drogas (MDR, do

inglês *Multiple Drug Resistance*). Esse fenômeno é um dos problemas mais desafiadores que os pesquisadores e indivíduos acometidos com o câncer enfrentam atualmente (HOLOHAN et al., 2013). Por meio do fenômeno MDR a célula tumoral se protege da toxicidade dos fármacos impedindo que o mesmo permaneça dentro da célula e exerça seu efeito (LIU, 2009). A resistência aos fármacos é muito ampla e abrange todas as classes de agentes terapêuticos, incluindo agentes alquilantes, antimetabólitos, hormônios, compostos de platina, e produtos naturais (PAN et al., 2016).

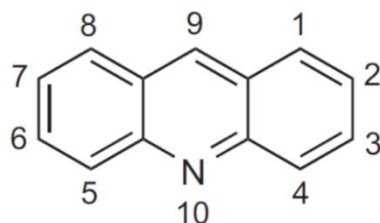
A resistência aos quimioterápicos pode ser dividida em duas grandes categorias: intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca indica que, antes de receber a quimioterapia, os fatores mediadores de resistência existiam na maior parte das células tumorais que tornam a terapia ineficaz. A resistência adquirida às drogas pode se desenvolver durante o tratamento de tumores inicialmente sensíveis e pode ser causada por mutações que surgem durante o tratamento, bem como através de várias outras respostas adaptativas, como aumento da expressão do alvo terapêutico e ativação de caminhos alternativos de sinalização compensatória (HOLOHAN et al., 2013). Assim, as pesquisas em quimioterapia têm seu foco voltado para a descoberta de novos fármacos com efeitos secundários reduzidos (baixa toxicidade), evasão de resistência a múltiplas drogas, viabilidade sintética e baixo custo (CHRISTOFFERSEN et al., 2009; LAQUINTANA et al., 2009).

2.7 Derivados tiofênicos-acridínicos

Diante da incidência elevada do câncer, a pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento desta enfermidade se fazem necessários com o objetivo de proporcionar maior resposta ao tumor com menor toxicidade.

Os derivados acridínicos (Figura 5), um composto orgânico heterocíclico de nitrogênio com a fórmula $C_{13}H_9N$, são fortes candidatos a fármacos, pois já possuem atividade antitumoral descrita na literatura (CHOLEWIŃSKI; DZIERZBICKA; KODZIEJCZYK, 2011; DENNY, 2002; GALDINO-PITTA et al., 2013; WANG et al., 2013b).

Figura 5. Estrutura do núcleo acridínico, que pode ser chamado de dibenzo[b,e]piridina, benzo[b]quinolina, 2,3,5,6-dibenzo-piridina ou 10-azaantraceno



Fonte: SCHMIDT; LIU, 2015.

Estes derivados tem a capacidade de interagir com sequências específicas de DNA e com outros alvos biológicos, tais como as topoisomerases I e II e a telomerase, inibindo-os (BARROS et al., 2012). Estudos mostraram que esta atividade biológica é atribuída à planaridade destas estruturas aromáticas, que podem se intercalar no DNA de cadeia dupla, interferindo nas suas funções celulares e enzimáticas (BELMONT et al., 2007).

O derivado acridínico mais amplamente conhecido e utilizado na clínica é a m-Amsacrina (m-AMSA), que é usada no tratamento de vários tipos de cânceres, principalmente leucemias e linfomas (BARROS et al., 2012; CHILIN et al., 2009; DENNY, 2002). A molécula de m-AMSA foi um dos primeiros agentes de intercalação de DNA a ser considerado um inibidor de topoisomerase II. Todavia, Liu e colaboradores (2014) mostraram outros possíveis mecanismos para a m-AMSA. Pela primeira vez foi demonstrado que a m-AMSA diminui a invasão celular por induzir aumento de ROS (do inglês, *reactive oxygen species*), o que leva a ativação de JNK e p38, e inibição de ERK. Estes efeitos em conjunto induzem uma diminuição na síntese e expressão de metaloproteinases em linhagens de células de leucemia humana (LIU et al., 2014).

Evidências sugerem que metaloproteinases da matriz (MMPs) promovem a progressão tumoral. O seu principal papel na angiogênese, crescimento tumoral e metástase é a degradação da matriz extracelular, alteração das interações célula-células e células-ECM e liberação e/ou a ativação de fatores de crescimento (GIALELI; THEOCHARIS; KARAMANOS, 2011; KLEIN et al., 2004). Em contraste, estudos recentes descreveram que a amsacrina induz apoptose em células U937 de leucemia por abolir a estabilização mediada por AKT e ERK de MCL1 (proteína induzida por diferenciação celular de leucemia

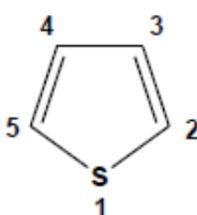
mieloide), destacando assim uma nova via subjacente ao efeito antileucêmico da amsacrina (LEE et al., 2017).

Porém, independente do seu mecanismo de ação, o uso clínico significativo de vários destes compostos é limitado por problemas tais como efeitos secundários, resistência a fármacos e baixa biodisponibilidade, os quais têm encorajado outras modificações destes compostos (SÁNCHEZ et al., 2006).

Novos derivados de acridina, assim como a amsacrina, mostram atividade moduladora de transportadores *ABCB1*, envolvidos no fenômeno de resistência a múltiplas drogas (*MDR*), uma das maiores barreiras para a quimioterapia (WANG et al., 2013). Quimioterápicos com capacidade de modular transportadores ABC podem ser um avanço promissor na terapia contra o câncer.

O anel tiofênico (Figura 6) é constituído de uma estrutura pentamérica com a presença de um heteroátomo de enxofre (na posição 1) e duas duplas ligações (nas posições 2 e 4). Este é um importante composto heterocíclico existente em diversas moléculas com atividades biológicas presentes em diversas drogas de origem natural e sintética (PUTEROVÁ; KRUTOŠÍKOVÁ; VÉGH, 2010).

Figura 6. Estrutura do anel tiofênico.



Fonte: PUTEROVÁ; KRUTOŠÍKOVÁ; VÉGH, 2010.

Os heterociclos tiofênicos são conhecidos por apresentar uma gama de atividades biológicas, dentre elas: atividades herbicida (EDWARDS, 1976; RUDOLF SANDMEIER, 1983), anti-protozoária, contra formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* e formas promastigotas de *Leishmania* (RAM et al., 1997; SILVA-JÚNIOR et al., 2016; VALDERRAMA et al., 1999), antitumoral

(DALLEMAGNE et al., 2003; PATEL et al., 2017; VÉRAS OF AGUIAR et al., 2016), analgésica e anti-inflamatória (FAKHR et al., 2009).

Os derivados tiofênicos, em geral, inibem o crescimento celular mediado pela inibição da polimerização da tubulina (PATEL et al., 2017; ROMAGNOLI et al., 2014; VÉRAS OF AGUIAR et al., 2016). Derivados 2 amino-tiofênicos em concentrações sub-nanomoleculares foram observados inibindo o crescimento de células cancerígenas, assim como, inibiu fortemente a polimerização de tubulina, porém apresentaram alta toxicidade e baixa solubilidade (VÉRAS OF AGUIAR et al., 2016). Em outros relatos derivados tiofênicos também foram observados apresentando baixa solubilidade e efeitos tóxicos como hepatotoxicidade, o que limitaram o seu uso clínico (ZHAO et al., 2019). Em contraste, Luo e colaboradores (2012) observaram um novo derivado amino tiofênico induzindo apoptose via MAPK em células cancerígenas. Os autores observaram uma diminuição significativa em ERK total e fosforilada e aumento de p-JNK e p38 nas células incubadas com os derivados tiofênicos (LUO et al., 2012).

Observando a potencialidade destes dois núcleos (tiofeno e acridina) no tratamento do câncer e a limitação no uso dos derivados acridínicos e tiofênicos viu-se uma nova perspectiva no planejamento de novos fármacos. A hibridação de moléculas biologicamente ativas é uma ferramenta poderosa para a descoberta de drogas usada para atingir uma variedade de doenças. Oferece a perspectiva de melhores medicamentos para o tratamento de várias doenças, incluindo câncer, malária, tuberculose e AIDS. Os medicamentos híbridos podem fornecer terapias combinadas em um único agente multifuncional e, ao fazê-lo, ser mais específicos e poderosos do que os tratamentos clássicos convencionais (BÉRUBÉ, 2016).

O derivado híbrido tiofênico-acridínico a ser estudado neste trabalho 2 - ((6-Cloro-2-metoxiacridina-9-il) amino) -5,6,7,8-tetra-hidro-4H-ciclo-hepta [b] - tiofeno-3-carbonitrila (ACS03), foi previamente relatado apresentando atividade anti-leishmania e capacidade de intercalar o DNA (DE LIMA SERAFIM et al., 2018). Nesse mesmo trabalho os autores observaram o efeito de moléculas com núcleo acridínico e tiofênico separadamente e em seguida hibridizados, revelando que as moléculas com núcleos tiofênico-acridínicos tinham seu efeito potencializado (SERAFIM, 2016).

Estudos anteriores mostram que moléculas que apresentam atividade anti-leishmania também possuem atividade anticâncer, a exemplo da miltefosina e da cisplatina (FUERTES et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2007; SOTO et al., 2004; TAVARES et al., 2007). Os dados mostram que provavelmente isso está relacionado com o fato dos parasitos e células cancerígenas compartilharem diversas semelhanças.

Ambos compartilham uma característica importante de se multiplicar num organismo hospedeiro, e ainda, acredita-se que os parasitas intracelulares podem interferir com a maquinaria de morte celular programada de sua célula hospedeira (HEUSSLER; KÜENZI; ROTTENBERG, 2001; LÜDER; GROSS; LOPES, 2001), assim como células cancerígenas. Em uma tentativa de escapar das respostas imunológicas do hospedeiro, parasitos e células cancerígenas podem se disseminar nos tecidos comprometendo o sistema imunológico. Portanto, a capacidade de alguns fármacos de induzir morte celular programada os torna eficazes em combater tanto parasitos, como *Leishmania*, quanto células cancerígenas (FUERTES et al., 2008).

Dessa forma, os dados descritos anteriormente sobre compostos tiofênicos e acridínicos com atividade antitumoral, e os resultados de atividade biológica já descritos para ACS03 estimulam a continuação do estudo no sentido de avaliar a atividade antitumoral, bem como avaliar os mecanismos de ação do composto.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a toxicidade e atividade antitumoral do derivado híbrido tiofênico-acridínico 2- ((6-Cloro-2-metoxiacridina-9-il) amino) -5,6,7,8-tetra-hidro-4H-ciclo-hepta [b] -tiofeno-3-carbonitrila (ACS03), bem como mecanismos de ação envolvidos nesse efeito.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antitumoral do ACS03, e seus precursores, em linhagens de células tumorais humanas e células não tumorais;
- Investigar mecanismos de ação antitumoral *in vitro* do ACS03 na linhagem celular mais sensível: interferência na regulação do ciclo celular, nos mecanismos de morte celular (apoptose/necrose) e na produção de ROS;
- Estudar a toxicidade aguda do ACS03 em embriões/larvas de peixe-zebra;
- Avaliar a toxicidade não clínica aguda de ACS03 em camundongos;
- Investigar a genotoxicidade do ACS03 em camundongos;
- Avaliar o potencial antitumoral *in vivo* do ACS03 em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich, e mecanismos de ação envolvidos: interferência no ciclo celular e na produção de ROS, e ações antiangiogênica e imunomoduladora;
- Estudar o perfil de toxicidade do ACS03 após tratamento antitumoral em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich.

Material e métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de pesquisa

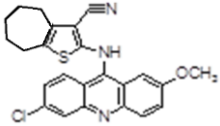
A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de OncoFarmacologia (OncoFar), no Biotério Prof. Thomas George, localizados no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM), onde funciona o Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB) do Centro de Ciências da Saúde (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 da Universidade Federal da Paraíba.

4.2 Material

4.2.1 Substância teste

O derivado híbrido tiofênico-acridínico ACS03 (Tabela 1), que foi gentilmente fornecido pelo Prof. Dr. Ricardo Olimpio de Moura do Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM) na Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), no Campus V, de João Pessoa, e foi sintetizado conforme descrito anteriormente (DE LIMA SERAFIM et al., 2018).

Tabela 1. Compostos da série ACS e suas respectivas características físico-químicas

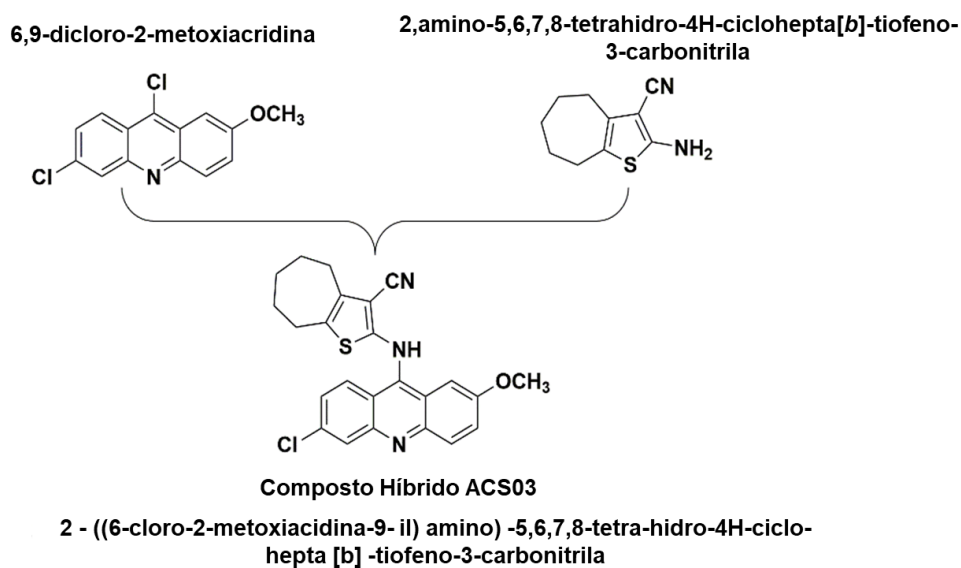
Composto	Estrutura	Aparência	PM	Rend %	FF	R _f	FM	LogP *
ACS03		Pó laranja	433	94,3	194-198	0,72	C ₂₄ H ₂₀ ClN ₃ OS	7,23

Fonte: SERAFIM, 2016

Legenda: PM – Peso molar, , Rend% - Rendimento (%), F.F. – Faixa de fusão, R_f – Fator de retenção, , FM – Fórmula molecular; Log de P teórico

A síntese deste derivado ocorreu de acordo com uma via plena convergente, onde primeiramente foi obtido o núcleo acridínico polisubstituído com os grupos cloro (Cl) e metóxi (OCH₃), que é a 6,9-dicloro-2-metóxi-acridina (ACS) (Alfaesar®), um composto obtido comercialmente (CAS 8638-4) e paralelamente foram obtidos os derivados 2-amino-tiofênicos. Os derivados 2-amino-tiofênicos foram acoplados com a ACS em meio etanólico a 70°C (Esquema 1).

Esquema 1. Esquema de síntese do 2 - ((6-cloro-2-metoxiacridina-9- il) amino) -5,6,7,8-tetra-hidro-4H-ciclo-hepta [b] -tiofeno-3-carbonitrila (ACS03) a partir de 6,9-dicloro-2-metoxiacridina e de 2-amino-5,6,7,8-tetra-hidro-4H-ciclo-hepta [b] tiofeno-3-carbonitrila



Fonte: LISBOA et al., 2019

4.2.2 Linhagens celulares

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, K562 HL-60 foram generosamente fornecidas pelo Dr. Manoel de Moraes (Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil). HeLa foi adquirida no banco de células do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil) e MCF-7 e L929 foram fornecidas pelo Dr. João Ernesto de Carvalho da Universidade de Campinas (Campinas, São Paulo, Brasil). HaCaT foi fornecida pela Dra. Jaciana Aguiar da Universidade Federal de Pernambuco (Recife, Pernambuco, Brasil).

As linhagens celulares foram cultivadas (5×10^4 células/mL) em frascos de cultivo utilizando o meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640, ou *Dulbecco's Modified Eagle's* (DMEM) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 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). Todos os tipos de células foram mantidos em 5% de CO₂ a 37 ° C de umidade.

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
K562	Leucemia mielóide crônica	Humana	RPMI
HL-60	Leucemia promielocítica aguda	Humana	RPMI
HeLa	Câncer cervical	Humana	DMEM
MCF-7	Adenocarcinoma de mama	Humana	RPMI
L929	Fibroblasto (não tumoral)	Murina	RPMI
HaCaT	Queratinócito (não tumoral)	Humana	DMEM

Fonte: LISBOA, 2020.

As células de carcinoma ascítico de Ehrlich foram fornecidas generosamente pela Divisão de Farmacologia e Toxicologia, CPQBA, UNICAMP

(Paulínia, São Paulo, Brasil). As células foram mantidas nas cavidades peritoneais de camundongos *swiss* no Biotério Dr. Thomas George (Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos/Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil).

4.2.3 Células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Para a realização do ensaio de citotoxicidade em células normais humanas, as células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs, do inglês, *peripheral blood mononuclear cell*) foram isoladas a partir de amostras de sangue humano, cedidas por doadores voluntários. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley, CAAE: 22986519.0.0000.5188, parecer nº 3.715.689.

As PBMCs são caracterizadas por possuir um 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), uma solução estéril que separa o sangue por gradientes de densidade, permitindo a obtenção de células mononucleares. As amostras foram submetidas a uma centrifugação de 400 x g, 20 °C, por 30 min. Após a centrifugação, é formado um anel contendo as células mononucleares, o qual foi retirado cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta *pasteur* estéril e transferido para um novo tubo, realizando-se duas centrifugações (400 x g, 20 °C, por 10 min) 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 1% de fitohemaglutinina (Invitrogen), por 24 horas antes do tratamento com ACS03.

4.2.4 Embriões de peixe-zebra

Para realização dos ensaios utilizando 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, mantidos a 26 ± 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 ± 50 μ 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 contendo 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, CaCl₂ 0,33 mM e MgSO₄ 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 conduzidos 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.

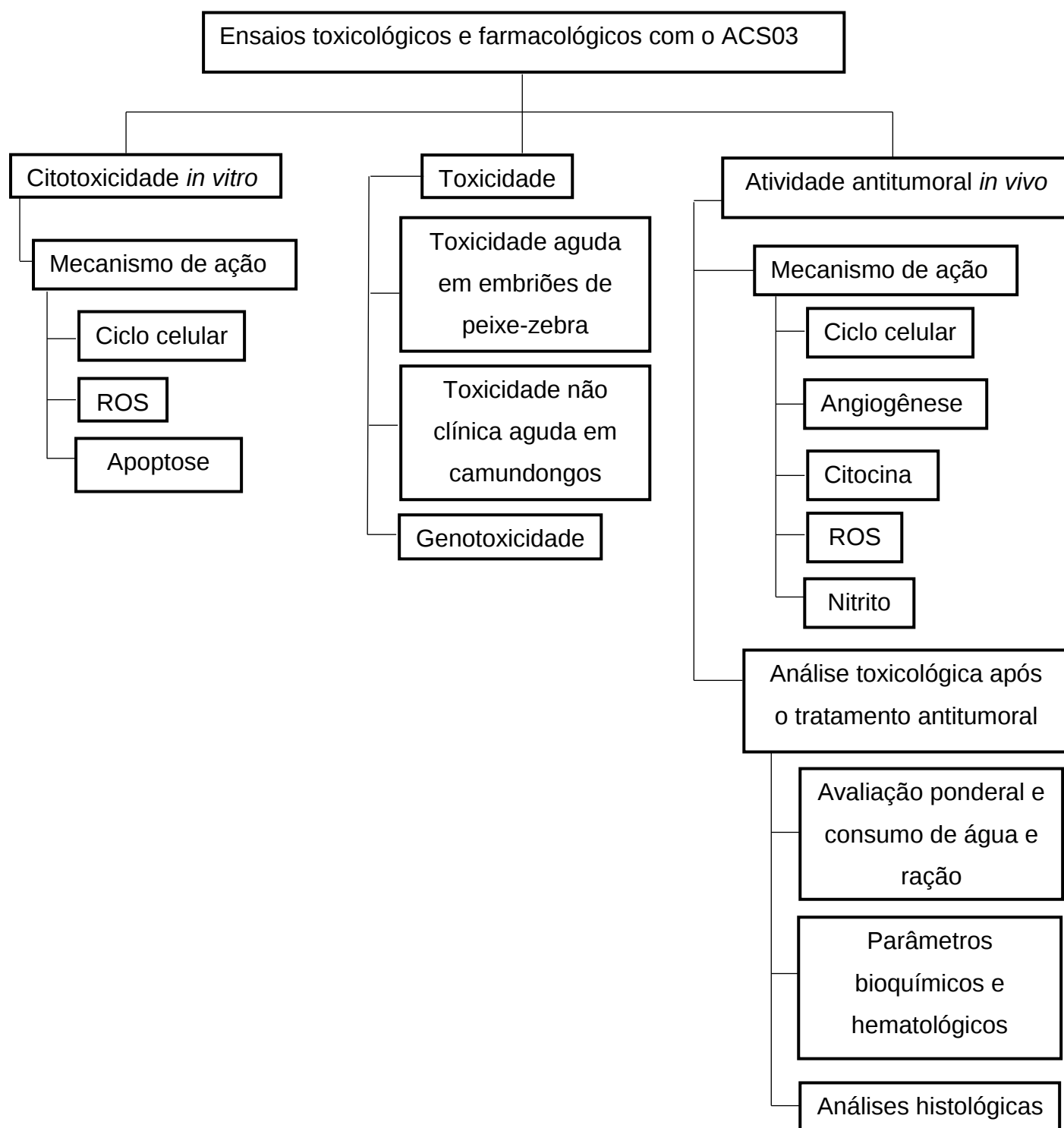
4.2.5 Animais

Foram utilizados camundongos albinos *Swiss* (*Mus musculus*) fêmeas, pesando entre 28 e 32 gramas, obtidos da Unidade de Produção Animal do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM/UFPB). Os animais foram agrupados em gaiolas de polietileno, mantidos sob temperatura de 21 ± 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.p.) e, em seguida, eutanasiados por deslocamento cervical. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal da UFPB sob certidão N° sob a certidão nº 093/2017.

4.3 Métodos

Fluxograma 1. Representação esquemática dos métodos utilizados no estudo da toxicidade e atividade antitumoral do 2 - ((6-Cloro-2-metoxiacridina-9-Il) amino) -5,6,7,8-tetra-hidro-4H-ciclo-hepta [b] -tiofeno-3-carbonitrila (ACS03)



4.3.1 Ensaios *in vitro*

4.3.1.1 Avaliação da atividade citotóxica *in vitro*

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 produto formado (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 μL) em placas de 96 poços na concentração de 3×10^5 células/mL (HCT-116, HeLa, MCF-7, K562, HaCat, L929), 5×10^5 (HL-60) e 1×10^6 (PBMC). Após 24 horas, as substâncias previamente dissolvidas em DMSO foram incubadas (100 μL) em diferentes concentrações (3,125-200 μM) 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 uma estufa com 5% de CO_2 , a 37 °C. A doxorrubicina foi utilizada como droga padrão, e testada em concentrações variando entre 0,31 e 20 μM . Prosseguido o período de incubação, as placas foram centrifugadas (500 g, 5 minutos, 25 °C), foi removido 110 μL do sobrenadante e 10 μL 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 μL 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 para cálculo da concentração da substância que produz 50% de inibição no crescimento celular (CI_{50}) (MELO et al., 2003).

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). Uma maior razão

IS indica uma maior seletividade da droga para células tumorais (PRITCHETT; NAESENS; MONTOYA, 2014).

4.3.1.2 Investigação do mecanismo de ação de ACS03 *in vitro*

4.3.1.2.1 Avaliação do ciclo celular

As células HCT-116 foram incubadas (2×10^5 células em 1 mL) em placas de 24 poços com o ACS03 nas concentrações de 25 e 50 μM (correspondentes a CI_{50} e o dobro), por 48 horas. Como droga padrão foi usada a doxorubicina (2,5 μM). Após o tratamento, as células foram coletadas por centrifugação (500 $\times g$, 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 μL de células foram então incubadas com RNase (3 μL ; 0,1 mg/mL) e iodeto de propídio (15 μL ; 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 obtidos com o *software* DIVA 6.0. 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). Por isso, durante a análise de dados desse tipo é possível observar uma maior fluorescência (quantidade de DNA) em células 2n (G0/G1) que ainda não entraram em mitose, durante a síntese de DNA (Fase S) observa-se uma quantidade maior de DNA, e consequentemente maior marcação com PI (>2n). Na fase G2/M podem ser observadas as células que já tiveram seu material genético duplicado (4n) e estão prestes a sofrer citocinese, tendo, assim, o dobro de DNA das células 2n (G0/G1). O pico sub-G1 é característico de células apoptóticas pois, possuem conteúdo de DNA menor que 2n, devido a fragmentação de DNA, uma característica do processo apoptótico

(CROWLEY; CHOJNOWSKI; WATERHOUSE, 2016; FRIED; PEREZ; CLARKSON, 1976).

4.3.1.2.2 Avaliação do mecanismo de morte celular (apoptose ou necrose)

As células HCT-116 foram incubadas (2×10^5 células em 1 mL) em placas de 24 poços com o ACS03 nas concentrações de 25 e 50 μM (correspondentes a CI_{50} e o dobro), por 48 horas. Como droga padrão foi usada a doxorubicina (2,5 μM). 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 μL) e 5 μL 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 μL de tampão de ligação. Em seguida, 10 μL do iodeto de propídio (IP) (20 $\mu\text{g/mL}$) 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 obtidos com o *software* DIVA 6.0.

4.3.1.2.3 Avaliação da produção 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 a 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 (2×10^5 células em 1 mL) em placas de 24 poços com o ACS03 nas concentrações de 25 e 50 μM (correspondentes a CI_{50} e o dobro), por 48 horas. Como droga padrão foi usada a doxorubicina (2,5 μM). Após o tratamento, as células foram coletadas por centrifugação (500 g, 20 °C, 5 minutos), ressuspensas em 1 mL de PBS, e posteriormente 300 μL de células foram marcadas com 6 μL de DCFH-DA (concentração final de 10 μM) e incubadas no escuro, durante 30 minutos, a 37 °C. Uma alíquota dessas amostras foi incubada com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), na concentração final de 500 μM , 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. O experimento foi realizado em triplicata e os dados foram obtidos com o *software* DIVA 6.0. A quantificação das espécies reativas de oxigênio (ROS) foi estimada pela intensidade média de fluorescência.

4.3.2 Ensaios *in vivo*

4.3.2.1 Ensaios toxicológicos *in vivo*

4.3.2.1.1 Avaliação da toxicidade aguda em embriões de peixe-zebra

A avaliação da embriotoxicidade aguda do ACS03 foi avaliada em peixe-zebra de acordo com o teste FET, protocolo nº 236 da OECD (2013), com algumas modificações (OECD, 2013). Vinte poços de uma placa de microtitulação de 96 poços foram preenchidos com 300 μL /poço da amostra teste na concentração de 250–15.62 μM e outros 20 poços foram preenchidos com o mesmo volume de meio E3 (controle negativo). Em cada poço foi adicionado um embrião com até 3 horas pós-fertilização (hpf). A concentração de 250 μM 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 foi considerado morto e a CL_{50} foi estimada (Concentração Letal Média) além da CE_{50} (Concentração Efetiva Média) para cada alteração morfológica. A exposição foi realizada em condição estática (i.e. sem renovação da substância teste ou de meio E3). As observações foram feitas utilizando um estereomicroscópio (Televal 31, Zeiss®), num aumento de 50x, e fotografadas. Ao final do experimento, as larvas sobreviventes foram rapidamente congeladas e conduzidas para incineração. A toxicidade aguda em embriões/larvas de peixe-zebra foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Davi Felipe Farias do Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.3.2.1.2 Teste de enzimas usando larvas de peixe-zebra

O teste FET foi repetido para ACS03 nas mesmas condições descritas no item anterior, mas desta vez os embriões foram expostos independentemente a três concentrações (10, 20 e 40 μ M). No final do período de exposição (96 h), as larvas foram rapidamente congeladas na proporção de 1 larva por 100 μ L de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4.

Grupos larvais de cada uma das três concentrações testadas e um grupo controle negativo (exposto apenas ao meio E3) foram macerados usando 1: 9 (p/v) de solução de NaCl fria a 0,9%. Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 $\times$ g por 10 min a 4 ° C, e os sobrenadantes resultantes foram utilizados para a medição do teor de proteínas solúveis e atividade enzimática. As atividades de acetilcolinesterase (AChE), glutathione S-transferase (GST) e lactato desidrogenase (LDH) foram medidas de acordo com Domingues et al. (2010). Os testes foram feitos em quadruplicado para cada enzima. O Teste de enzimas em larvas de peixe zebra foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. Davi Felipe Farias do Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.3.2.1.3 Avaliação da toxicidade não clínica aguda em camundongos

O ensaio de toxicidade aguda em camundongos foi realizado de acordo com o “Guideline for Testing of Chemicals” nº 423 da *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD), com algumas modificações (OECD, 2002) (Anexo D). Camundongos, três fêmeas por grupo, incluindo o controle, foram submetidos às doses de 300 ou 2000 mg/kg do ACS03 por via intraperitoneal (i.p.), e ao grupo controle foi administrado apenas o veículo (tween 80 a 12% em salina) e os animais foram observados por 14 dias. O nível de dose para ser usada como a dose de partida é selecionado a partir de um dos quatro níveis fixos, 5, 50, 300 e 2000 mg/kg. A dose inicial escolhida foi de 300 mg/kg, pois não existiam dados de toxicidade aguda em derivados tiofênicos-acridínicos. Em princípio, o método não se destina a permitir o cálculo preciso da DL50 (dose responsável pela morte de 50% dos animais experimentais), todavia fornece uma estimativa do seu valor, bem como permite uma classificação da substância em categorias de acordo com o “Globally Harmonized Classification System” - GHS.

4.3.2.1.4 Avaliação da genotoxicidade em camundongos

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 ACS03. Um grupo controle positivo (ciclofosfamida - 50 mg/kg – i.p.) e um grupo controle negativo (Tween 80 à 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 - 4×10^6 células/mL) nos camundongos experimentais (n=8 fêmeas/grupo) (DOLAI et al., 2012). Vinte e quatro horas após o implante, ACS03 foi solubilizado em Tween 80 (12%) e administrado diariamente por via intraperitoneal (i.p.), nas doses de 3,125; 6,25 e 12,5 mg/kg, por sete dias. O grupo controle 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 as mesmas condições experimentais.

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

Para a avaliação do efeito antitumoral do ACS03, 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 $\times 10^6/\text{mL}$.

4.3.2.3 Investigação dos mecanismos de ação antitumorais *in vivo*

Para a investigação do mecanismo de ação antitumoral *in vivo* do ACS03 foi selecionada a dose de 12,5 mg/kg, uma vez que não foi observada diferença significativa entre as doses testadas no estudo de atividade antitumoral *in vivo* em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich.

Os animais transplantados com células de CAE foram tratados por sete dias com ACS03 conforme descrito no item 4.3.2.2. No dia seguinte após a última administração, os animais dos grupos controle transplantado, ACS03 (12,5 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100 mg/kg i.p.) 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.

4.3.2.3.1 Avaliação do ciclo celular

Após a eutanásia dos animais conforme descrito no item 4.3.2.2, as células do líquido ascítico (1×10^6 células/mL) dos animais experimentais (grupos: controle; 12,5 mg/kg de ACS03; 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.

4.3.2.3.2 Avaliação do efeito antiangiogênico

Após a eutanásia dos animais conforme descrito no item 4.3.2.2, 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).

4.3.2.3.3 Quantificação de citocinas no lavado peritoneal

Para a quantificação de citocinas, os animais foram tratados e eutanasiados conforme descrito no item 4.3.2.2 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 no Kit do fabricante (Bioscience, Inc. Science Center Drive, EUA). Brevemente, placas de 96 poços foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, anti-IL-1 β , anti-IL-4, anti-IL-12 e anti-TNF- α , 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% (PBS) 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 β , IL-4, IL-12 e TNF- α 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, Synergy HT, EUA) a 450 nm. A quantidade de citocinas foi calculada a partir das curvas-padrão (SANTOS et al., 2018). A quantificação de citocinas foi realizada em colaboração com a Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.3.2.3.4 Quantificação de espécies reativas de oxigênio

Após a eutanásia dos animais conforme descrito no item 4.3.2.2, o líquido peritoneal foi lavado com PBS e centrifugado (245 g, 4 °C, 5 minutos). Após este processo, as células de CAE foram coletadas (2×10^6 células/mL), marcadas com DCFH-DA (concentração final de 10 μ M). As demais etapas foram realizadas conforme o item 4.3.1.2.2.

4.3.2.3.5 Quantificação dos níveis nitrito

Os métodos espectrofotométricos são os mais amplamente utilizados na determinação dos íons nitritos, sendo mais utilizada a reação de Griess, na qual o íon nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido formando um sal de diazônio que reage por acoplamento com cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina (NED) formando um diazo composto, de coloração vermelha que apresenta um máximo de absorção em torno de 540 nm (RAMOS; CAVALHEIRO; CAVALHEIRO, 2006).

Os níveis de nitrito no líquido peritoneal foram quantificados espectrofotometricamente utilizando o reagente de Griess, constituído de 0,1% de N- 1- naphthil-etilenodiamina, 1% de sulfanilamida em solução de ácido fosfórico a 2,5%, utilizando NaNO_2 como padrão (GREEN et al., 1982). Para isto, os animais transplantados com células de CAE foram tratados por sete dias com ACS03 conforme descrito no item 4.3.3.2 No dia seguinte após a última administração, os animais dos grupos controle, ACS03 (12,5 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) 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. O líquido peritoneal foi coletado e centrifugado a 5000 rpm, 20°C, durante dez minutos. Para a montagem das placas, foi adicionado 100 μ L do sobrenadante de células em quadruplicada nos poços previamente adicionados da solução de Griess. Após 10 minutos à temperatura ambiente, as placas foram lidas em espectrofotômetro UV/visível de microplacas com filtro de 560 nm. As concentrações de nitrito foram calculadas a partir de uma curva padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de

nitrito de sódio. Os testes foram feitos em quadruplicata e os valores expressos em μ molar.

4.3.2.4 Avaliação da toxicidade em animais transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich

4.3.2.4.1 Avaliação ponderal e do consumo de água e ração

Para a avaliação de possíveis efeitos tóxicos produzidos pelo tratamento com ACS03, os animais dos grupos controle, ACS03 (12,5 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg), descritos no item 4.3.2.2, foram pesados no início e no final do tratamento e diariamente foram avaliados os consumos de água e de ração.

4.3.2.4.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos

Os animais transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich foram tratados por sete dias com ACS03 e anestesiados conforme descrito no item 4.3.2.2. Amostras de sangue foram coletadas pelo plexo orbital com o auxílio de uma agulha heparinizada. 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, 2016).

4.3.2.4.3 Análises histológicas

Os animais transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich foram tratados por sete dias com ACS03 e anestesiados conforme descrito no item 4.3.2.2. Fígado e rins dos animais dos grupos controle transplantado, ACS03 (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 3,0 μm e subsequentemente submetidos à coloração hematoxilina-eosina e tricrômio de masson, este último destinado ao estudo do tecido hepático. Em seguida foram examinados ao microscópio óptico (JUNQUEIRA, L. C., 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 (IC: 95%), foi realizada a partir de 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 Ensaio *in vitro*

5.1.1 Avaliação da citotoxicidade de ACS03 em células tumorais e não tumorais

A citotoxicidade de ACS03 foi avaliada em linhagens de células tumorais (HCT-116, HeLa, MCF-7, K562, HL-60), e não tumorais (HaCat e L929), além de PBMC, sendo o resultado apresentado na tabela 2.

Após 72 h de tratamento, ACS03 mostrou citotoxicidade seletiva para a linhagem HCT-116 ($CI_{50} = 23,11 \pm 1,03 \mu M$; $p < 0,05$), enquanto não foi observada citotoxicidade para outras linhagens de células tumorais ($CI_{50} > 50 \mu M$). Para as células não tumorais PBMC, HaCat e L929, foi observado menor efeito citotóxico ($CI_{50} = 115,2 \pm 5,82 \mu M$; $62,18 \pm 1,15 \mu M$ e $36,63 \pm 1,43$, respectivamente; $p < 0,05$), comparando-se às células HCT-116 (Tabela 2).

Tabela 2. Citotoxicidade de ACS03* e doxorrubicina** frente linhagens de células tumorais e não tumorais pelo ensaio de MTT após 72 horas de exposição

Células	CI ₅₀ ***(μM)		IS****	
	ACS03	DOXO	ACS03	DOXO
HCT-116	23,11 ± 1,03	2,57 ± 0,001	-	-
HeLa	> 50	NT	-	-
MCF-7	> 50	NT	-	-
K562	> 50	NT	-	-
HL-60	> 50	NT	-	-
HaCat	62,18 ± 1,15 ^a	0,28 ± 0,001	2,69	0,10
PBMC	115,2 ± 5,82 ^a	0,056 ± 0,002	4,98	0,02
L929	36,63 ± 1,43 ^a	NT	1,58	-

Fonte: LISBOA, 2020

Legenda: Dados foram obtidos de três experimentos realizados em quadruplicata e apresentados em valor de CI₅₀. ^a*p* < 0,05 comparado a HCT-116 (ACS03 – 72h). *ACS03: 2 - ((6-Cloro-2-metoxiacridina-9-il) amino) -5,6,7,8-tetra-hidro-4H-ciclo-hepta [b] -tiofeno-3-carbonitrila
 DOXO: Doxorrubicina. *CI₅₀: Inibição de 50% do crescimento. ****IS: Índice de seletividade (CI₅₀ da célula não tumoral/CI₅₀ da célula tumoral (HCT-116). NT: Não Testado

A partir de 24 horas foi possível observar pequena redução na viabilidade de células HCT-116 quando expostas ao ACS03, apresentando uma CI₅₀ > 200 μM. Em contrapartida, após 48 horas de incubação pode-se observar uma maior citotoxicidade do composto, com CI₅₀ de 94,69 ± 1,09 μM.

A doxorrubicina foi utilizada como droga padrão, esta foi testada nas linhagens HCT-116 e HaCat, após 72 h de tratamento, sendo observado CI₅₀ de cerca de 2,5 ± 0,001 μM e 0,28 ± 0,001 μM, respectivamente. Em PBMC, foi obtido um valor de CI₅₀ 0,056 ± 0,002 μM para a doxorrubicina (Tabela 2).

Além disso, o efeito citotóxico dos precursores de ACS03 foi avaliado contra células HCT-116. Observou-se maior atividade citotóxica do ACS03 em comparação aos seus precursores 2-amino-tiofeno (IC₅₀ > 1000 μM) e 6,9-dicloro-2-metoxi-acridina (IC₅₀ = 202,3 ± 1,19 μM) (Tabela 3).

Tabela 3. Citotoxicidade de ACS03* e seus precursores (2-amino-tiofeno e 6,9-dicloro-2-metoxi-acridina) contra células HCT-116 pelo ensaio de MTT após 72 horas de exposição

Composto	CI ₅₀ ** (μM)
ACS03	23,11 ± 1,03
2-amino-tiofeno	>1000 ^a
6,9-dicloro-2-metoxi-acridina	202,3 ± 1,19 ^a

Fonte: LISBOA, 2020

Legenda: Dados foram obtidos de três experimentos realizados em quadruplicata e apresentados em valor de CI₅₀. ^a*p* < 0,05 comparado ao ACS03. *ACS03: 2 - ((6-Cloro-2-metoxiacridina-9-il) amino) -5,6,7,8-tetra-hidro-4H-ciclo-hepta [b] -tiofeno-3-carbonitrila. **CI₅₀: Inibição de 50% do crescimento.

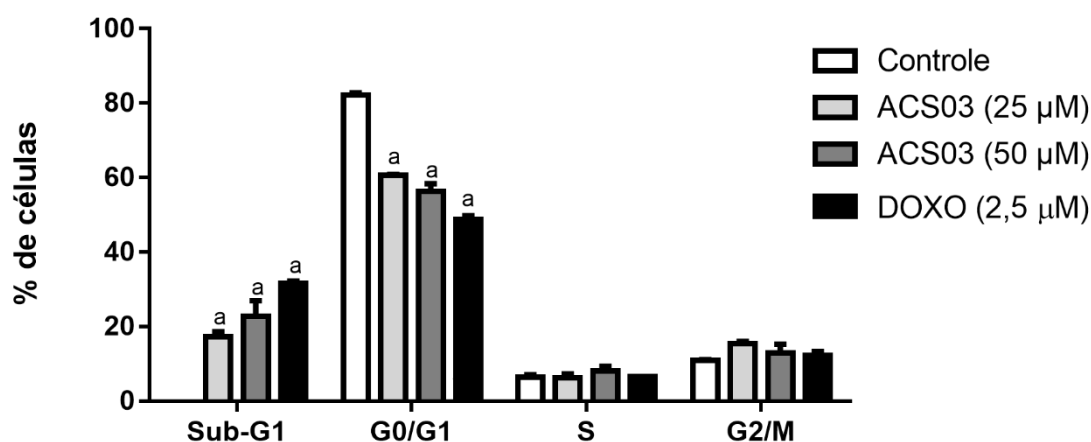
5.1.2 Investigação do mecanismo de ação antitumoral *in vitro*

5.1.2.1 Avaliação da regulação do ciclo celular

Após 48 horas de tratamento, ACS03 induziu um aumento no pico sub-G1 para 17,2 ± 1,4% (*p* < 0,05), associado a uma diminuição na fase G0/G1 para 60,0 ± 0,26% (*p* < 0,05), quando comparado com o grupo controle (0,03 ± 0,01% e 82,23 ± 0,56%, respectivamente) na concentração de 25 μM. Na concentração de 50 μM houve um aumento no pico sub-g1 para 22,67 ± 4,26, seguido de uma diminuição em G0/G1 para 56,27 ± 2,10, quando comparado com o grupo controle (0,03 ± 0,01% e 82,23 ± 0,56%, respectivamente) (Figura 7).

O tratamento com a doxorrubicina também promoveu aumento significativo do pico sub-G1 (31,57 ± 0,85%; *p* < 0,05), enquanto reduziu a porcentagem de células nas fases G0/G1 (48,90 ± 1,12%, *p* < 0,05) em comparação ao controle (Figura 7).

Figura 7. Efeito do ACS03* e doxorrubicina** na distribuição de células HCT-116 nas diferentes fases do ciclo celular, após 48 h de tratamento



Fonte: LISBOA, 2020

Legenda: A: Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de um experimento em triplicata analisado por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao Controle.

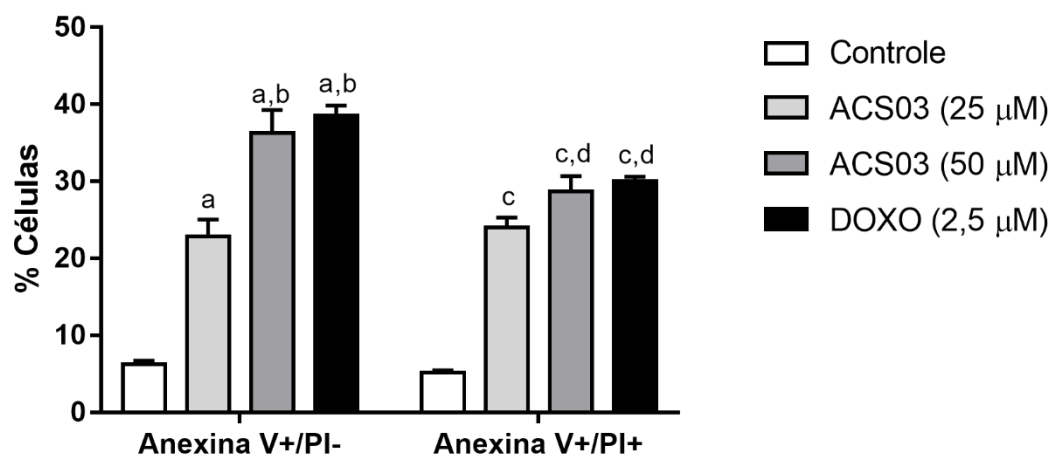
*ACS03: 2 - ((6-Cloro-2-metoxiacridina-9-il) amino) -5,6,7,8-tetra-hidro-4H-ciclo-hepta [b] - tiofeno-3-carbonitrila

**DOXO: Doxorrubicina

5.1.2.2 Avaliação do mecanismo de morte celular

Foi observado que o ACS03 induziu apoptose em células de carcinoma colorretal (HCT-116) após 48h de incubação, visto que a porcentagem de células marcadas com anexina V aumentou de $6,23 \pm 0,50\%$ no controle para $22,9 \pm 2,15\%$ ($p < 0,05$) nas células tratadas com ACS03 na concentração de $25 \mu\text{M}$ e para $36,3 \pm 2,96\%$ ($p < 0,05$) em $50 \mu\text{M}$ de ACS03. Além disso as células tratadas com doxorrubicina apresentaram porcentagem de células marcadas com anexina significativamente semelhante ao ACS03 ($50 \mu\text{M}$; $38,50 \pm 1,35\%$). Observou-se também um aumento na porcentagem de células marcadas com Anexina V e PI de $5,20 \pm 0,28$ no controle para $24,00 \pm 1,31\%$ em ACS03 ($25 \mu\text{M}$; $p < 0,05$) e para $28,7 \pm 2,00\%$ em ACS03 ($50 \mu\text{M}$; $p < 0,05$). As células tratadas com doxorrubicina apresentaram porcentagem de células marcadas com anexina e PI significativamente semelhante ao ACS03 ($50 \mu\text{M}$; $30,00 \pm 0,60\%$)(Figura 8).

Figura 8. Efeito do ACS03* e doxorrubicina** na apoptose em HCT-116 após 48h



Fonte: LISBOA, 2020

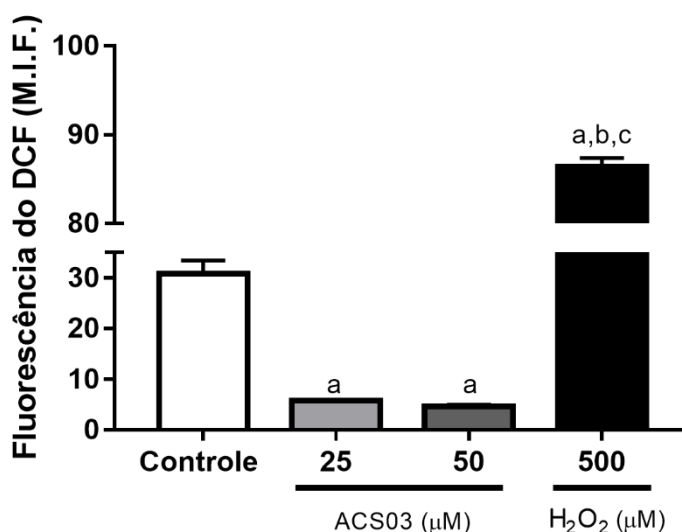
Legenda: A: Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de um experimento em triplicata analisado por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle Anexina V+/PI-. ^b $p < 0,05$ comparado a ACS03 (25 µM) Anexina V+/PI-; ^c $p < 0,05$ comparado ao grupo controle Anexina V+/PI+; ^d $p < 0,05$ comparado a ACS03 (25 µM) Anexina V+/PI+. *ACS03: 2 - ((6-Cloro-2-metoxiacridina-9-il) amino) -5,6,7,8-tetra-hidro-4H-ciclo-hepta [b] -tiofeno-3-carbonitrila. **DOXO: Doxorrubicina

5.1.2.3 Avaliação do estresse oxidativo

ACS03 induziu redução na produção de espécies reativas de oxigênio em células HCT-116, após 48 horas de tratamento, nas concentrações de 25 µM ($5,79 \pm 0,02$; ; $p < 0,05$) e 50 µM ($4,70 \pm 0,18$; ; $p < 0,05$), quando comparadas ao controle ($30,87 \pm 1,49$) (Figura 9).

A droga padrão doxorrubicina ($29,77 \pm 1,73$) não alterou a produção de espécies reativas de oxigênio em células HCT-116 (Figura 9).

Figura 9. Efeito do ACS03* e doxorrubicina** na produção de espécies reativas de oxigênio em HCT-116



Fonte: LISBOA, 2020

Legenda: A: Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de um experimento em triplicata analisado por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; ^b $p < 0,05$ comparado a ACS03 (25 μ M); ^c $p < 0,05$ comparado a ACS03 (50 μ M). *ACS03: 2 - ((6-Cloro-2-metoxiacridina-9-il) amino) -5,6,7,8-tetra-hidro-4H-ciclo-hepta [b] -tiofeno-3-carbonitrila . **DOXO: Doxorrubicina

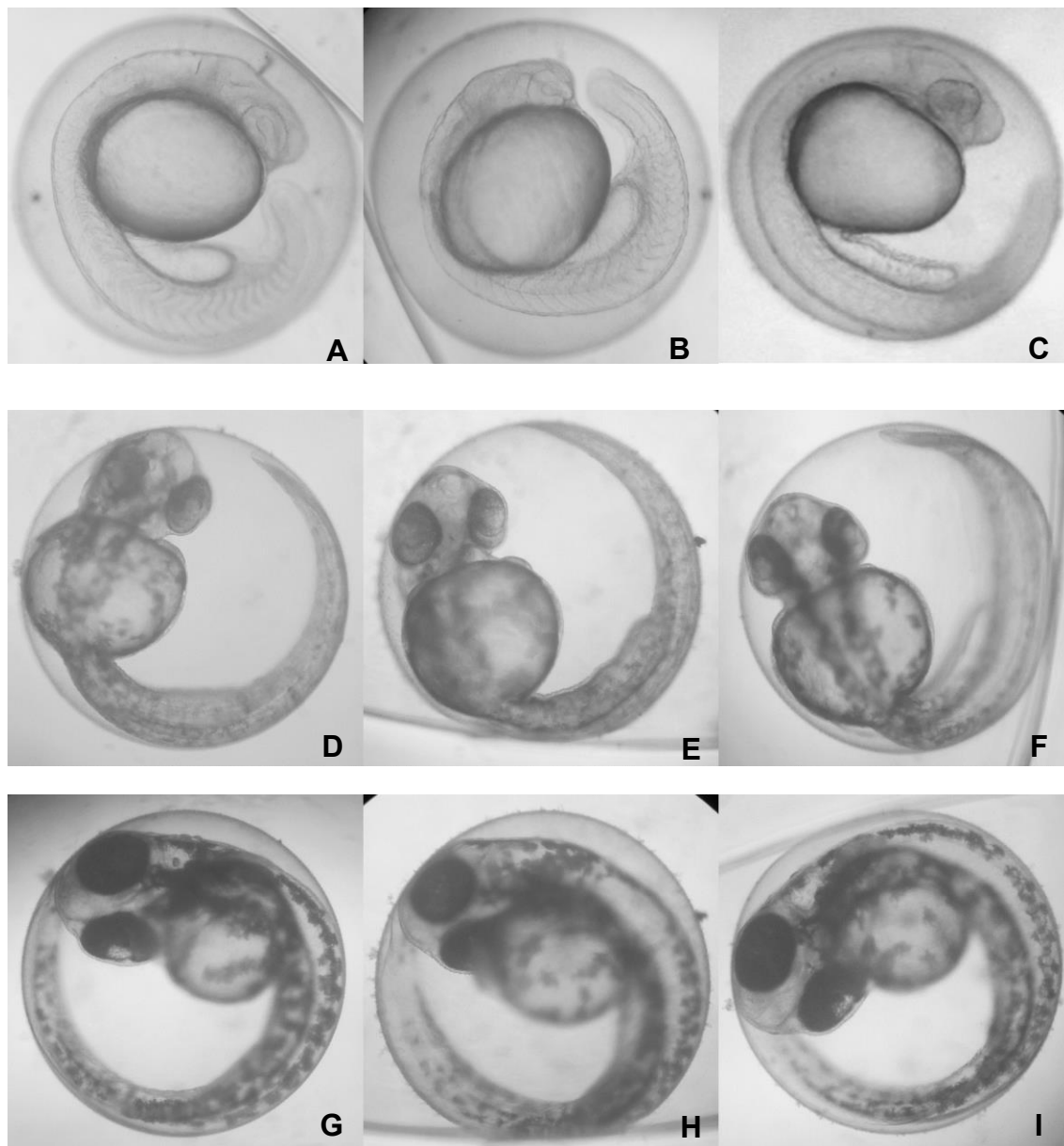
5.2 Ensaios *in vivo*

5.2.1 Avaliação do efeito toxicológico de ACS03 *in vivo*

5.2.1.1 Avaliação da toxicidade aguda em embriões de peixe-zebra

A avaliação toxicológica em embriões de peixe-zebra revelou que o ACS03 não apresentou efeitos letais durante o desenvolvimento embrionário e larval ($CL_{50} > 250 \mu$ M). Na análise morfológica, observou-se que o ACS03 induziu alterações nos embriões de peixe-zebra apenas em concentrações mais altas, como: deformação da coluna vertebral ($CE_{50} = 171,96 \mu$ M), redução no comprimento larval ($CE_{50} = 126,42 \mu$ M) e edema pericárdico ($CE_{50} > 250 \mu$ M; Figura 10).

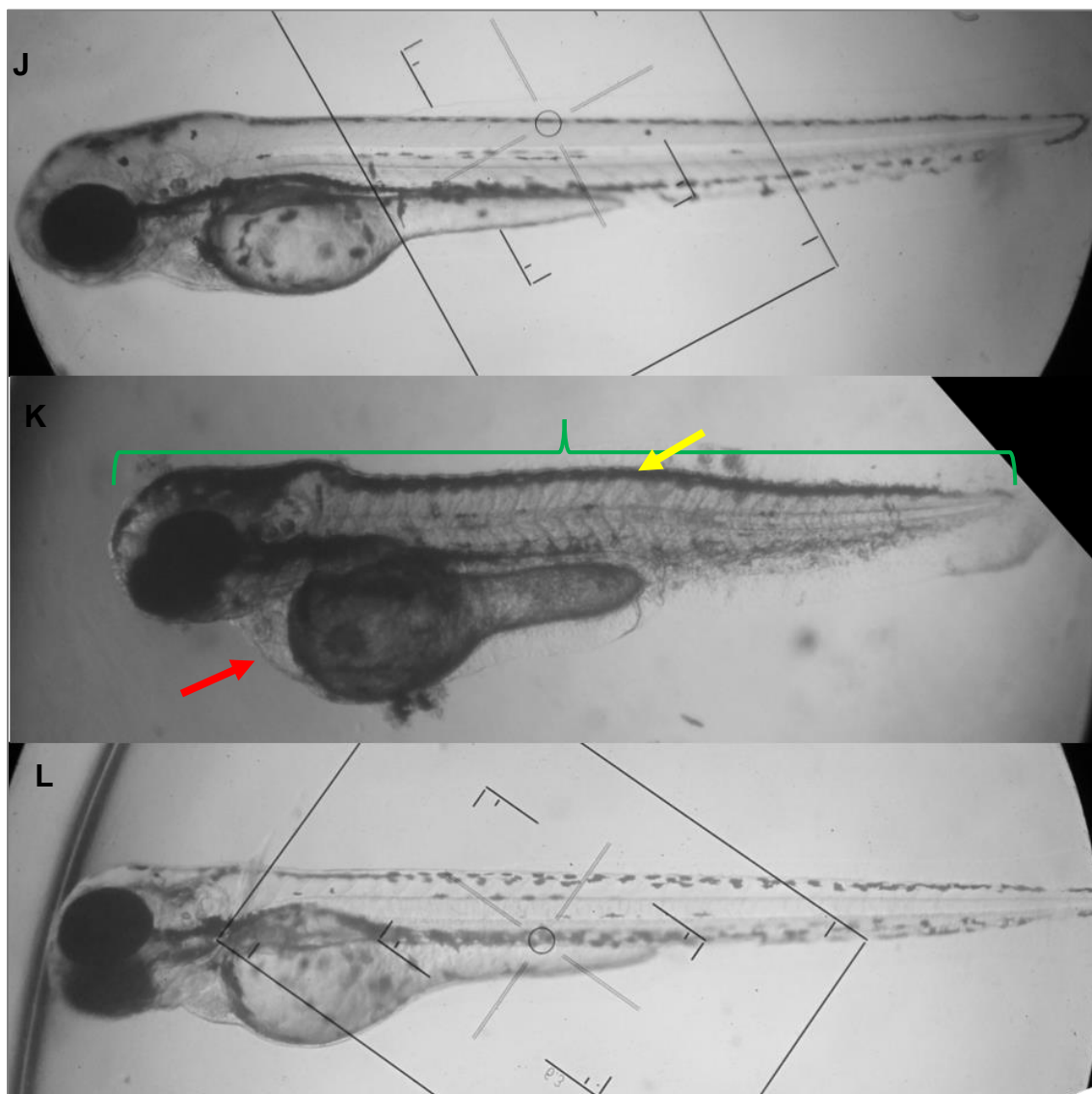
Figura 8. Embriões e larvas de peixe-zebra expostos ao ACS03*, na concentração de 250 μ M, ou aos controles meio E3 e DMSO** a 0,5% durante 96 h



Fonte: LISBOA, 2020

Legenda: Imagens representativas dos embriões e larvas de peixe-zebra após exposição ACS03 ou DMSO 0,5%. Após 24 horas de exposição (A–C): **(A)** meio E3; **(B)** concentração de 250 μ M de ACS03; **(C)** DMSO a 0,5% em meio E3. Após 48 horas de exposição (D–F): **(D)** meio E3; **(E)** concentração de 250 μ M de ACS03; **(F)** DMSO a 0,5% em meio E3. Após 72 horas de exposição (G–I): **(G)** meio E3; **(H)** concentração de 250 μ M de ACS03; **(I)** DMSO a 0,5% em meio E3. Após 96 horas de exposição (J–L): **(J)** meio E3; **(K)** concentração de 250 μ M de ACS03; **(L)** DMSO a 0,5% em meio E3. A seta vermelha indica o edema pericárdico e a seta amarela deformação na coluna vertebral. Aumento de 50x. *ACS03: 2-((6-Cloro-2-metoxiacridina-9-il)amino)-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta[b]-tiofeno-3-carbonitrila. ** DMSO: dimetilsulfóxido

Figura 10. Embriões e larvas de peixe-zebra expostos ao ACS03*, na concentração de 250 μ M, ou aos controles meio E3 e DMSO** a 0,5% durante 96 h. (Continuação)



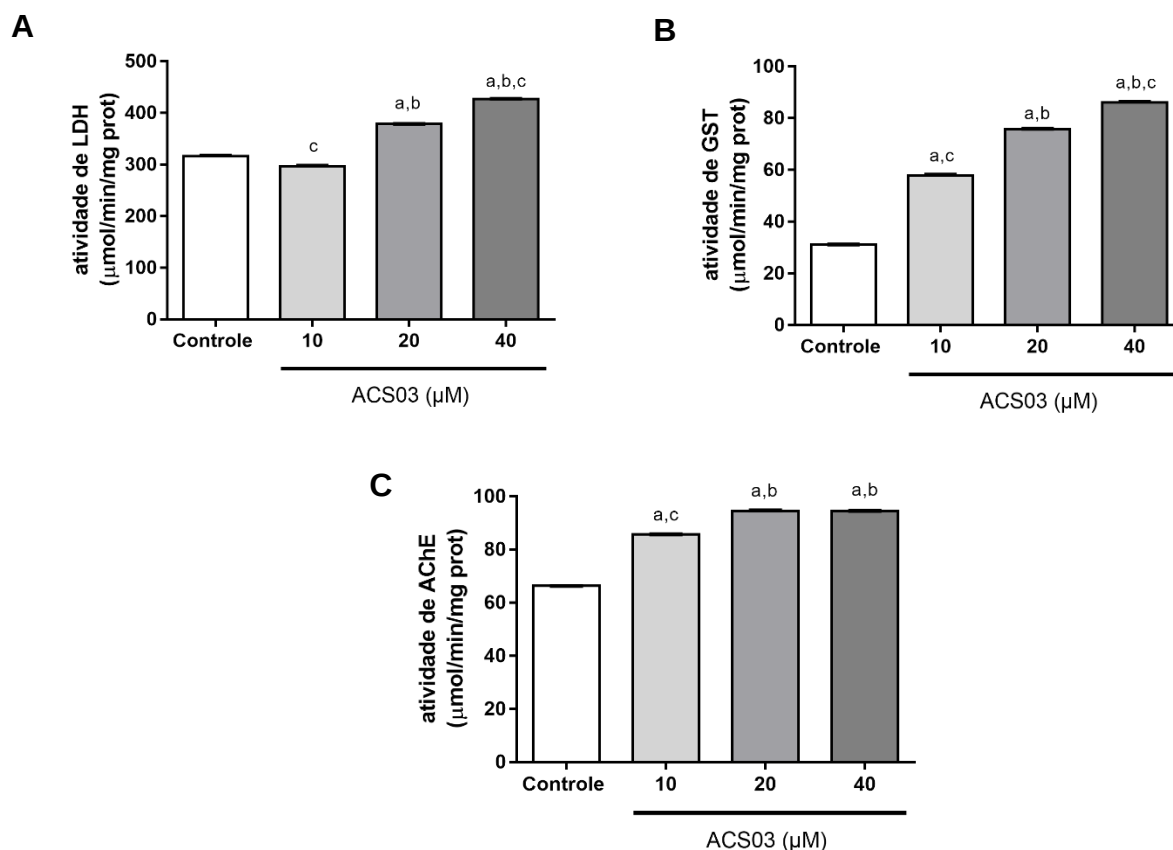
Fonte: LISBOA, 2020

Legenda: Imagens representativas dos embriões e larvas de peixe-zebra após exposição ACS03 ou DMSO 0,5%. Após 24 horas de exposição (A–C): **(A)** meio E3; **(B)** concentração de 250 μ M de ACS03; **(C)** DMSO a 0,5% em meio E3. Após 48 horas de exposição (D–F): **(D)** meio E3; **(E)** concentração de 250 μ M de ACS03; **(F)** DMSO a 0,5% em meio E3. Após 72 horas de exposição (G–I): **(G)** meio E3; **(H)** concentração de 250 μ M de ACS03; **(I)** DMSO a 0,5% em meio E3. Após 96 horas de exposição (J–L): **(J)** meio E3; **(K)** concentração de 250 μ M de ACS03; **(L)** DMSO a 0,5% em meio E3. A seta vermelha indica o edema pericárdico, a seta amarela deformação na coluna vertebral e o colchete verde indica o comprimento larval. Aumento de 50x. *ACS03: 2-((6-Cloro-2-metoxiacridina-9-il)amino)-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta[b]-tiofeno-3-carbonitrila. ** DMSO: dimetilsulfóxido

5.2.1.2 Biomarcadores bioquímicos em embriões de peixe-zebra

Os efeitos do ACS03 na atividade dos biomarcadores LDH, GST e AChE dos embriões são apresentados na Figura 11. ACS03 induziu um aumento significativo na atividade do LDH ($378,44 \pm 0,58$ e $426,74 \pm 0,79$, para 20 e 40 μM , respectivamente; $p < 0,05$), comparando com o grupo controle ($316,6 \pm 1,28$) (Figura 11A). Na avaliação da atividade do GST, observou-se um aumento dependente da dose ($57,96 \pm 0,23$, $75,83 \pm 0,13$ e $86,14 \pm 0,21$ para as doses de 10, 20 e 40 μM de ACS03, respectivamente; $p < 0,05$), comparado ao grupo controle ($31,8 \pm 0,05$) (Figura 11B). Além disso, ACS03 induziu um aumento na atividade da AChE em todas as doses testadas ($85,67 \pm 0,11$; $94,59 \pm 0,20$ e $94,54 \pm 0,10$ nas doses de 10, 20 e 40 μM de ACS03, respectivamente; $p < 0,05$), comparado ao grupo controle ($66,35 \pm 0,04$) (Figura 11C).

Figura 9. Atividades de biomarcadores em larvas de peixe-zebra após 96 h de exposição a diferentes concentrações de ACS03*. (A) atividade de LDH; (B) atividade de GST; (C) atividade de AChE



Fonte: LISBOA, 2020

Legenda: Dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média de um experimento em quadruplicata analisados por ANOVA seguido por Tukey. *ACS03: 2-((6-Cloro-2-metoxiacridina-9-il)amino)-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta[b]-tiofeno-3-carbonitrila ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle, ^b $p < 0,05$ comparado ao ACS03 10 μM . ^c $p < 0,05$ em comparação com ACS03 20 μM

5.2.1.3 Avaliação da toxicidade não clínica aguda

No ensaio de toxicidade não clínica aguda foi observado que ACS03 não provocou mortes na dose de 300 mg/kg (i.p.). Seguindo o guia da OECD 423/2001, repetiu-se o ensaio com a mesma dose e o mesmo número de animais, e, novamente, observou-se que não houve morte (Tabela 4). Em seguida, realizou-se o mesmo ensaio com a dose de 2000 mg/kg (i.p.) e não houve morte de animais. Novamente, seguindo o guia da OECD 423/2001, repetiu-se o ensaio com a mesma dose e o mesmo número de animais, e

observou-se que não houve morte. Então, de acordo com o guia n. 423/2001 da OECD, o valor de DL50 foi estimado sendo maior que 5000 mg/kg e ACS03 foi classificado na categoria 5 da *Globally Harmonized Classification System* (GHS).

Tabela 4. Efeitos da administração de dose única (i.p.) de ACS03* em camundongos

Grupo		Dose	M/T
Experimento 1	Controle	-	0/3
	ACS03*	300 mg/Kg	0/3
Experimento 2	Controle	-	0/3
	ACS03*	300 mg/Kg	0/3
Experimento 1	Controle	-	0/3
	ACS03*	2000 mg/Kg	0/3
Experimento 2	Controle	-	0/3
	ACS03*	2000 mg/Kg	0/3

Fonte: LISBOA, 2020

M/T – Morte/Tratado. *ACS03: 2-((6-Cloro-2-metoxiacridina-9-il)amino)-5,6,7,8-tetrahydro-4H-ciclohepta[b]-tiofeno-3-carbonitrila

5.2.1.4 Avaliação da genotoxicidade

O tratamento com ACS03 (2000 mg/kg) não induziu aumento significativo do número de eritrócitos micronucleados em sangue periférico ($5,00 \pm 0,60$) quando comparado ao grupo controle ($6,00 \pm 0,60$). Como esperado, a ciclofosfamida induziu aumento no número de eritrócitos micronucleados ($18,40 \pm 0,50$; $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle (Tabela 5).

Tabela 5. Número de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos tratados com ACS03* e ciclofosfamida

Grupos	Dose mg/kg	Número de eritrócitos micronucleados
Controle	-	6,00 ± 0,60
ACS03	2000	5,00 ± 0,60 ^b
Ciclofosfamida	50	18,40 ± 0,50 ^a

Fonte: LISBOA, 2020

Legenda: Dados apresentados como média ± erro padrão da média de oito animais analisados por ANOVA seguido de Tukey. ^ap<0,05 comparado ao grupo controle; ^bp < 0,05 comparado ao grupo ciclofosfamida.

*ACS03: 2-((6-Cloro-2-metoxiacridina-9-il)amino)-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta[b]-tiofeno-3-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

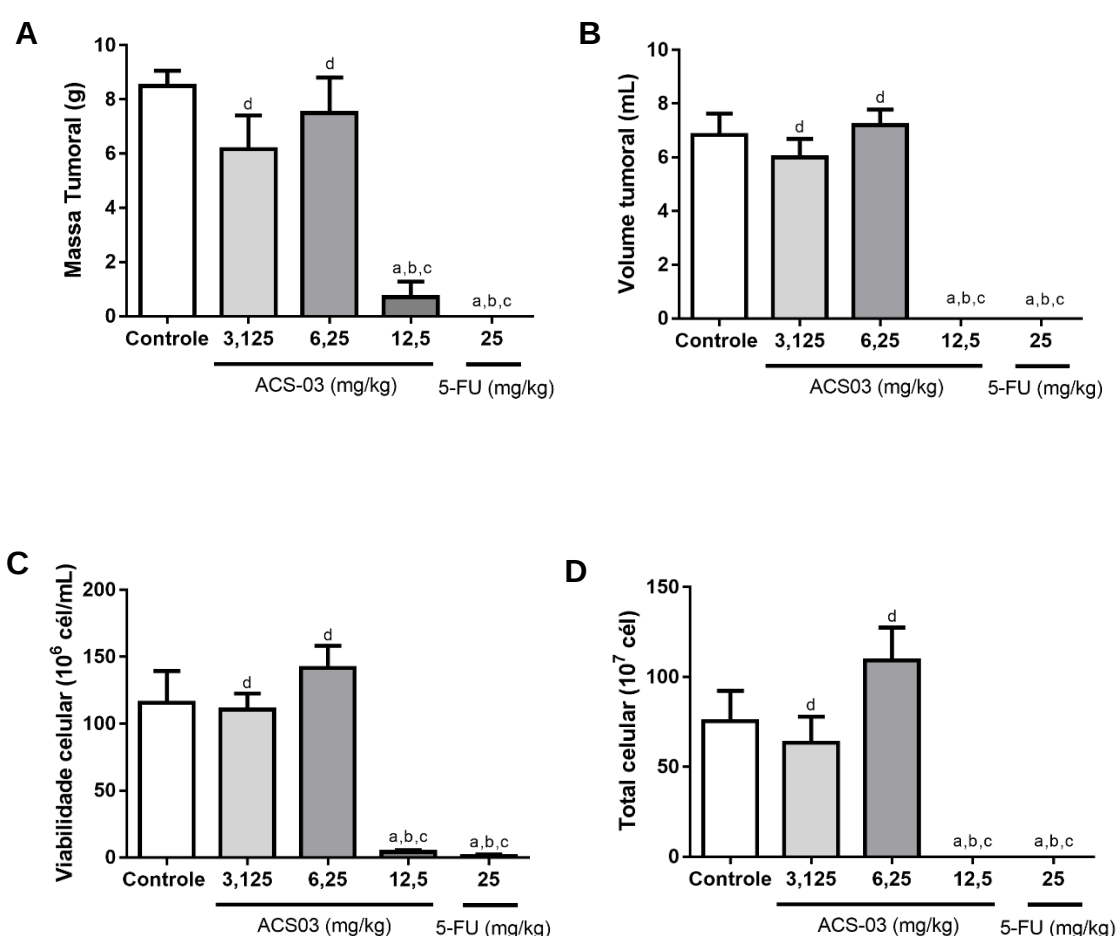
Após o tratamento intraperitoneal dos animais com ACS03 em diferentes doses, pode-se observar que na dose de 12,5 mg/kg houve uma redução significativa em todos os parâmetros avaliados (volume e massa tumoral, viabilidade e total celular), enquanto que nas doses de 3,125 mg/kg e 6,25 mg/kg não foram observadas diferenças significativas em relação ao controle (Figura 12).

Na avaliação da massa tumoral de animais tratados com ACS03 (12,5 mg/kg), observou-se redução significativa para $0,71 \pm 0,56$ g ($p < 0,05$), em comparação ao controle ($8,50 \pm 0,56$ g) (Figura 12A). Os animais do grupo controle apresentaram o volume tumoral de $6,83 \pm 0,79$ mL, e o tratamento com ACS03 foi capaz de reduzir completamente o volume tumoral (0 ± 0 mL; $p < 0,05$) (Figura 12B). O terceiro parâmetro avaliado, a viabilidade celular, também mostrou diminuição significativa na dose de 12,5 mg/kg ($4,12 \pm 1,28 \times 10^6$ cél/mL; $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle ($115,5 \pm 23,97 \times 10^6$ cél/mL) (Figura 12C). Ainda, considerando o parâmetro total celular, foi também

observado redução significativa após tratamento com ACS03 ($0 \pm 0 \times 10^7$ células; $p < 0,05$), em comparação ao controle ($75,45 \pm 16,83 \times 10^7$ células) (Figura 12D).

A droga padrão 5-FU 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; $p < 0,05$), em relação ao grupo controle (Figura 12).

Figura 10. Efeitos do tratamento de sete dias (i.p.) com ACS03* (3,125; 6,25 ou 12,5 mg/kg) e 5-FU** em camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich



Fonte: LISBOA, 2020

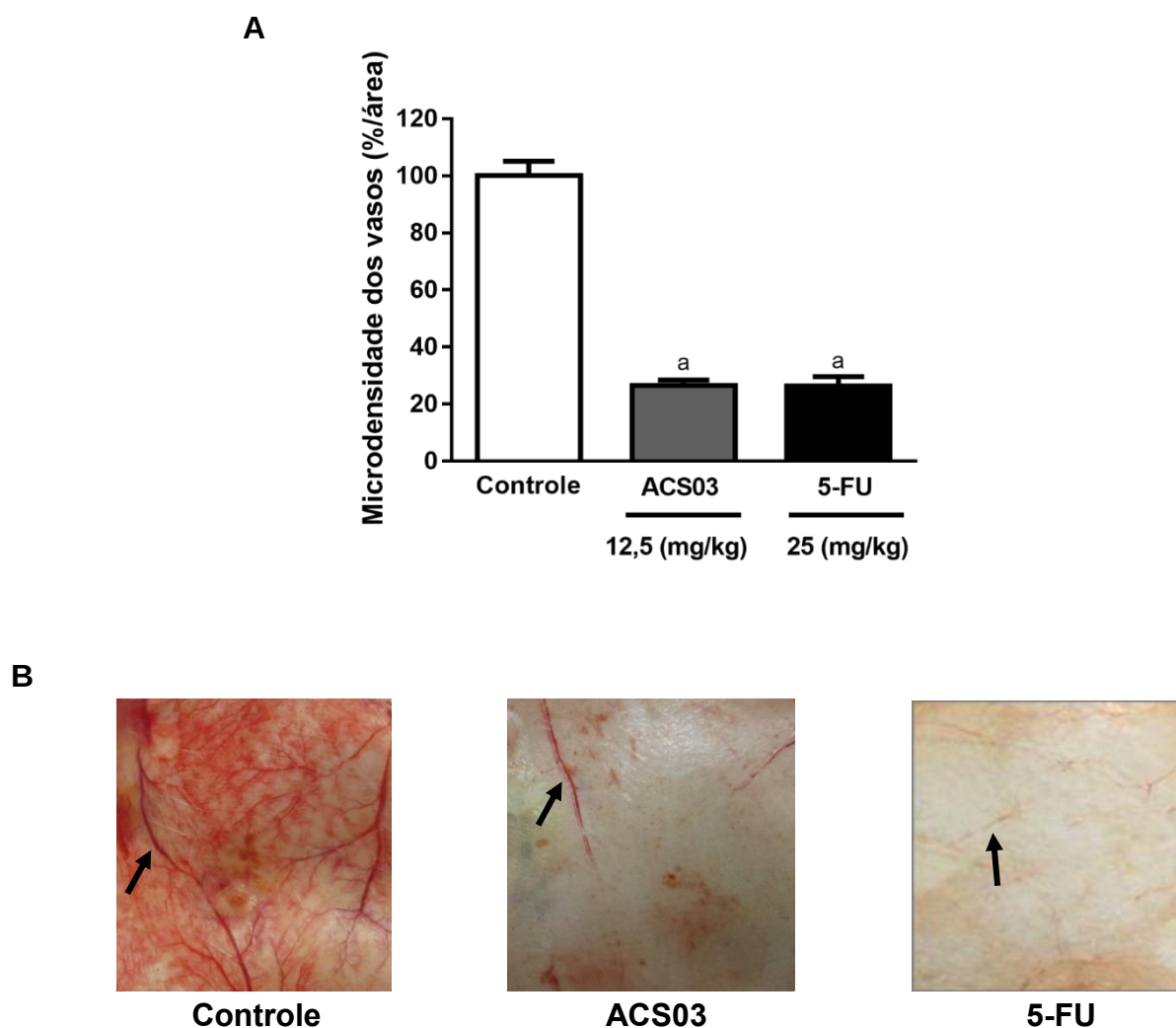
Legenda: A: massa tumoral; B: volume tumoral; C: viabilidade celular; D: total celular. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de oito animais analisados por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo ACS03 (3,125 μ M). ^c $p < 0,05$ comparado ao grupo ACS03 (6,25 μ M); *ACS03: 2-((6-Cloro-2-metoxiacridina-9-il)amino)-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta[b]-tiofeno-3-carbonitrila; ** 5-fu: 5-fluorolacila; ***Controle: animais transplantados com Carcinoma Ascítico de Ehrlich

5.2.3 Investigação do mecanismo de ação antitumoral *in vivo*

5.2.3.1 Avaliação do efeito antiangiogênico

A avaliação da angiogênese em animais com tumor ascítico de Ehrlich revelou que o tratamento com ACS03 (12,5 mg/kg) promoveu redução significativa da microdensidade dos vasos peritumorais ($26,54 \pm 1,88\%$; $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle ($100,0\% \pm 5,08\%$), assim como foi observado no grupo tratado com a droga padrão 5-FU ($26,30 \pm 3,38\%$; $p < 0,05$) (Figura 13).

Figura 11. Efeito do tratamento com ACS03* (12,5 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) na microdensidade dos vasos peritoneais de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich



Fonte: LISBOA, 2020

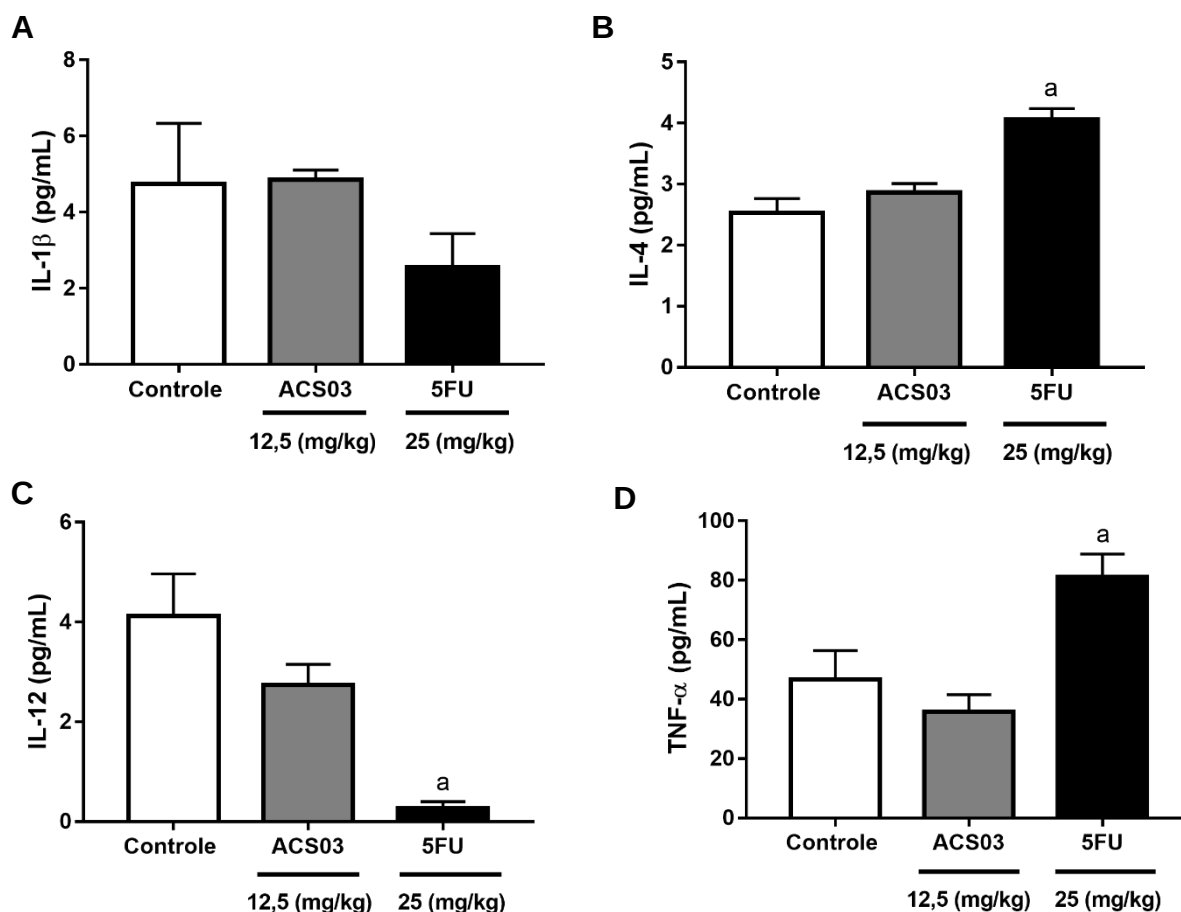
Legenda: A: densidade de microvasos (%) foi determinada selecionando a área do vaso sanguíneo por campo em áreas vascularizadas selecionadas, divididas por toda a área. Figuras foram cortadas em tamanho padrão (1 cm x 1 cm). B: Imagens representativas da inibição da angiogênese peritoneal pelo tratamento com ACS03, tal como observado pela redução da neovascularização. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de oito animais por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle tumoral. Setas pretas indicam os vasos. *ACS03: 2-((6-Cloro-2-metoxiacridina-9-il)amino)-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta[b]-tiofeno-3-carbonitrila; ** 5-fu: 5-fluorolacila; ***Controle: animais transplantados com Carcinoma Ascítico de Ehrlich

5.2.3.2 Quantificação das citocinas IL-1 β , IL-4, IL-12 e TNF- α

Após o tratamento com ACS03 não foram observadas diferenças significativas nos níveis de IL-1 β , IL-4, IL-12 e TNF- α (Figura 14).

Nos animais tratados com 5-FU foi observado aumento significativo nos níveis de IL-4 ($4,06 \pm 0,08$ pg/mL; $p < 0,05$) quando comparado ao controle ($2,53 \pm 0,23$ pg/mL) (Figura 14B). O mesmo foi observado na avaliação de TNF- α ($82,15 \pm 3,85$ pg/mL; $p < 0,05$), em comparação ao controle ($46,59 \pm 9,82$ pg/mL) (Figura 14D). O 5-FU não promoveu alterações significativas nos níveis de IL-1 β e IL-12 (Figura 14 A e C).

Figura 12. Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com ACS03 (12,5 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) na concentração de citocinas no lavado peritoneal de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich



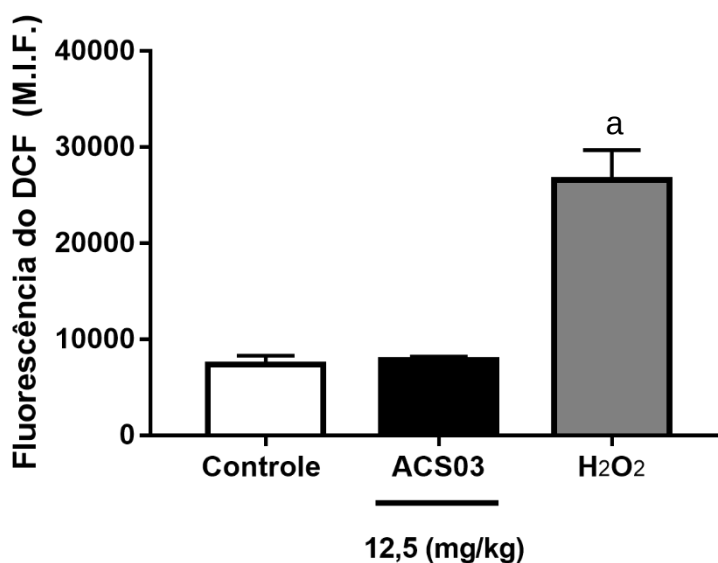
Fonte: LISBOA, 2020

Legenda: A: IL-1 β , B: IL-4, C: IL-12, D: TNF- α . Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de cinco animais por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle tumoral. *ACS03: 2-((6-Cloro-2-metoxiacridina-9-il)amino)-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta[b]-tiofeno-3-carbonitrila; ** 5-fu: 5-fluorolacila; ***Controle: animais transplantados com Carcinoma Ascítico de Ehrlich

5.2.3.3 Investigação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

O ACS03 não alterou os níveis de ROS em modelo de tumor ascítico de Ehrlich após o tratamento por sete dias (Figura 15).

Figura 13. Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com ACS03* (12,5 mg/kg) na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em modelo de tumor ascítico de Ehrlich



Fonte: LISBOA, 2020

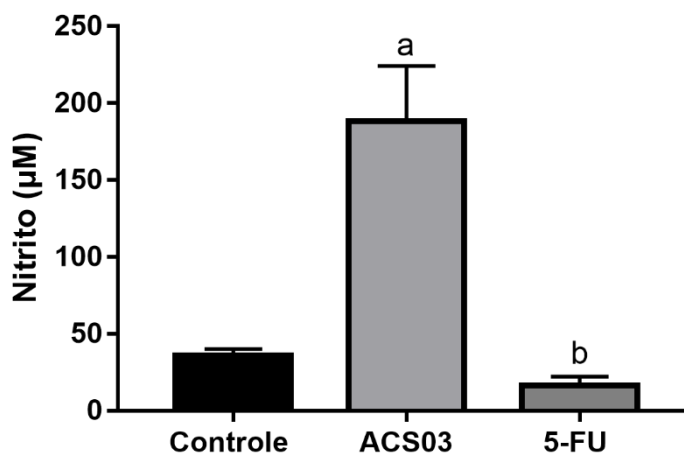
Legenda: Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de cinco animais analisados por Teste T. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle tumoral. *ACS03: 2-((6-Cloro-2-metoxiacridina-9-il)amino)-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta[b]-tiofeno-3-carbonitrila;

***Controle: animais transplantados com Carcinoma Ascítico de Ehrlich

5.2.3.4 Investigação da produção de Nitrito

ACS03 (12,5 mg/kg) induziu um aumento significativo na concentração de nitrito ($188,5 \pm 7,98 \mu\text{M}$; $p < 0,05$) em comparação com o grupo controle ($36,09 \pm 0,72 \mu\text{M}$) (Figura 12). O 5-FU (25 mg/kg) não induziu alteração significativa na concentração de nitrito ($16,3 \pm 2,91 \mu\text{M}$) (Figura 16).

Figura 14. Efeito de ACS03* (12,5 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) na quantificação de nitrito no fluido peritoneal de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich



Fonte: LISBOA, 2020

Legenda: Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão de cinco animais analisados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. ^ap <0,05 comparado ao grupo controle tumoral; ^bp <0,05 comparado ao ACS03

*ACS03: 2-((6-Cloro-2-metoxiacridina-9-il)amino)-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta[b]-tiofeno-3-carbonitrila

** 5-fu: 5-fluorolacila

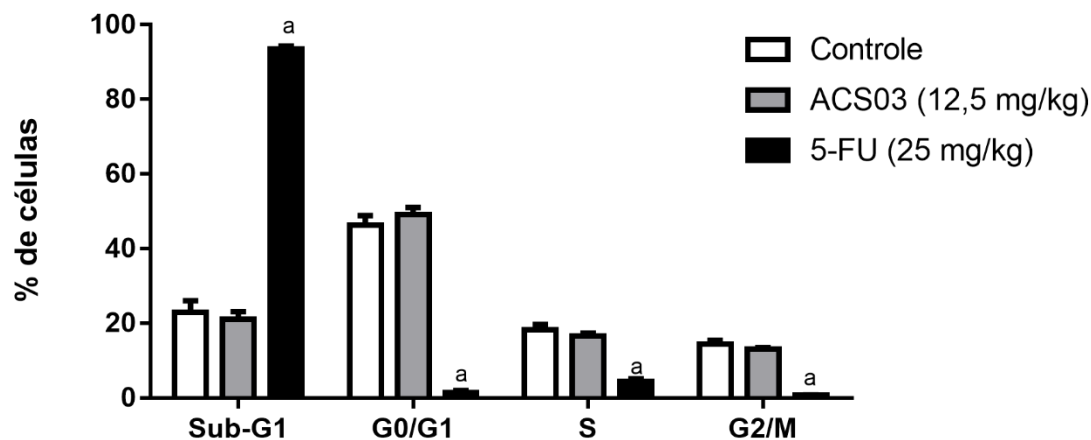
***Controle: animais transplantados com Carcinoma Ascítico de Ehrlich

5.2.3.5 Análise do ciclo celular

Ao analisar células de carcinoma ascítico de Ehrlich de animais submetidos ao tratamento com ACS03 (12,5 µM) por sete dias foi observado que não houve alteração na porcentagem de células em cada fase do ciclo quando comparado ao grupo controle (Figura 17).

A droga padrão 5-FU (25 mg/kg) induziu um aumento significativo no percentual de células em sub-G1 ($93,43 \pm 0,84$ %; $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle ($22,98 \pm 3,08$ %), o que foi acompanhado de uma diminuição de células em G0/G1 de $43,32 \pm 2,34$ % no controle para $1,36 \pm 0,57$ % no ACS03 ($p < 0,05$), em S de $18,26 \pm 1,48$ % no controle para $4,40 \pm 0,69$ % no grupo tratado com ACS03 ($p < 0,05$) e em G2/M de $14,40 \pm 1,06$ % no controle para $0,68 \pm 0,07$ % em ACS03 ($p < 0,05$) (Figura 17).

Figura 15. Efeito do tratamento de sete dias com ACS03* (12,5 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) na distribuição de células de carcinoma ascítico de Ehrlich nas diferentes fases do ciclo celular



Fonte: LISBOA, 2020

Legenda: Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de cinco animais analisados por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle tumoral

*ACS03: 2-((6-Cloro-2-metoxiacridina-9-il)amino)-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta[b]-tiofeno-3-carbonitrila

** 5-fu: 5-fluorolacila

***Controle: animais transplantados com Carcinoma Ascítico de Ehrlich

5.2.4 Avaliação da toxicidade em animais transplantados com células de carcinoma ascítico de Ehrlich após o tratamento com ACS03

5.2.4.1 Avaliação ponderal e do consumo de água e ração

O consumo de água dos animais tratados com ACS03 ($25,00 \pm 2,58$ mL; $p < 0,05$) e com 5-FU ($29,00 \pm 2,96$ mL; $p < 0,05$) foi menor em relação ao controle ($50,83 \pm 8,7$ mL). O mesmo foi observado para o consumo de ração nos animais submetidos ao tratamento com ACS03 ($18,5 \pm 1,17$ mL; $p < 0,05$) e 5-FU ($21,80 \pm 1,51$ mL; $p < 0,05$). Na avaliação do peso final dos animais foi observada uma redução do peso de animais tratados com ACS03 ($28,01 \pm 1,06$ g; $p < 0,05$) e 5-FU ($28,67 \pm 0,33$ g; $p < 0,05$), quando comparados ao grupo controle ($35,63 \pm 0,80$ g) (Tabela 6).

Tabela 6. Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com ACS03 (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

Grupos	Consumo de água (mL)	Consumo de ração (g)	Peso inicial (g)	Peso final (g)
Controle***	50,83 ± 8,7	35,6 ± 6,00	32,63 ± 0,82	35,63 ± 0,80
ACS03	25,00 ± 2,58 ^a	18,5 ± 1,17 ^a	31,5 ± 0,56	28,01 ± 1,06 ^a
5-FU	29,00 ± 2,96 ^a	21,80 ± 1,51 ^a	30,67 ± 1,00	28,67 ± 0,33 ^a

Fonte: LISBOA, 2020

Legenda: Dados apresentados como média ± erro padrão da média de oito animais, analisados por ANOVA seguido por Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle tumoral.

*ACS03: 2-((6-Cloro-2-metoxiacridina-9-il)amino)-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta[b]-tiofeno-3-carbonitrila

** 5-fu: 5-fluorolacila

***Controle: animais transplantados com Carcinoma Ascítico de Ehrlich

5.2.4.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos

Após investigação dos efeitos toxicológicos de ACS03 e 5-FU em relação aos parâmetros bioquímicos, não foram observadas diferenças nos parâmetros AST, ALT, ureia e creatinina (Tabela 7).

Tabela 7. Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com ACS03 (12,5 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) 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***	-	106,80 ± 5,75	113,60 ± 7,97	41,60 ± 4,11	0,92 ± 0,05
Controle****	-	140,0 ± 18,24	128,50 ± 17,81	40,8 ± 4,95	0,86 ± 0,06
ACS03	12,5	163,0 ± 25,30	149,60 ± 21,56	48,57 ± 2,15	0,94 ± 0,03
5-FU	25	162,60 ± 2,27	176,6 ± 3,33	39,75 ± 2,45	0,82 ± 0,07

Fonte: LISBOA, 2020

Legenda: Dados apresentados como média ± erro padrão da média de oito animais, analisados por ANOVA seguido por Tukey.

*ACS03: 2-((6-Cloro-2-metoxiacridina-9-il)amino)-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta[b]-tiofeno-3-carbonitrila

** 5-fu: 5-fluorolacila

***Grupo sadio: animais saudáveis (não transplantados com tumor de Ehrlich e submetidos as mesmas condições experimentais).

****Controle: animais transplantados com Carcinoma Ascítico de Ehrlich

Como mostrado na tabela 8, não foram identificadas alterações significativas em nenhum dos parâmetros do eritrograma e leucograma nos animais tratados com ACS03, quando comparados ao grupo controle.

O tratamento com o 5-FU causou aumento significativo no VCM ($63,68 \pm 2,52 \text{ fm}^3$; $p < 0,05$) em relação ao grupo controle ($49,55 \pm 0,94 \text{ fm}^3$). O mesmo foi observado no HCM ($21,98 \pm 0,40 \text{ pg}$; $p < 0,05$) em relação ao controle ($18,87 \pm 0,53 \text{ pg}$). No leucograma, reduções significativas da contagem de leucócitos totais e dos percentuais de linfócitos, neutrófilos e monócitos ($3,48 \pm 0,27 \text{ } 10^3/\text{mm}^3$; $88,00 \pm 1,10\%$; $9,40 \pm 0,87\%$ e $1,25 \pm 0,25\%$, respectivamente) foram observadas no grupo tratado com a droga padrão, quando comparado ao grupo controle ($8,96 \pm 1,29 \text{ } 10^3/\text{mm}^3$; $75,83 \pm 3,07\%$; $9,40 \pm 0,87\%$ e $1,25 \pm 0,25\%$, respectivamente).

Tabela 8. Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com ACS03* (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****	ACS03 (12,5 mg/kg)	5-FU (25 mg/kg)
Eritrócitos (10 ⁶ /mm ³)	6,57 ± 0,21	7,03 ± 0,29	7,52 ± 0,34	5,78 ± 0,65
Hemoglobina (g/dL)	12,96 ± 0,39	13,18 ± 0,40	13,97 ± 0,45	12,64 ± 1,30
Hematócrito (%)	35,81 ± 1,24	34,67 ± 1,14	38,14 ± 0,85	36,60 ± 4,00
VCM (fm ³)	54,26 ± 1,24	49,55 ± 0,94	50,93 ± 1,71	63,68 ± 2,52 ^a
HCM (pg)	19,65 ± 0,33	18,87 ± 0,53	18,74 ± 0,74	21,98 ± 0,40 ^a
CHCM (g/dL)	21,33 ± 0,75 ^a	38,07 ± 0,40	36,81 ± 0,56	37,12 ± 2,61
Leucócitos totais (10 ³ /mm ³)	10,2 ± 0,48	8,96 ± 1,29	12,97 ± 1,68	3,48 ± 0,27 ^a
Linfócitos (%)	81,38 ± 3,43	75,83 ± 3,07	75,86 ± 1,90	88,00 ± 1,10 ^a
Neutrófilos (%)	2,00 ± 0,29 ^a	12,17 ± 2,18	14,43 ± 1,17	9,40 ± 0,87 ^a
Monócitos (%)	6,25 ± 0,99	9,66 ± 1,40	7,57 ± 0,89	1,25 ± 0,25 ^a
Eosinófilos (%)	2,00 ± 0,21	2,80 ± 0,58	2,60 ± 0,50	2,00 ± 0,31

Fonte: LISBOA, 2020

Legenda: Dados apresentados como média ± erro padrão da média de oito animais, analisados por ANOVA seguido por Tukey. ^ap < 0,05 comparado ao grupo controle tumoral.

*ACS03: 2-((6-Cloro-2-metoxiacridina-9-il)amino)-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta[b]-tiofeno-3-carbonitrila

** 5-fu: 5-fluorolacila

***Grupo sadio: animais saudáveis (não transplantados com tumor de Ehrlich e submetidos as mesmas condições experimentais).

****Controle: animais transplantados com Carcinoma Ascítico de Ehrlich e submetidos as mesmas condições experimentais

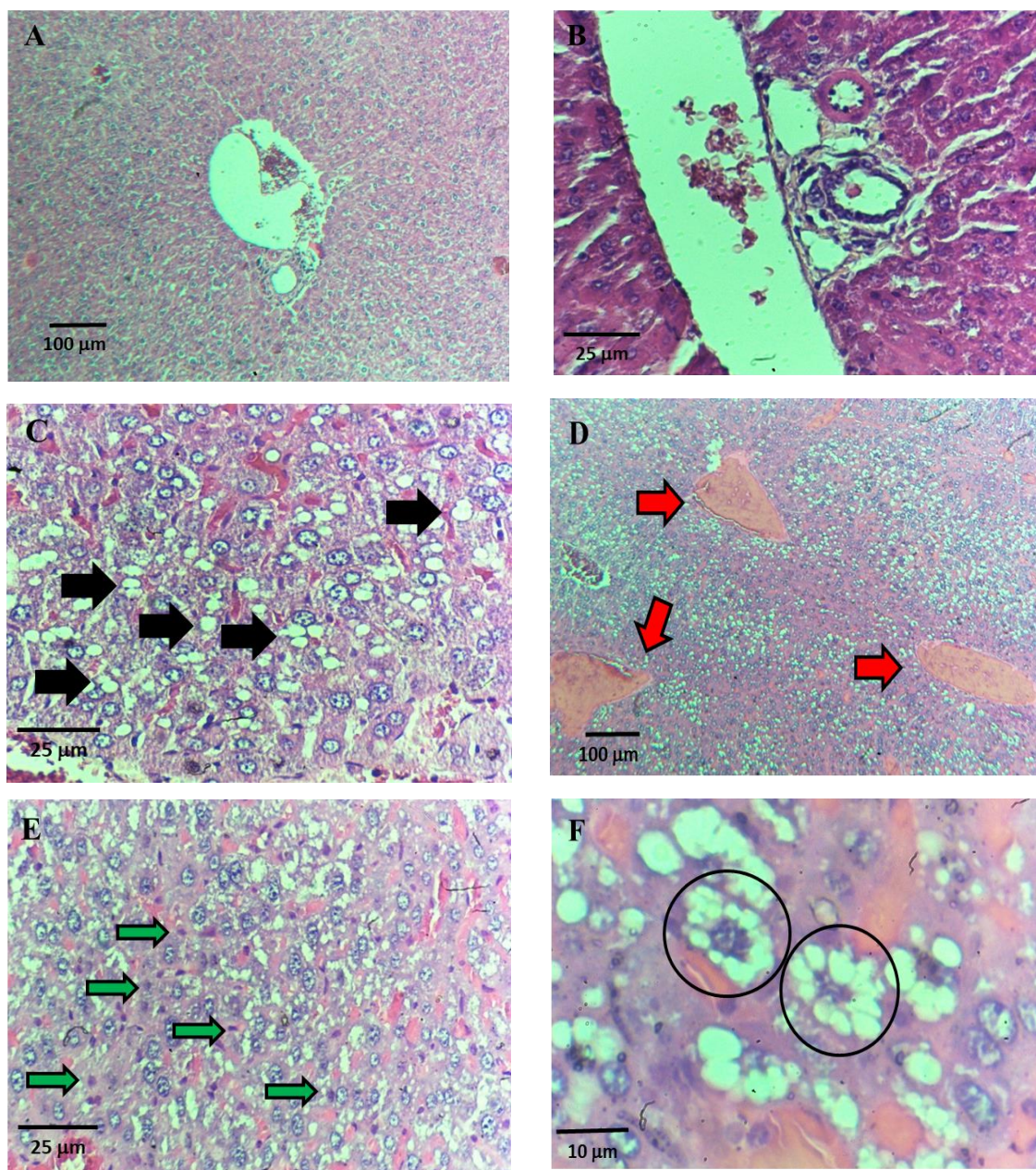
5.2.4.3 Análises histológicas

Para uma avaliação mais detalhada de possíveis efeitos tóxicos induzidos pelo ACS03 em nível tecidual (fígado e rins), análises histopatológicas foram realizadas.

Ao exame de microscopia de luz, os fígados dos animais do grupo sadio 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 18 A e B). Em contrapartida, quando foram avaliados os animais do grupo controle transplantado, observaram-se visíveis lesões reversíveis, do tipo esteatose micro e macrogoticular caracterizadas pelos inúmeros vacúolos esbranquiçados no citoplasma do hepatócito (Figura 18 C e F), uma quantidade moderada de vasos congestos (Figura 18 D), e aumento do número das células de kupffer, (Figura 18 E), no entanto, os espaços portais estavam regularmente distribuídos com a presença da tríade vículo-biliar habitual, cordões hepáticos inalterados e não foram encontrados necrose de hepatócitos, atipias celulares e infiltrado inflamatório.

Os animais do grupo tratado com 5-FU apresentaram arquitetura lobular preservada, com células de kupffer e sinusoides hepáticos morfológicamente preservados, (Figura 18 G), mas pode-se observar discreto infiltrado linfoplasmocitário e alguns hepatócitos necrosados com núcleo picnótico em algumas áreas no tecido (Figura 18 H). Quando avaliados os fígados dos animais tratados com ACS03 pode-se observar a presença moderada de infiltrado linfoplasmocitário (Figura 18 J, L) e alguns hepatócitos necrosados (Figura 18 K) isolados no tecido, no entanto, assim como no grupo 5-FU, os animais tratados com o ACS03 não apresentaram esteatose hepática tampouco células atípicas. As demais características morfológicas em relação a tríade portal, cordões de hepatócitos, células de kupffer e arquitetura hepática mantiveram-se inalteradas e bem preservadas, semelhante ao controle (Fig. 18 I).

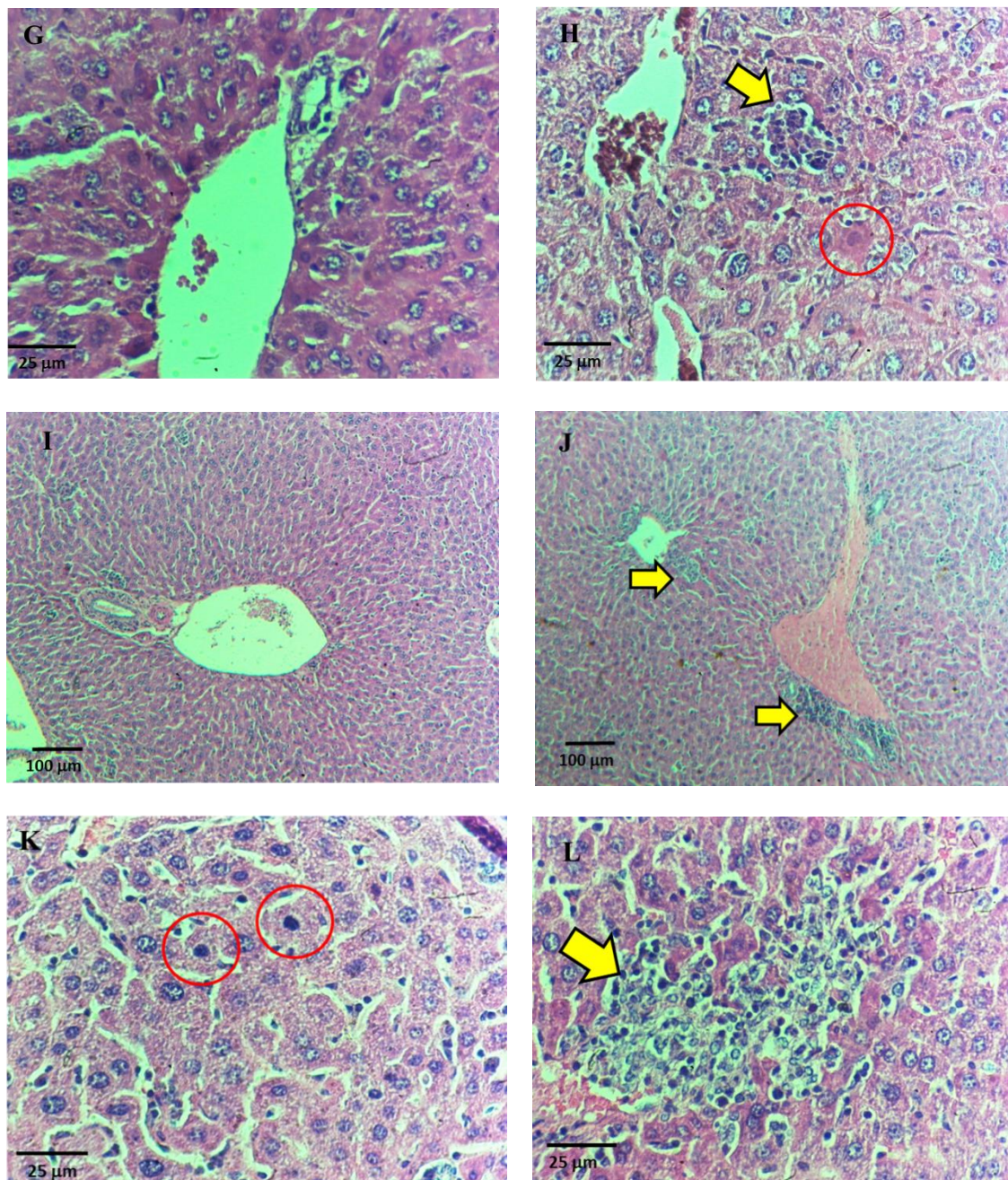
Figura 16. Histopatologia do fígado de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich após tratamento de sete dias (i.p.) com ACS03 (12,5 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg)



Fonte: MEDEIROS, 2020

Legenda: Grupo controle saudável (Figura A e B). Arquitetura dos cordões hepáticos (Figura A e B). Grupo controle transplantado (Figura C, D, E e F). Esteatose hepática (seta preto HE 400X) (C), congestão vascular (seta vermelha HE 100X) (D), célula de kupffer (seta verde -HE 100X) (E), esteatose hepática microgoticular (círculo preta -HE 1000X) (F), Grupo 5-FU (Figura G e H). Tríade portal (HE 400x) (G), infiltrado inflamatório (seta amarela) e célula necrótica (círculo vermelho) (HE 400X) (H). Grupo tratados com ACS03 (Figura I, J, K, L). Arquitetura dos cordões hepáticos e tríade portal (HE 100x) (I), infiltrado linfoplasmocitário (seta amarela - HE 100X-J e HE 400X -L); célula necrótica (círculo vermelho - HE 400X)(K).

Figura 18. Histopatologia do fígado de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich após tratamento de sete dias (i.p.) com ACS03 (12,5 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) (Continuação).



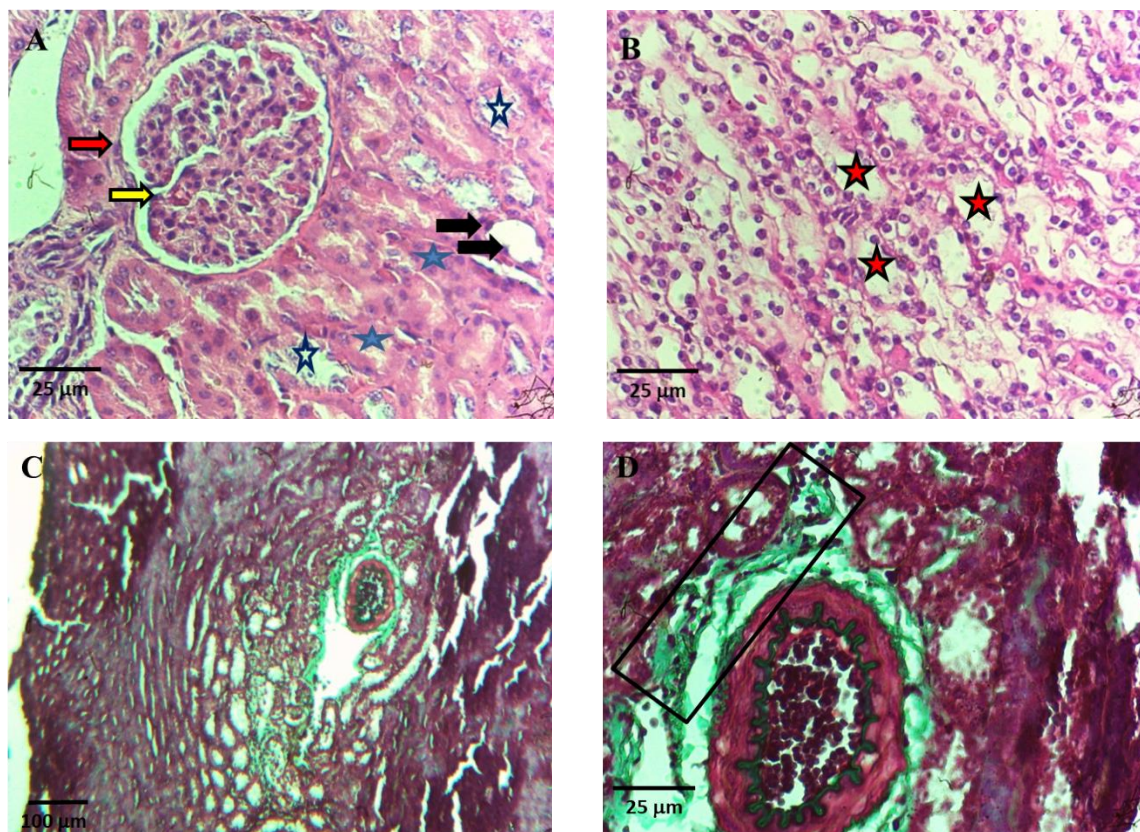
Fonte: MEDEIROS, 2020

Legenda: Grupo controle saudável (Figura A e B). Arquitetura dos cordões hepáticos (Figura A e B). Grupo controle transplantado (Figura C, D, E e F). Esteatose hepática (seta preto HE 400X) (C), congestão vascular (seta vermelha HE 100X) (D), célula de kupffer (seta verde -HE 100X) (E), esteatose hepática microgoticular (círculo preto -HE 1000X) (F), Grupo 5-FU (Figura G e H). Triade portal (HE 400x) (G), infiltrado inflamatório (seta amarela) e célula necrótica (círculo vermelho) (HE 400X) (H). Grupo tratados com ACS03 (Figura I, J, K, L). Arquitetura dos cordões hepáticos e triade portal (HE 100x) (I), infiltrado linfoplasmocitário (seta amarela - HE 100X-J e HE 400X -L); célula necrótica (círculo vermelho - HE 400X) (K).

Os rins removidos dos grupos controle 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 túbulos contorcidos proximais numerosos e 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 pavimento característico de sua morfologia (Figura 19 A). 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 19 B). O sistema vascular do parênquima renal apresentava diferentes tipos de vasos sanguíneos e o tecido conjuntivo presente entre as estruturas vasculares encontrava-se bem distribuído entre os vasos (Figura 19 C e D).

Os demais grupos experimentais não apresentaram diferenças morfológicas entre si 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 grupos tratados com 5-FU ou com ACS03 apresentaram aumento da deposição de tecido conjuntivo ao redor dos vasos sanguíneos (Figura 18 G, K e O). Adicionalmente, os animais do grupo tratado com ACS03 apresentaram quantidade moderada de infiltrado inflamatório no parênquima renal (Figura 19 P), e os animais do grupo controle transplantado apresentaram um aumento do número e do tamanho do lúmen da alça fina de henle (Figura 19 F).

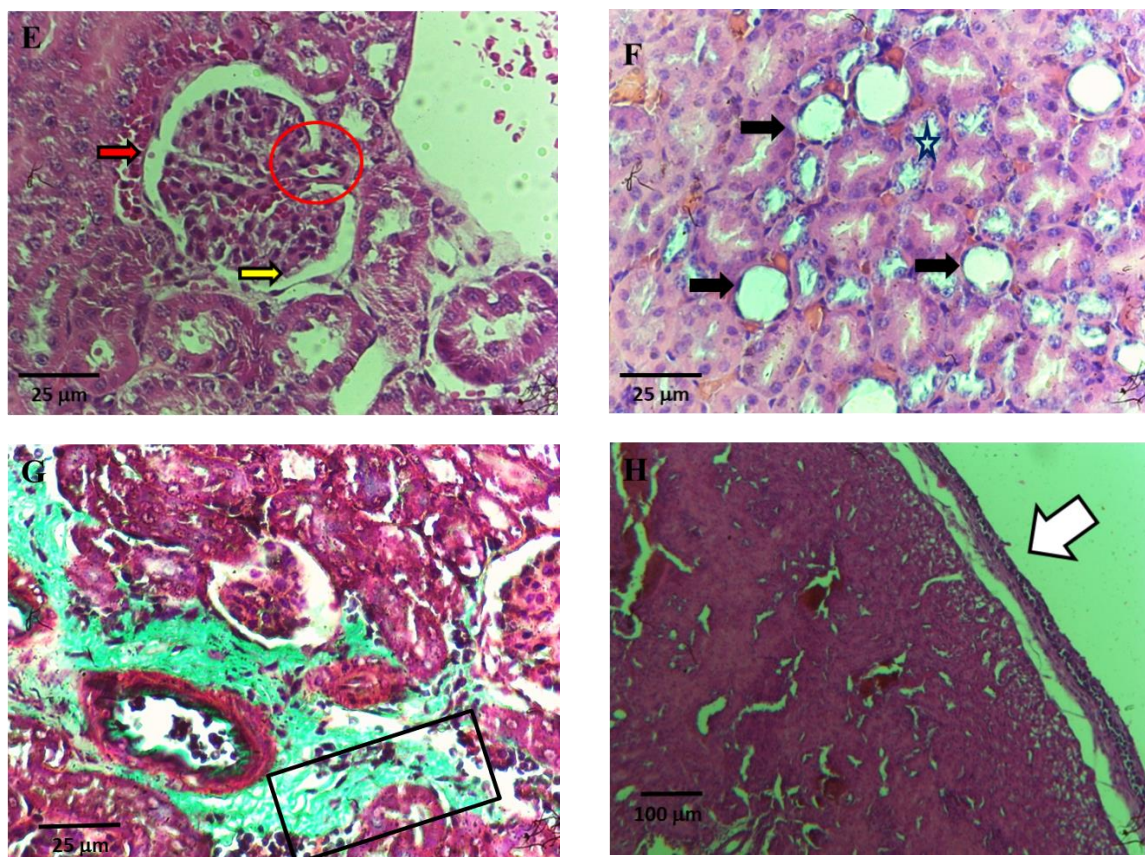
Figura 17. Histopatologia dos rins de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich após tratamento de sete dias (i.p.) com ACS03 (12,5 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg)



Fonte: MEDEIROS, 2020

Legenda: Controle (Figura A, B, C e D) 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 (asterisco azul) e distais (asterisco branco) e alça fina de henle (seta preta) (HE- 400x- Figura A); corte longitudinal da medula renal com túbulos coletores preservados e luz visível (asterisco vermelho) (HE- 400x-Figura B); tecido conjuntivo perivascular (retângulo preto) (TM-100x- Figura C e TM-400x-Figura D). Controle transplantado (Figura E, F, G e H). Glomérulo preservado com visível arteríola (círculo vermelho) (HE- 400x Figura E), túbulo distal (asterisco branco) e alça de henle (seta preta) (HE- 400x Figura F); cápsula renal preservada (seta branca) (HE- 100x- Figura H). Tratado com 5-FU (Figura I, J, K e L). Glomérulos e túbulos preservados na região cortical (HE- 400x Figura I) e medular (HE- 400x Figura J), tecido conjuntivo perivascular (retângulo preto) (TM-400x- Figura K); cápsula renal preservada (seta branca) (HE- 100x- Figura L). Tratado com ACS03 (Figura M, N, O e P). Glomérulos e túbulos preservados na região cortical (HE- 400x Figura M); corte transversal da medula renal com túbulos coletores preservados e luz visível (asterisco vermelho) (HE- 400x-Figura N); tecido conjuntivo perivascular (retângulo preto) (TM-400x- Figura 2O); infiltrado inflamatório perivascular (seta verde HE- 400x Figura P).

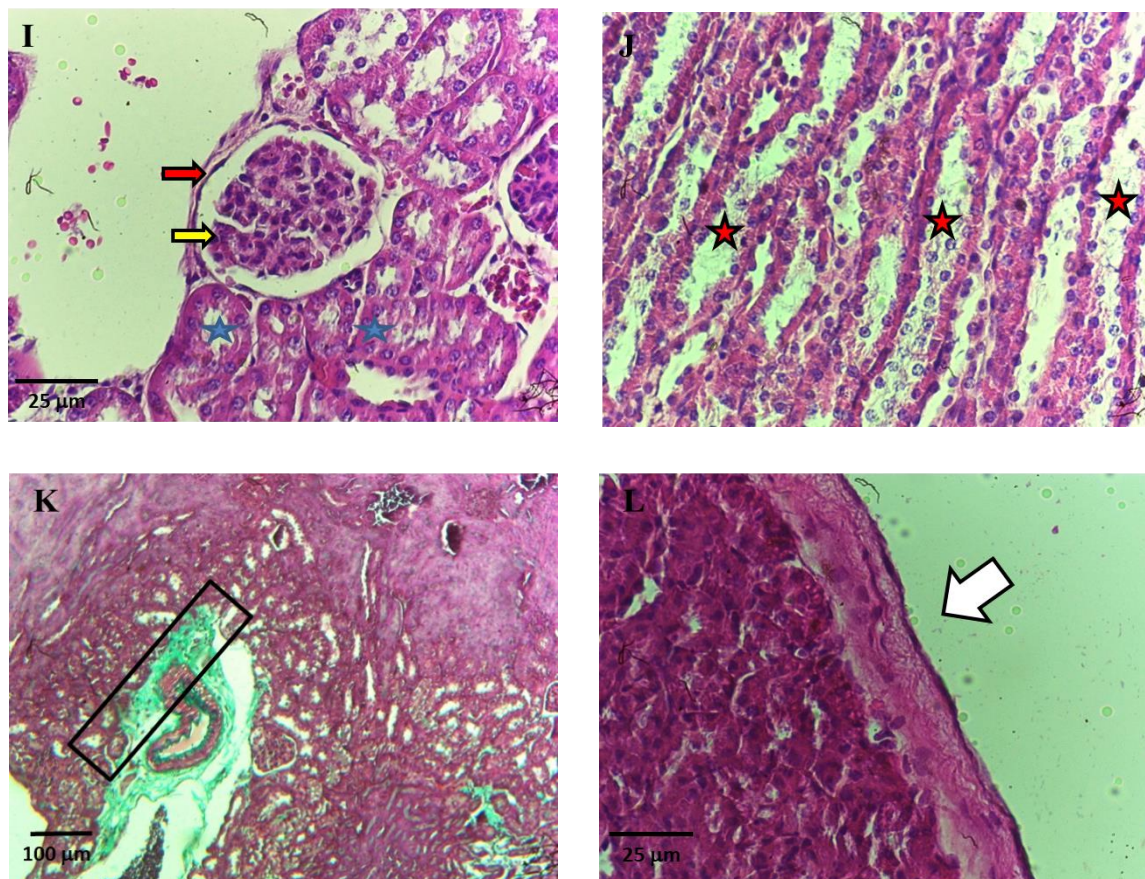
Figura 19. Histopatologia dos rins de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich após tratamento de sete dias (i.p.) com ACS03 (12,5 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg)



Fonte: MEDEIROS, 2020

Legenda: Controle (Figura A, B, C e D) 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 (asterisco azul) e distais (asterisco branco) e alça fina de henle (seta preta) (HE- 400x- Figura A); corte longitudinal da medula renal com túbulos coletores preservados e luz visível (asterisco vermelho) (HE- 400x-Figura B); tecido conjuntivo perivascular (retângulo preto) (TM-100x- Figura 2C e TM-400x-Figura D). Controle transplantado (Figura E, F, G e H). Glomérulo preservado com visível arteríola (círculo vermelho) (HE- 400x Figura E), túbulo distal (asterisco branco) e alça de henle (seta preta) (HE- 400x Figura F); cápsula renal preservada (seta branca) (HE- 100x- Figura H). Tratado com 5-FU (Figura I, J, K e L). Glomérulos e túbulos preservados na região cortical (HE- 400x Figura I) e medular (HE- 400x Figura J), tecido conjuntivo perivascular (retângulo preto) (TM-400x- Figura K); cápsula renal preservada (seta branca) (HE- 100x- Figura L). Tratado com ACS03 (Figura M, N, O e P). Glomérulos e túbulos preservados na região cortical (HE- 400x Figura M); corte transversal da medula renal com túbulos coletores preservados e luz visível (asterisco vermelho) (HE- 400x-Figura N); tecido conjuntivo perivascular (retângulo preto) (TM-400x- Figura 2O); infiltrado inflamatório perivascular (seta verde HE- 400x Figura P).

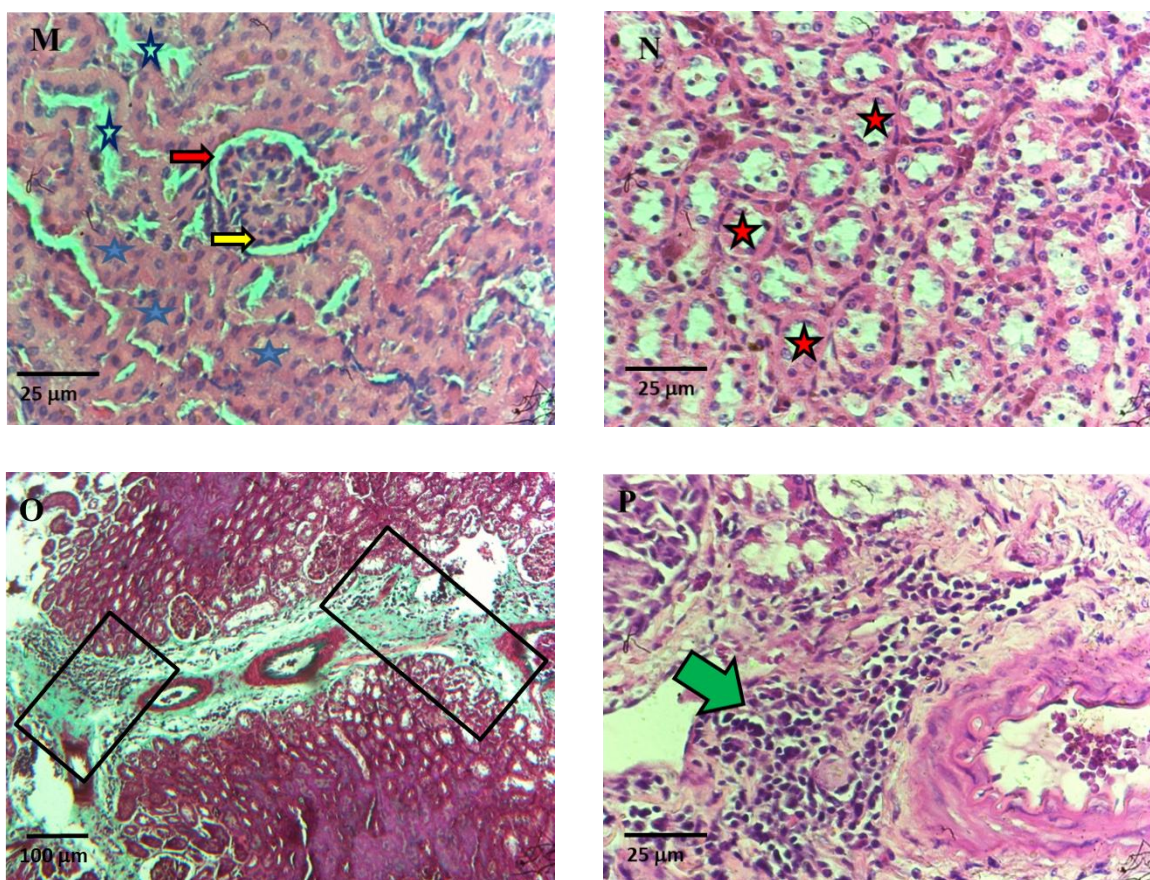
Figura 19. Histopatologia dos rins de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich após tratamento de sete dias (i.p.) com ACS03 (12,5 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) (Continuação)



Fonte: MEDEIROS, 2020

Legenda: Controle (Figura A, B, C e D) 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 (asterisco azul) e distais (asterisco branco) e alça fina de henle (seta preta) (HE- 400x- Figura A); corte longitudinal da medula renal com túbulos coletores preservados e luz visível (asterisco vermelho) (HE- 400x-Figura B); tecido conjuntivo perivascular (retângulo preto) (TM-100x- Figura 2C e TM-400x-Figura D). Controle transplantado (Figura E, F, G e H). Glomérulo preservado com visível arteríola (círculo vermelho) (HE- 400x Figura E), túbulo distal (asterisco branco) e alça de henle (seta preta) (HE- 400x Figura F); cápsula renal preservada (seta branca) (HE- 100x- Figura H). Tratado com 5-FU (Figura I, J, K e L). Glomérulos e túbulos preservados na região cortical (HE- 400x Figura I) e medular (HE- 400x Figura J), tecido conjuntivo perivascular (retângulo preto) (TM-400x- Figura K); cápsula renal preservada (seta branca) (HE- 100x- Figura L). Tratado com ACS03 (Figura M, N, O e P). Glomérulos e túbulos preservados na região cortical (HE- 400x Figura M); corte transversal da medula renal com túbulos coletores preservados e luz visível (asterisco vermelho) (HE- 400x-Figura N); tecido conjuntivo perivascular (retângulo preto) (TM-400x- Figura 2O); infiltrado inflamatório perivascular (seta verde HE- 400x Figura P).

Figura 19. Histopatologia dos rins de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich após tratamento de sete dias (i.p.) com ACS03 (12,5 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) (Continuação)



Fonte: MEDEIROS, 2020

Legenda: Controle (Figura A, B, C e D) 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 (asterisco azul) e distais (asterisco branco) e alça fina de henle (seta preta) (HE- 400x- Figura A); corte longitudinal da medula renal com túbulos coletores preservados e luz visível (asterisco vermelho) (HE- 400x-Figura B); tecido conjuntivo perivascular (retângulo preto) (TM-100x- Figura 2C e TM-400x-Figura D). Controle transplantado (Figura E, F, G e H). Glomérulo preservado com visível arteríola (círculo vermelho) (HE- 400x Figura E), túbulo distal (asterisco branco) e alça de henle (seta preta) (HE- 400x Figura F); cápsula renal preservada (seta branca) (HE- 100x- Figura H). Tratado com 5-FU (Figura I, J, K e L). Glomérulos e túbulos preservados na região cortical (HE- 400x Figura I) e medular (HE- 400x Figura J), tecido conjuntivo perivascular (retângulo preto) (TM-400x- Figura K); cápsula renal preservada (seta branca) (HE- 100x- Figura L). Tratado com ACS03 (Figura M, N, O e P). Glomérulos e túbulos preservados na região cortical (HE- 400x Figura M); corte transversal da medula renal com túbulos coletores preservados e luz visível (asterisco vermelho) (HE- 400x-Figura N); tecido conjuntivo perivascular (retângulo preto) (TM-400x- Figura 2O); infiltrado inflamatório perivascular (seta verde HE- 400x Figura P).

Discussão

6 DISCUSSÃO

A descoberta de novos medicamentos anticâncer é fundamental para a pesquisa e desenvolvimento farmacêutico, e tratamento de indivíduos acometidos com a doença (SUN et al., 2017). Derivados tiofênicos e/ou acridínicos vêm sendo extensivamente estudados devido a sua atividade anticâncer (LEPAILLEUR et al., 2014; PUTEROVÁ; KRUTOŠÍKOVÁ; VÉGHIC, 2010; SILVA et al., 2019; SZYMAŃSKI et al., 2017; ZHOU et al., 2018). A estratégia de hibridização vem sendo utilizada para o planejamento e desenvolvimento de novos fármacos, pois tem a capacidade de combinar duas ou mais moléculas bioativas buscando melhor atividade (DE LIMA SERAFIM et al., 2018). Neste estudo, foi investigado a atividade anticancerígena *in vitro* e *in vivo*, bem como a toxicidade de um híbrido tiofênico-acridínico, 2 - ((6-Cloro-2-metoxiacridina-9-il) amino) -5,6,7,8-tetra-hidro-4H-ciclo-hepta [b] -tiofeno-3-carbonitrila (ACS03).

A pesquisa iniciou com a avaliação da citotoxicidade de ACS03 em células tumorais humanas e não tumorais. Os dados mostram que o ACS03 tem um efeito seletivo contra as células de carcinoma colorretal HCT-116, pois não mostrou atividade significativa contra as demais linhagens testadas (HeLa, MCF-7, K562, HL-60).

O câncer colorretal, um tipo de câncer frequentemente diagnosticado em todo o mundo, é uma doença na qual tumores malignos se formam nos tecidos do cólon ou reto. O câncer colorretal é a segunda principal causa de mortes relacionadas ao câncer no mundo e a terceira causa mais comum de morte relacionada ao câncer em homens e mulheres nos Estados Unidos (CHEN; NEUGUT; ROTTERDAM, 1994; SIEGEL; NAISHADHAM; JEMAL, 2013). As estimativas da *American Cancer Society* para o número de casos de câncer colorretal nos Estados Unidos em 2020 são de 104.610 novos casos de câncer de cólon e 43.340 novos casos de câncer retal, somando 147.950 novos casos de câncer colorretal em 2020 apenas nos Estados Unidos. Portanto, considerando os dados epidemiológicos apresentados, a atividade seletiva de ACS03 contra células de câncer colorretal é de relevância na busca por novos tratamentos para essa doença (LOGAN et al., 2019).

As opções de tratamento do câncer colorretal dependem da localização do tumor, tamanho e estágio do câncer, e das características gerais do paciente, porém, as duas principais opções são quimioterapia e cirurgia (AOYAGI, 2014; SHETH; CLARY, 2005). A quimioterapia pode ser administrada, em alguns casos, antes da cirurgia para reduzir o tamanho do tumor ou após a cirurgia (NORDLINGER et al., 2008). A sobrevida global de pacientes com câncer de cólon aumentou na última década devido a melhorias nas ciências médicas e nos tratamentos quimioterápicos (COLON CANCER LAPAROSCOPIC OR OPEN RESECTION STUDY GROUP, 2009; HOLOHAN et al., 2013). Porém, a maioria dos pacientes com câncer colorretal desenvolvem resistência aos medicamentos, o que diminui a sua eficácia e, por fim, leva ao fracasso da quimioterapia (DIAZ et al., 2012; ENGELMAN et al., 2007). Nesse contexto, as mortes por câncer colorretal entre pessoas com menos de 55 anos aumentaram 2% ao ano entre 2007 e 2016, sendo esperado cerca de 53.200 mortes em 2020 (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020). No Brasil ocorreram 18867 mortes causadas por câncer colorretal em 2017, sendo 9207 homens e 9660 mulheres. A estimativa é que em 2020 ocorram cerca de 40990 novos casos, sendo 20520 homens e 20470 mulheres em 2020 (INCA, 2019).

Dados da literatura demonstram a atividade antitumoral de compostos acridínicos e tiofênicos contra células de carcinoma colorretal (BELMONT et al., 2007; FU et al., 2017). No entanto, no presente trabalho, os precursores de acridina e tiofeno que deram origem ao híbrido ACS03 também foram testados contra células HCT-116, e foi observada baixa citotoxicidade. Estes resultados indicam que a hibridação dos núcleos tiofênico e acridínico foi eficaz no aumento da atividade antitumoral, sendo a primeira vez que um composto híbrido de tiofeno-acridina com atividade antitumoral é descrito.

Adicionalmente, os resultados mostram que a droga padrão doxorrubicina produz alta citotoxicidade em células HCT-116, porém, também é altamente citotóxica em células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC) e em linhagem não tumoral de queratinócito humano HaCat. A doxorrubicina é uma droga antraciclina extraída pela primeira vez de *Streptomyces peucetius* var. na década de 1970 e usada rotineiramente no tratamento de vários tipos de câncer, incluindo mama, pulmão, estômago, ovário, tireoide, linfoma não-Hodgkin e Hodgkin, mieloma múltiplo, sarcoma, câncer pediátrico e câncer colorretal

(ARCAMONE et al., 1969; CORTÉS-FUNES; CORONADO, 2007; WEINLANDER et al., 1997; WEISS, 1992; XIONG; XIAO, 2018). Existem dois mecanismos propostos pelos quais a doxorubicina atua na célula cancerígena (i) intercalação no DNA e interrupção do reparo do DNA mediado pela topoisomerase II e (ii) geração de radicais livres e seus danos às membranas celulares, DNA e proteínas (GEWIRTZ, 1999; THORN et al., 2011).

O uso clínico de compostos de acridina e tiofeno é limitado por problemas como efeitos colaterais, desenvolvimento de resistência por parte das células tumorais e baixa biodisponibilidade, o que, em conjunto, estimulam outras modificações químicas desses compostos para superar essas limitações (SÁNCHEZ et al., 2006; ZHAO et al., 2019). Dados anteriores mostraram citotoxicidade de compostos de acridina, incluindo a amsacrina, contra células mononucleares do sangue periférico (PBMC) (BARROS et al., 2012). Da mesma forma, a alta toxicidade descrita para compostos de tiofeno contra células normais limita sua utilidade (GRAMEC; PETERLIN MAŠIČ; SOLLNER DOLENC, 2014). Neste estudo, o híbrido ACS03 produziu baixa citotoxicidade contra células não tumorais (PBMC, HaCat e L929), mostrando um alto índice de seletividade para as três linhagens avaliadas. Em contrapartida, a droga padrão doxorubicina demonstrou maior efeito citotóxico para as células não tumorais testadas observado pelo índice de seletividade inferiores aos encontrados para ACS03, sugerindo que o equilíbrio entre atividade antitumoral e a toxicidade é favorável para sua aplicação terapêutica.

Então, considerando que os dados *in vitro* para o ACS03 mostraram-se promissores, e, ainda, que a hibridação do núcleo tiofênico e acridínico revelou um melhor resultado em relação a atividade antitumoral e diminuição da citotoxicidade em células normais, foi dado continuidade aos estudos com esse composto. Para os ensaios de investigação do mecanismo de ação antitumoral *in vitro* foram utilizadas as concentrações de 25 μ M (CI50) e 50 μ M (o dobro da CI50).

O primeiro mecanismo avaliado foi a interferência do tratamento com ACS03 sobre a distribuição de células HCT-116 nas diferentes fases do ciclo celular. O ciclo celular representa uma série de eventos fortemente integrados que permitem que a célula cresça e prolifere (WU, 2018). A maioria dos quimioterápicos exercem seus efeitos interferindo nos processos envolvidos na

divisão celular (JONES; OCEN, 2020), portanto, a avaliação desse processo é importante no entendimento do mecanismo de ação antitumoral de novas drogas.

O ACS03 induziu aumento de células no pico sub-G1, o que, segundo a literatura, está relacionado a indução de apoptose e fragmentação do DNA (DI SOMMA et al., 2019; JERNEI et al., 2019), isso ocorre porque o Iodeto de Propídeo é um agente intercalante do DNA, por isso durante a análise de dados desse tipo é possível observar uma maior fluorescência (quantidade de DNA) em células 2n (G0/G1) que ainda não entraram em mitose, durante a síntese de DNA (Fase S) observa-se uma quantidade maior de DNA, e consequentemente maior marcação com PI ($>2n$). Na fase G2/M podem ser observadas as células que já tiveram seu material genético duplicado (4n) e estão prestes a sofrer citocinese, tendo, assim, o dobro de DNA das células 2n (G0/G1). O pico sub-G1 é característico de células apoptóticas pois, possuem conteúdo de DNA menor que 2n, devido a fragmentação de DNA, uma característica do processo apoptótico (CROWLEY; CHOJNOWSKI; WATERHOUSE, 2016; FRIED; PEREZ; CLARKSON, 1976).

Visto que foi observado indício de apoptose com a presença do pico sub-G1, também foi investigada a indução de apoptose por ACS03. Observamos aumento nas células em apoptose inicial e tardia quando incubadas com ACS03. Estudos anteriores sugeriram que derivados acridínicos podem induzir a parada do ciclo celular e apoptose (OLSZEWSKA et al., 2014). O mesmo foi observado como mecanismo de ação de um derivado nitroacridínico em células de câncer de mama (ZHOU et al., 2018), e para um derivado tetrahydroacridínico em células de câncer de pulmão (OLSZEWSKA et al., 2014; SZYMAŃSKI et al., 2017). Outros estudos também observaram derivados contendo tiofenos aumentaram o pico sub-G1 e causaram apoptose (ABDELHAMEID et al., 2018).

Considerando que a toxicidade induzida pela produção de estresse oxidativo é um mecanismo comum de muitos antineoplásicos, o passo seguinte desse estudo foi avaliar o potencial de ACS03 em interferir na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*).

ROS são espécies quimicamente reativas que contêm oxigênio. Em um contexto biológico, ROS são formadas como um subproduto natural do metabolismo normal do oxigênio e têm papéis importantes na sinalização celular

e na homeostase (RAY; HUANG; TSUJI, 2012). No entanto, em altas concentrações essas moléculas podem danificar lipídeos, proteínas e DNA, e induzir morte celular (CARRASCO-TORRES et al., 2017).

Nas células cancerígenas existe um delicado equilíbrio nos níveis intracelulares de ROS. As vias de sinalização sensíveis à ROS são persistentemente elevadas em muitos tipos de câncer, onde participam do crescimento/proliferação celular, diferenciação, síntese de proteínas, metabolismo da glicose, sobrevivência e inflamação das células (LIOU; STORZ, 2010a). Embora sejam observados altos níveis de ROS nas células tumorais, sugere-se que essas células sejam mais vulneráveis ao aumento intracelular de ROS em comparação às células normais (NICCO; BATTEUX, 2017). Por isso, muitas abordagens quimioterápicas envolvem o aumento da produção intracelular de ROS (TONG et al., 2015).

Em contrapartida, devido ao seu papel *dual* em células cancerígenas, alguns estudos mostram que ambas as abordagens, de elevação e de redução de ROS, são eficazes, e os medicamentos com base em um dos efeitos também se mostra eficaz com estudos *in vivo* (WANG; YI, 2008).

Neste trabalho, observou-se que em linhagem de carcinoma colorretal (HCT-116), após 48 horas de tratamento, o ACS03 diminuiu os níveis intracelulares de ROS. A diminuição dos níveis intracelulares de ROS pode indicar um aumento na capacidade antioxidante das células tumorais induzido por ACS03. Devido ao papel crítico de ROS na iniciação ou promoção dos fenótipos malignos nas células tumorais, o tratamento do câncer com antioxidantes, tem sido uma promissora abordagem terapêutica (THYAGARAJAN; SAHU, 2018). Algumas terapias como a superexpressão e/ou ativação de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, a glutathione peroxidase e a catalase (LIU et al., 2006; NELSON et al., 2006; NISHIKAWA et al., 2005; VENKATARAMAN et al., 2005), a manipulação de compostos de nitróxido com capacidade antioxidante (SOULE et al., 2007; WANG; YI, 2008) e a inibição da NAPH-oxidase (KUBO et al., 2006; SATO et al., 2006) vem sendo estudadas contra o câncer. Além disso, Derivados acridinícos já foram descritos na literatura apresentando atividade antitumoral e antioxidante (HAIDER et al., 2019; KALIRAJAN et al., 2012). Em contrapartida, outros estudos também mostraram que derivados tiofênicos apresentaram aumento nos níveis de ROS

em duas linhagens de carcinoma hepatocelular (CAI et al., 2019). Adicionalmente, a amsacrina foi descrita aumentando os níveis de ROS em células cancerígenas (BLASIAK et al., 2003). Em nosso estudo sugere-se que a presença do radical metoxila na estrutura molecular de ACS03 pode estar relacionada ao seu potencial antioxidante, visto que o efeito antioxidante da metoxila é descrito na literatura (LIN et al., 2014; SULPIZIO et al., 2016).

Os ensaios *in vivo* iniciaram com a avaliação da toxicidade de ACS03, uma vez que a maioria dos agentes quimioterápicos contra o câncer podem produzir significativa toxicidade, mesmo nas doses terapêuticas usuais, levando ao aparecimento de diversos efeitos colaterais (NISARI et al., 2017; PLENDERLEITH, 1990). Devido a isso é importante avaliar os efeitos toxicológicos de novas substâncias testadas para o tratamento do câncer, buscando drogas mais eficazes e menos tóxicas (DE MELO REGO et al., 2017).

O estudo toxicológico com o ACS03 foi iniciado pelo teste de toxicidade aguda não clínica em camundongos. Essa metodologia, além de investigar a segurança do composto avaliado, permite estimar doses seguras para os estudos farmacológicos (VENKATESAN; RAMANATHAN, 2017).

Com base nos resultados obtidos, a DL_{50} do ACS03 foi estimada em torno de 5000 mg/kg, sendo classificado na categoria 5 – GHS, o que permite inferir que ACS03 é uma substância de baixa toxicidade aguda (DE MELO REGO et al., 2017). Ainda, sabe-se que, em geral, se a DL_{50} do composto teste for três vezes maior do que a dose mínima eficaz, o composto é considerado um bom candidato para estudos futuros (AMELO; NAGPAL; MAKONNEN, 2014; OTHUKE; UWAKWE; MONAGO, 2012). Esses dados corroboram os resultados encontrados para o derivado espiro-acridínico ACS-AZ10, que também apresentou baixa toxicidade, (DL_{50} aproximadamente 2000 mg/kg) (MANGUEIRA et al., 2017), pro derivado acridínico AMTAC-17 (DL_{50} aproximadamente 5000 mg/kg) (MOTA, 2019) e para o ACMD (DL_{50} aproximadamente 1000 mg/kg)(SOUSA, 2019). Por outro lado, dados da literatura mostram que alguns derivados de acridina têm alta toxicidade aguda (PAN et al., 2007). O derivado aminotiofeno SB-44 também apresentou baixa toxicidade aguda (DL_{50} aproximadamente 5000 mg/kg) (MOURA, 2016), corroborando com os dados apresentados em neste trabalho.

Muitos antineoplásicos induzem genotoxicidade em células normais como um efeito secundário, além de induzirem apoptose em células tumorais em resposta a danos causados ao DNA (QUISPE-TINTAYA et al., 2018). Sendo assim, o uso desses fármacos pode também causar efeitos genotóxicos em células não tumorais, levando a danos associados ao desenvolvimento de uma segunda neoplasia em consequência do tratamento inicial (DE MELO REGO et al., 2017).

O efeito genotóxico do ACS03 foi investigado por meio do ensaio do micronúcleo em sangue periférico de camundongos. Micronúcleo é o nome dado ao pequeno núcleo que se forma sempre que um cromossomo ou fragmento de um cromossomo não é incorporado a um dos núcleos filhos durante a divisão celular, e geralmente é um sinal de eventos genotóxicos e instabilidade cromossômica (HINTZSCHE et al., 2017; KIRSCH-VOLDERS et al., 2011).

O tratamento com o ACS03 não provocou aumento significativo no número de eritrócitos micronucleados, podendo-se inferir, portanto, que o ACS03 não apresentou potencial genotóxico em sangue periférico de camundongos, nas condições experimentais avaliadas. Em contraste, a amsacrina (o mais conhecido composto acridínico), que é um potente agente antitumoral, se demonstrou potencialmente mutagênica e genotóxica para células saudáveis (DENNY, 2002). Os derivados acridínicos AMTAC-17 (MOTA, 2019), ACSAZ10 (MANGUEIRA et al., 2017) e ACMD (SOUSA, 2019) apresentaram baixa genotoxicidade, assim como derivado aminotiofênico SB-44 (MOURA, 2016). Em adição, um derivado aminotiofênico apresentou genotoxicidade apenas em altas concentrações avaliado pelo ensaio de Cometa (LEPAILLEUR et al., 2014).

Em seguida, foi realizada a avaliação da toxicidade de ACS03 em embriões de peixe zebra, pois diferenças na DL_{50} em espécies distintas podem fornecer indícios de variações na absorção, metabolismo e mecanismos de toxicidade de uma substância (ADAMSON, 2016). Foi utilizado o modelo de peixe-zebra (*Danio rerio*) de acordo com o guia nº 236 da OECD (2013) que se destina a determinar a toxicidade aguda ou letal de produtos químicos em estágios embrionários dessa espécie (OECD, 2013).

Embriões e larvas de *Danio rerio* (peixe-zebra) tem sido usados como modelo toxicológico para realizar testes rápidos e ensaios de toxicidade no desenvolvimento, incluindo a avaliação da toxicidade de compostos

farmacêuticos (CASSAR et al., 2020; DUCHARME et al., 2015). Felizmente, em estudos toxicológicos, muitas respostas foram semelhantes entre peixes-zebra e humanos (HALLARE; KÖHLER; TRIEBSKORN, 2004; HUITING; LAROCHE; FENG, 2015; SIPES; PADILLA; KNUDSEN, 2011). Portanto, embriões de peixe-zebra são valiosos no estudo da toxicidade sistêmica, que pode ser avaliada usando a mortalidade embrionária geral como uma medida a partir da qual a faixa de trabalho de um composto pode ser determinada (VIEIRA et al., 2008).

ACS03 não induziu a mortalidade de embriões e larvas de peixes, no entanto, os embriões apresentaram algumas alterações morfológicas, como deformação da coluna vertebral, redução no comprimento larval e edema pericárdico. Porém, essas alterações morfológicas ocorreram em concentrações cinco vezes maiores que a Cl_{50} do ACS03 nas células tumorais HCT-116. Nesse contexto, dados da literatura mostram que o peixe-zebra é um modelo muito sensível de avaliação de toxicidade, e os estágios iniciais são geralmente mais sensíveis à exposição a produtos químicos (DVIR et al., 2010). Em estudos com um derivado acridínico (AMTAC17), foi observado uma baixa CL_{50} (10 vezes maior que a Cl_{50} em células tumorais) em embriões e larvas de peixe zebra (MOTA, 2019).

Para aprofundar o entendimento do perfil de atividade do ACS03, foram também analisadas as atividades enzimáticas de lactato desidrogenase (LDH), glutathione S-transferase (GST) e acetilcolinesterase (AChE) em larvas de peixe-zebra.

LDH é uma enzima metabólica envolvida na via anaeróbica do metabolismo dos carboidratos e tem sido usada como um biomarcador de estresse em peixes (VIEIRA et al., 2008). O ACS03 aumentou a atividade da LDH, mostrando que havia uma alta necessidade energética nas larvas de peixe-zebra expostas ao tratamento.

AChE é responsável pela degradação enzimática da acetilcolina (ACh), e sua ausência ou baixa atividade causa altos níveis de ACh sistêmica, que atua como um neurotransmissor (DVIR et al., 2010). Para o tratamento com ACS03, observou-se um aumento na atividade da AChE, que geralmente está associada à neurotoxicidade (KAIS et al., 2015); no entanto, a literatura também sugere que a AChE pode exibir atividade antitumoral, além de correlacionar a malignidade

do tumor com baixa atividade da AChE (PÉREZ-AGUILAR et al., 2015; XU et al., 2014; ZHANG et al., 2013).

GST é vital na via das enzimas de desintoxicação da Fase II em humanos e fornece proteção contra toxinas, catalisando a conjugação de toxinas com glutathione (GSH) ou se ligando passivamente a várias moléculas tóxicas exógenas/endógenas, incluindo toxinas ambientais, carcinógenos, agentes quimioterapêuticos e produtos de estresse oxidativo (STURCHIO et al., 2008; XIE et al., 2015). Também foi observado um aumento na atividade de GST em larvas expostas a ACS03, o que pode estar associado ao aumento da capacidade antioxidante.

Sabendo-se que o ACS03 apresentou atividade antitumoral *in vitro*, baixa toxicidade em células normais *in vitro*, baixa toxicidade aguda em camundongos e em peixe-zebra, e não apresentou potencial genotóxico, o passo seguinte do presente estudo foi avaliar a atividade antitumoral *in vivo* no modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich.

Para avaliar o efeito antitumoral *in vivo* do ACS03, foi utilizado o modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich (EAC), um adenocarcinoma mamário murino espontâneo que é um modelo bem estabelecido para testar novos candidatos a fármacos (EGAWA; ISHIOKA; OGATA, 1979; MISHRA et al., 2018).

A droga padrão utilizada foi o 5-fluorouracil (5-FU), um agente quimioterápico antimetabólito, amplamente utilizado no tratamento de vários cânceres sólidos (PARDINI et al., 2011). O principal mecanismo de ação do 5-FU consiste na inibição da enzima timidilato sintase, por meio do metabólito ativo, monofosfato de fluorodesoxiuridina (FdUMP), que forma um complexo ternário inativo com a timidilato sintase e o 5-10-metilenotetrahidrofolato (MTHF), por isso, atua especificamente nas fases G1 e S do ciclo celular, interferindo no metabolismo dos nucleosídeos, causando supressão do RNA e da replicação do DNA (BORRO et al., 2017; LORIOT et al., 2018).

Nesse estudo, o 5-FU induziu potente atividade antitumoral reduzindo todos os parâmetros avaliados (volume e massa tumoral, e viabilidade e total celular), o que justifica a escolha deste fármaco como droga padrão em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich. Além disso, 5-FU também possui atividade antiangiogênica relatada (OOYAMA et al., 2008).

ACS03 (12,5 mg/kg) reduziu a massa e o volume tumoral, e a viabilidade e o total celular, indicando significativa atividade *in vivo* deste composto. Esses dados corroboram os resultados da literatura de compostos separados acridínicos e tiofênicos, que mostram efeito antitumoral no modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich (MANGUEIRA et al., 2017; RAKESH et al., 2015). Sendo assim, a dose de 12,5 mg/kg foi selecionada para a investigação do mecanismo de ação antitumoral e da toxicidade de ACS03.

A angiogênese, processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, é uma característica do desenvolvimento e metástase de tumores, e é um alvo farmacológico importante para o tratamento do câncer (BLOCH; HAREL, 2016; MA; WAXMAN, 2008). Os tumores sólidos precisam de um suprimento sanguíneo para crescer além de alguns milímetros de tamanho, e, para suprir essa necessidade, os tumores emitem sinais químicos que então estimulam a angiogênese (NISHIDA et al., 2006b). As terapias antiangiogênicas visam interromper esses sinais e consequentemente bloquear o suprimento de nutrientes e oxigênio para o tumor, principalmente por meio do bloqueio da sinalização VEGF/VEGFR (RAMJIAWAN; GRIFFIOEN; DUDA, 2017).

Nesse estudo, os dados de avaliação da microdensidade vascular revelaram aumento significativo no percentual de inibição da área vascular peritoneal do grupo tratado com o ACS03. Assim, pode-se inferir que seus efeitos antitumorais envolvem uma ação antiangiogênica. Esses dados corroboram o resultado encontrado por Mangueira e colaboradores (2017) para o derivado espiroacridínico ACS-AZ10, que também induziu uma diminuição da microdensidade dos vasos peritumorais no mesmo modelo experimental. Além disso, o resultado obtido nesse ensaio encoraja a realização de estudos adicionais, no intuito de caracterizar os possíveis alvos envolvidos com a inibição da angiogênese pelo ACS03. Estudos também mostraram um derivado tiofênico com potente atividade inibidora do crescimento e formação de vasos (AHN et al., 2004). Além disso, o derivado tiofênico SB-44 apresentou atividade antiangiogênica na dose de 100 mg/kg, ressaltando a potente atividade antiangiogênica do ACS03 na dose de 12,5 mg/kg (MOURA, 2016).

O câncer compreende células malignas envolvidas em uma complexa rede de células estromais, incluindo células imunes, fibroblastos e vasos

sanguíneos. O estroma tumoral, fatores de crescimento e citocinas fornecem a estrutura para células malignas e, importante, moldam o microambiente tumoral. Assim, as interações estromais tumorais podem restringir ou promover o crescimento do câncer, regulando a sobrevivência, a proliferação e a resposta terapêutica das células tumorais (HINSHAW; SHEVDE, 2019; MCMILLIN; NEGRI; MITSIADES, 2013).

Nesse contexto, diversas citocinas regulam vários aspectos do crescimento do tumor (MITTAL et al., 2014). As citocinas são moléculas mensageiras, secretadas por diversos tipos de células, que facilitam as comunicações célula a célula e regulam predominantemente a homeostase, imunidade e inflamação dos tecidos (GANSS, 2017). Por isso, o potencial imunomodulador das citocinas tem sido explorado na terapia do câncer há várias décadas (GANSS, 2017). No presente estudo, não foi observada alteração nas citocinas avaliadas (IL-1 β , IL-4, IL-12 e TNF- α) de animais tratados com ACS03, revelando que a atividade antitumoral de ACS03 não é modulada por essas citocinas.

Como discutido anteriormente as espécies reativas de oxigênio tem um papel importante na biologia do câncer e na atividade de quimioterápicos (YANG et al., 2018). Na quantificação *in vivo* de ROS em camundongos transplantados com CAE e tratados com ACS03 por sete dias não foi observada nenhuma alteração nos níveis de ROS, o que difere do achado *in vitro* em células HCT-116. Visto que a capacidade antioxidante do ACS03 pode estar diretamente relacionado a metoxila presente em sua estrutura, essa redução da capacidade antioxidante pode ocorrer devido a metabolização do composto no organismo. Reações como a O-desalquilação podem ocorrer durante o metabolismo de ACS03 e causar a abstração do átomo de hidrogênio do radical metoxila, gerando uma hidroxila, pela perda do grupamento alquílico (CH₃). Como descrito anteriormente a metoxila tem uma capacidade antioxidante maior que as hidroxilas (SULPIZIO et al., 2016), porém essa modificação estrutural não altera a atividade antitumoral do ACS03.

Porém, as células mantêm a homeostase intracelular por meio da atividade de um eficiente sistema antioxidante, incluindo catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase, por isso, é necessário avaliar a expressão e

atividade dessas enzimas em camundongos transplantados com CAE e submetidos ao tratamento com ACS03 (KUMARI et al., 2018).

Ainda no contexto da avaliação de fatores que podem afetar o microambiente tumoral, foi investigado o papel de ACS03 nos níveis de nitrito, que está associado aos níveis de óxido nítrico (NO). O NO é um gás de radical livre, solúvel em água, que desempenha um papel fundamental em vários processos fisiológicos e patológicos, incluindo no câncer. A literatura indica que o NO pode ter efeitos duplos no câncer (KORDE CHOUDHARI et al., 2013): em baixa concentração, o NO causa progressão do tumor de maneira antiapoptótica, pró-crescimento e pró-angiogênico. Por outro lado, em altas concentrações, o NO tem um papel potencial na terapia do câncer, inibindo a proliferação celular e induzindo efeitos pró-apoptóticos e antiangiogênicos (HUERTA, 2015).

No modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich observou-se que o tratamento com ACS03 induziu um aumento significativo nos níveis de nitrito, que está associado ao aumento dos níveis de NO, sugerindo que o mecanismo de ação antitumoral de ACS03 envolve os efeitos citotóxicos do óxido nítrico. Em altas concentrações, o NO tem um papel potencial na terapêutica do câncer. A síntese de NO e a expressão de NOS promovem propriedades antitumorigênicas por modulação proapoptótica ativando proteases da família caspase, regulação positiva da p53, alteração na expressão de proteínas associadas à apoptose, supressão da síntese de DNA (KORDE CHOUDHARI et al., 2013). A síntese de NO ou NOS é direcionada para tratamento anticâncer usando inibidores de NOS ou medicamento para depleção de arginina. As principais vias intermediárias induzidas por NO ou NOS são propostas para terapia combinada para melhorar a eficácia terapêutica (SALIMIAN RIZI; ACHREJA; NAGRATH, 2017). Além disso, alguns trabalhos mostram que doadores e precursores de NO quando administrados *in vitro* e *in vivo* têm atividade antiangiogênica por meio da inibição de fatores pró-angiogênicos, como o VEGF (CICCONE; MORBIDELLI, 2019; YEH et al., 2010), porém, o mecanismo pelo qual o óxido nítrico exerce efeito antiangiogênico ainda não foi bem esclarecido (CICCONE; MORBIDELLI, 2019; YEH et al., 2010).

Fármacos anticâncer exibem uma série de desvantagens, incluindo efeitos colaterais indesejáveis que envolvem alta toxicidade para tecidos saudáveis (EL-FAR et al., 2018). Diante disso, foi realizado também a

investigação de possíveis efeitos tóxicos do ACS03 (12,5 mg/kg) em modelo de tumor de Ehrlich, após o tratamento antitumoral de sete dias. Esse ensaio permite avaliar os efeitos tóxicos produzidos pelo acúmulo da substância no organismo por meio de administrações repetidas.

Inicialmente foi avaliado o consumo de água, ração e evolução ponderal, com o intuito de investigar os indícios de toxicidade sistêmica. O ACS03, assim como o 5-FU, induziu diminuição no consumo de água e ração e consequente diminuição no peso corporal dos animais. Isso comumente ocorre com quimioterápicos que provocam toxicidade em células do trato gastrointestinal e, como consequência, induz perda de peso corporal (TONG; ISENRING; YATES, 2009)(DAVIDSON et al., 2012). Os derivados acridínicos AMTAC-07 e ACS-AZ10 não induziram alterações nos parâmetros água, ração e peso corporal dos animais (MANGUEIRA et al., 2017; MOTA, 2019). Os dados de toxicidade para o 5-FU corroboram os dados da literatura que mostram efeitos anoréticos, efeito indesejável comum para a maioria dos tratamentos anticâncer (OLIVEIRA et al., 2010).

Em seguida foi realizado a avaliação dos parâmetros bioquímicos dos animais tratados com ACS03. No complexo mundo da terapia do câncer, a administração de medicamentos intencionalmente projetados para serem citotóxicos inevitavelmente causam efeitos adversos (GRIGORIAN; B. O'BRIEN, 2014). Sendo o fígado o principal local do metabolismo de muitos desses medicamentos, anormalidades no funcionamento desse órgão podem ser observadas com o uso dos quimioterápicos e pode se apresentar de diferentes maneiras.

Níveis séricos elevados de aminotransferases geralmente indicam lesão hepática, mas não necessariamente refletem ou predizem hepatotoxicidade. A aspartato aminotransferase (AST) é uma enzima presente nas mitocôndrias e no citoplasma, enquanto a alanina aminotransferase (ALT) está confinada ao citoplasma (RICART, 2017). Essas enzimas foram avaliadas no presente trabalho e foi observado que ACS03 não alterou os níveis de AST e ALT em camundongos com CAE tratados com ACS03 por sete dias.

Esses resultados diferem dos encontrados para ACS-AZ10 que induziu aumento significativo nos níveis de ALT (MANGUEIRA et al., 2017) e dos relatos de hepatotoxicidade para derivados acridínicos (PAN et al., 2007). Nas análises

histopatológicas o controle transplantado com tumor de Ehrlich apresentou algumas alterações, tais como: esteatose hepática, congestão vascular e aumento na concentração das células de kupffer, provavelmente decorrente da implantação do tumor no camundongo. Nos animais tratados com ACS03 houve a presença de algumas células necróticas e de infiltrado inflamatório. De modo geral, a arquitetura do fígado de animais tratados com o ACS03 não foi alterada, corroborando com os dados bioquímicos, o que mostra que essas alterações histopatológicas se caracterizam como um achado isolado e não são capazes de causar alterações funcionais no fígado desses animais. Algumas alterações histopatológicas do fígado também foram observadas com o tratamento de camundongos com o ACS-AZ como acúmulo de lipídeos citoplasmáticos característico de esteatose hepática e processos degenerativos (MANGUEIRA, 2019). Alterações desse tipo são descritas para algumas drogas antineoplásicas, a exemplo do tamoxifeno (LEAL et al., 2018). Já o AMTAC-17 não apresentou alterações histopatológicas significativas no fígado, porém mostrou redução em ALT e AST (MOTA, 2019). O derivado acrílico ACMD não alterou a atividade de ALT e AST e provocou poucas alterações histopatológicas e de natureza reversível, como esteatose micro e macrofocular (SOUSA, 2019). Já o derivado tiofênico SB-44 não apresentou alterações nas enzimas e histopatologia do fígado (MOURA, 2016).

Apesar das melhorias drásticas na sobrevivência dos pacientes e na tolerabilidade aos medicamentos, a nefrotoxicidade continua sendo uma complicação importante da quimioterapia (PERAZELLA, 2012). Os rins também são a principal via de eliminação de muitos medicamentos antineoplásicos e seus metabólitos, e o comprometimento renal pode resultar em excreção tardia de medicamentos quimioterápicos e aumento da toxicidade sistêmica (MAŁYSZKO et al., 2016). Inúmeros agentes quimioterápicos têm sido associados a várias alterações renais, incluindo dano tubulointersticial, doença glomerular, anormalidades eletrolíticas, hipertensão e proteinúria (GLEZERMAN; JAIMES, 2016).

Nesse contexto, para avaliar a função renal induzida por novos candidatos a drogas, a dosagem sérica de ureia pode ser usada como um indicador da função tubular renal, enquanto que dosagem de creatinina sérica pode ser usada para verificar a função glomerular (SOARES et al., 2012). O não aparecimento

de alterações nos níveis séricos de ureia e creatinina após tratamento de sete dias com ACS03 permite sugerir que este derivado acridínico não alterou a função renal dos animais, resultado este que foi confirmado pela ausência de quaisquer alterações na avaliação histológica dos rins em relação ao grupo controle de animais transplantados com CAE. Dados da literatura mostram que a m-AMSA e os derivados acridínicos AMTAC-17 e ACS-AZ10 também não apresentaram toxicidade renal, o que corrobora os dados apresentados para ACS03 (RIVERA et al., 1980)(MANGUEIRA, 2019; MOTA, 2019). Já o derivado acridínico ACMD apresentou toxicidade renal com alteração em uréia e creatinina além de alterações histopatológicas (SOUSA, 2019). Em contrapartida, O derivado tiofênico SB-44 não apresentou alterações nos níveis de ureia e creatinina (MOURA, 2016).

Devido a toxicidade aos tecidos com elevado índice mitótico, a toxicidade hematológica é observada como efeito adverso da maioria dos antineoplásicos (OUYANG; PENG; DHAKAL, 2013). Por isso, o tratamento anticâncer pode induzir a diminuição na produção de glóbulos vermelhos (anemia), na produção de glóbulos brancos (neutropenia ou granulocitopenia) e na produção de plaquetas (trombocitopenia), que podem ser fatais para o indivíduo acometido com a doença.

Ao contrário da maioria dos agentes anticâncer (STEGER; HAUTMANN; KÖLBL, 2012), ACS03 não provocou alteração em nenhum dos parâmetros hematológicos dos animais tratados. O mesmo foi observado para o derivado acridínico AMTAC-17 que causou apenas um aumento de glóbulos vermelhos seguido de um aumento de hematócrito (MOTA, 2019). Em contrapartida, o derivado acridínico ACS-AZ10 induziu alterações em neutrófilos e linfócitos, porém isso foi considerado sem significância clínica relevante (MANGUEIRA et al., 2017). Já o derivado acridínico ACMD causou redução da concentração de hemoglobina e, conseqüentemente, de hematócrito, o que é sugestivo de anemia (SOUSA, 2019). O derivado tiofênico SB-44 também causou redução da hemoglobina, porém não alterou nenhum outro parâmetro hematológico avaliado (MOURA, 2016).

Esse trabalho apresenta, pela primeira vez na literatura, um conjunto de dados que permitem inferir a atividade antitumoral de um derivado híbrido tiofênico-acridínico, além de sua baixa toxicidade, mostrando que o ACS03 é um

novo candidato a fármaco antitumoral. Esses resultados encorajam a realização de testes não-clínicos adicionais na perspectiva de contribuir com o estudo de novos candidatos a fármacos antitumorais.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

Com base nos estudos realizados, pode-se concluir que o híbrido 2 - ((6-Cloro-2-metoxiacridina-9-il) amino) -5,6,7,8-tetra-hidro-4H-ciclo-hepta [b] - tiofeno-3-carbonitrila (ACS03) apresentou:

- Atividade antitumoral *in vitro* na linhagem HCT-116 por interferir na progressão do ciclo celular, promover morte celular por apoptose e ter capacidade antioxidante;
- Baixa toxicidade contra células não tumorais (PBMC, HaCat e L929);
- Baixa toxicidade aguda em embriões e larvas de peixe-zebra;
- Alterações na atividade enzimática de larvas de peixe-zebra;
- Baixa toxicidade aguda (i.p.) em camundongos;
- Baixa genotoxicidade em camundongos;
- Atividade antitumoral *in vivo* em modelo de CAE, por aumentar níveis de NO e exercer efeitos antiangiogênicos;
- Baixa toxicidade em CAE considerando parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABDELHAMEID, M. K. et al. Design, synthesis, and screening of ortho- amino thiophene carboxamide derivatives on hepatocellular carcinomaas VEGFR-2Inhibitors. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 33, n. 1, p. 1472–1493, 2018.
- ACEHAN, D. et al. Three-dimensional structure of the apoptosome: Implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. **Molecular Cell**, v. 9, n. 2, p. 423–432, 2002.
- ADAMI, E. R. et al. Antineoplastic effect of pectic polysaccharides from green sweet pepper (*Capsicum annuum*) on mammary tumor cells in vivo and in vitro. **Carbohydrate Polymers**, v. 201, p. 280–292, 2018.
- ADAMSON, R. H. The acute lethal dose 50 (LD50) of caffeine in albino rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 80, p. 274–276, 2016.
- AGGARWAL, V. et al. biomolecules Role of Reactive Oxygen Species in Cancer Progression: Molecular Mechanisms and Recent Advancements. **Biomolecules**, v. 9, 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.
- AHN, C. M. et al. Synthesis of symmetrical bis-alkynyl or alkyl pyridine and thiophene derivatives and their antiangiogenic activities. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 15, p. 3893–3896, 2004.
- 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.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J. **Biologia molecular da célula**. 5. ed. Brasil: Artmed, 2000.
- AMELO, W.; NAGPAL, P.; MAKONNEN, E. Antiplasmodial activity of solvent fractions of methanolic root extract of *Dodonaea angustifolia* in *Plasmodium berghei* infected mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 462–469, 2014.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts & Figures 2020**. Atlanta, Ga: [s.n.].

- ANAND, P. et al. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. **Pharmaceutical research**, v. 25, n. 9, p. 2097–116, 2008.
- ANDRADE, S. P.; HART, I. R.; PIPER, P. J. Inhibitors of nitric oxide synthase selectively reduce flow in tumor-associated neovasculature. **British journal of pharmacology**, v. 107, n. 4, p. 1092–5, 1992.
- AOYAGI, T. Current treatment options for colon cancer peritoneal carcinomatosis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 35, p. 12493, 2014.
- ARCAMONE, F. et al. Adriamycin, 14-hydroxydaimomycin, a new antitumor antibiotic from *S. Peucetius* var. *caesius*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 11, n. 6, p. 1101–1110, 1969.
- BADAL MCCREATH, S.; DELGODA, R. **Pharmacognosy**. 1. ed. London: Elsevier, 2017.
- BARROS, F. W. A. et al. Synthesis and cytotoxic activity of new acridine-thiazolidine derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 11, p. 3533–3539, 2012.
- BAUDINO, T. A. Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. **Current Drug Discovery Technologies**, v. 12, n. 3–20, 2015.
- 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.
- 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, 2008.
- BÉRUBÉ, G. An overview of molecular hybrids in drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 11, n. 3, p. 281–305, 2016.
- BETTELLI, E. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 235–238, 2006.
- BHATT, A. P.; REDINBO, M. R.; BULTMAN, S. J. The role of the microbiome in cancer development and therapy. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 00, n. 0, 2017.
- BISTER, K. Discovery of oncogenes: The advent of molecular cancer research. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 50, p. 15259–

15260, 2015.

BLASIAK, J. et al. Free radical scavengers can differentially modulate the genotoxicity of amsacrine in normal and cancer cells. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 535, n. 1, p. 25–34, 2003.

BLOCH, N.; HAREL, D. The tumor as an organ: comprehensive spatial and temporal modeling of the tumor and its microenvironment. **BMC Bioinformatics**, v. 17, n. 1, p. 317, 2016.

BORRO, M. et al. Pre-treatment assay of 5-fluorouracil degradation rate (5-FUDR) to improve prediction of 5-fluorouracil toxicity in gastroesophageal cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 8, p. 14050–14057, 2017.

BORTNER, C. D.; CIDLOWSKI, J. A. Ion channels and apoptosis in cancer. **Philosophical transactions of the Royal Society of London**, v. 369, n. 1638, p. 1–9, 2014.

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

BROUSTAS, C. G.; LIEBERMAN, H. B. DNA damage response genes and the development of cancer metastasis. **Radiation research**, v. 181, n. 2, p. 111–30, 2014.

BUDANOV, A. V. The Role of Tumor Suppressor p53 in the Antioxidant Defense and Metabolism. In: **Sub-cellular biochemistry**. [s.l: s.n.]. v. 85p. 337–358.

BURKE, A. J. et al. The yin and yang of nitric oxide in cancer progression. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 3, p. 503–512, 2013.

CAI, G. et al. Thiophene derivatives as anticancer agents and their delivery to tumor cells using albumin nanoparticles. **Molecules**, v. 24, n. 1, 2019.

CARRASCO-TORRES, G. et al. Cytotoxicity, Oxidative Stress, Cell Cycle Arrest, and Mitochondrial Apoptosis after Combined Treatment of Hepatocarcinoma Cells with Maleic Anhydride Derivatives and Quercetin. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.

CASSAR, S. et al. Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, v. 33, n. 1, p. 95–118, 2020.

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

2016.

CHABNER, B. A. et al. Quimioterapia das doenças neoplásicas. In: **As bases farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 10. ed. Rio de Janeiro: Quimioterapia das doenças neoplásicas, 2012. p. 1665–1730.

CHAE, Y. K. et al. Genomic landscape of DNA repair genes in cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 17, p. 23312–21, 2016.

CHEN, C. C.; NEUGUT, A. I.; ROTTERDAM, H. Risk factors for adenocarcinomas and malignant carcinoids of the small intestine: preliminary findings. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention**, v. 3, n. 3, p. 205–209, 1994.

CHENG, R.; MA, J. Angiogenesis in diabetes and obesity. **Reviews in endocrine & metabolic disorders**, v. 16, n. 1, p. 67–75, 2015.

CHEUNG-ONG, K.; GIAEVER, G.; NISLOW, C. DNA-Damaging Agents in Cancer Chemotherapy: Serendipity and Chemical Biology. **Chemistry & Biology**, v. 20, n. 5, p. 648–659, 2013.

CHILIN, A. et al. Synthesis and antitumor activity of novel amsacrine analogs: The critical role of the acridine moiety in determining their biological activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 2, p. 523–529, 2009.

CHIMOTE, G. et al. Comparison of effects of anti-angiogenic agents in the zebrafish efficacy-toxicity model for translational anti-angiogenic drug discovery. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 8, p. 1107–1123, 2014.

CHIN, K. et al. Induction of vascular endothelial growth factor by nitric oxide in human glioblastoma and hepatocellular carcinoma cells. **Oncogene**, v. 15, n. 4, p. 437–442, 1997.

CHOI, B. M. et al. Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 1, p. 116–126, 2002.

CHOLEWIŃSKI, G.; DZIERZBICKA, K.; KOODZIEJCZYK, A. M. Natural and synthetic acridines / acridones as antitumor agents : their biological activities and methods of synthesis. **Pharmacological Reports**, p. 7–12, 2011.

CHON, J.; STOVER, P. J.; FIELD, M. S. Targeting nuclear thymidylate biosynthesis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 53, p. 48–56, 2017.

CICCONE, V.; MORBIDELLI, L. Antitumor Effect of a Metal-Nonoate Through Angiogenesis Impairment. **Therapeutic Application of Nitric Oxide in Cancer**

and Inflammatory Disorders, p. 59–64, 2019.

COLON CANCER LAPAROSCOPIC OR OPEN RESECTION STUDY GROUP, ET AL. Survival after laparoscopic surgery versus open surgery for colon cancer: long-term outcome of a randomised clinical trial. **The Lancet Oncology**, v. 10, n. 1, p. 44–52, 2009.

CONKLIN, K. A. Chemotherapy-Associated Oxidative Stress: Impact on Chemotherapeutic Effectiveness. **Integrative Cancer Therapies**, v. 3, n. 4, p. 294–300, 2004.

COOPER, G. M. **Elements of human cancer**. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 1992.

CORTÉS-FUNES, H.; CORONADO, C. **Role of anthracyclines in the era of targeted therapy**. Cardiovascular Toxicology. **Anais...**2007

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.

CRENSHAW, J. M.; GRAVES, D. E.; DENNY, W. A. Interactions of Acridine Antitumor Agents with DNA: Binding Energies and Groove Preferences. **Biochemistry**, v. 34, n. 41, p. 13682–13687, 1995.

CROWLEY, L. C.; CHOJNOWSKI, G.; WATERHOUSE, N. J. Measuring the DNA content of cells in apoptosis and at different cell-cycle stages by propidium iodide staining and flow cytometry. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 10, p. 905–910, 2016.

CURTIN, N. J. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 12, p. 801–817, 2012.

DALLEMAGNE, P. et al. Synthesis and biological evaluation of five-membered heterocycles fused to cyclopenta[c]thiophene as new antitumor agents. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 11, n. 7, p. 1161–7, 2003.

DAMMANN, R. et al. Impact of Natural Compounds on DNA Methylation Levels of the Tumor Suppressor Gene RASSF1A in Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 10, p. 2160, 2017.

DASARI, S.; BERNARD TCHOUNWOU, P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**, v. 740, p. 364–378, 2014.

DAVIDSON, W. et al. Malnutrition and chemotherapy-induced nausea and

- vomiting: Implications for practice. **Oncology Nursing Forum**, v. 39, n. 4, 2012.
- DAVIS, C. D.; MILNER, J. A. Molecular targets for nutritional preemption of cancer. **Current cancer drug targets**, v. 7, n. 5, p. 410–5, 2007.
- DE LIMA SERAFIM, V. et al. New thiophene–acridine compounds: Synthesis, antileishmanial activity, DNA binding, chemometric, and molecular docking studies. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 91, n. 6, p. 1141–1155, 2018.
- DE MELO REGO, M. J. B. et al. Synthesis and Anticancer Evaluation of Thiazacridine Derivatives Reveals New Selective Molecules to Hematopoietic Neoplastic Cells. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 20, n. 8, 2017.
- DENNY, W. A. Acridine derivatives as chemotherapeutic agents. **Current medicinal chemistry**, v. 9, n. 18, p. 1655–65, 2002.
- DI SOMMA, S. et al. G-quadruplex binders induce immunogenic cell death markers in aggressive breast cancer cells. **Cancers**, v. 11, n. 11, 2019.
- DIAZ-MORALLI, S. et al. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 138, n. 2, p. 255–271, 2013.
- DIAZ, L. A. et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. **Nature**, v. 486, n. 7404, p. 537–540, 2012.
- DICKENS, E.; AHMED, S. **Principles of cancer treatment by chemotherapySurgery (United Kingdom)**Elsevier Ltd, , 2018.
- DICKSON, M. A.; SCHWARTZ, G. K. Development of cell-cycle inhibitors for cancer therapy. **Current oncology (Toronto, Ont.)**, v. 16, n. 2, p. 36–43, 2009.
- DIGE, A. et al. Increased levels of circulating Th17 cells in quiescent versus active Crohn's disease. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 7, n. 3, p. 248–255, 2013.
- 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.
- DONG, C. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 4, p. 329–334, 2006.
- DOS SANTOS, F. A. et al. Anticancer properties of thiophene derivatives in breast cancer MCF-7 cells. **Anti-Cancer Drugs**, v. 29, n. 2, p. 157–166, 2017.
- DUCHARME, N. A. et al. Comparison of toxicity values across zebrafish early life stages and mammalian studies: Implications for chemical testing. **Reproductive**

Toxicology, v. 55, p. 3–10, 2015.

DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The Three Es of Cancer Immunoediting. **Annual Review of Immunology**, v. 22, n. 1, p. 329–360, 2004.

DVIR, H. et al. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. **Chemico-Biological Interactions**, v. 187, n. 1–3, p. 10–22, 2010.

EBCTCG. Aromatase inhibitors versus tamoxifen in early breast cancer: patient-level meta-analysis of the randomised trials. **The Lancet**, v. 386, n. 10001, p. 1341–1352, 2015.

EDWARDS, L. H. **Fungicidal 2-(N-haloalkylthiosulfonamido)thiophenes**, 1976. Disponível em: <<http://www.google.tl/patents/US3991081>>. Acesso em: 25 nov. 2017

EGAWA, J.; ISHIOKA, K.; OGATA, T. Effect of irradiation and chemotherapeutic agents on the capillaries of ehrlich ascites carcinoma of mice. **Acta Oncologica**, v. 18, n. 6, p. 535–543, 1979.

EGEBLAD, M.; NAKASONE, E. S.; WERB, Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. **Developmental cell**, v. 18, n. 6, p. 884–901, 2010.

EL-FAR, M. et al. Silymarin nanoformulation as potential anticancer agent in experimental Ehrlich ascites carcinoma-bearing animals. **Nanomedicine**, v. 13, n. 15, p. 1865–1888, 2018.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.

ELSHABRAWY, H. A. et al. The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis. **Angiogenesis**, v. 18, n. 4, p. 433–448, 2015.

ENGELMAN, J. A. et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. **Science**, v. 316, n. 5827, p. 1039–1043, 2007.

FAKHR, I. M. I. et al. Synthesis and pharmacological evaluation of 2-substituted benzo[b]thiophenes as anti-inflammatory and analgesic agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 4, p. 1718–1725, 2009.

FELLEY-BOSCO, E. Role of nitric oxide in genotoxicity: Implication for carcinogenesis. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 17, n. 1, p. 25–37, 1998.

FENG, Z.; LEVINE, A. J. The regulation of energy metabolism and the IGF-1/mTOR pathways by the p53 protein. **Trends in cell biology**, v. 20, n. 7, p. 427–

34, 2010.

FIDLER, I. J. Timeline: The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 6, p. 453–458, 2003.

FISHER, R.; PUSZTAI, L.; SWANTON, C. Cancer heterogeneity: Implications for targeted therapeutics. **British Journal of Cancer**, v. 108, n. 3, p. 479–485, 2013.

FLOREA, A.-M.; BÜSSELBERG, D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. **Cancers**, v. 3, n. 1, p. 1351–71, 2011.

FRANK, S. et al. Differential regulation of vascular endothelial growth factor and its receptor fms-like-tyrosine kinase is mediated by nitric oxide in rat renal mesangial cells. **The Biochemical journal**, v. 338 (Pt 2), n. Pt 2, p. 367–74, 1999.

FRIED, J.; PEREZ, A. G.; CLARKSON, B. D. Flow Cytofluorometric analysis of cell cycle distributions using propidium Iodide. **The Journal of Cell Biology**, v. 71, p. 172–181, 1976.

FRIEDENSON, B. The BRCA1/2 pathway prevents hematologic cancers in addition to breast and ovarian cancers. **BMC cancer**, v. 7, p. 152, 2007.

FRUEHAUF, J. P.; MEYSKENS, F. L. Reactive Oxygen Species: A Breath of Life or Death? **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 3, p. 789–794, 2007.

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. 3086–3099, 2017.

FUERTES, M. A. et al. Anticancer compounds as leishmanicidal drugs: challenges in chemotherapy and future perspectives. **Current medicinal chemistry**, v. 15, n. 5, p. 433–9, 2008.

FULDA, S.; DEBATIN, K.-M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, v. 25, n. 34, p. 4798–4811, 2006.

GAHL, R. F.; DWIVEDI, P.; TJANDRA, N. Bcl-2 proteins bcl-2 and bax form a network to permeabilize the mitochondria at the onset of apoptosis. **Cell Death and Disease**, v. 7, n. 10, 2016.

GALDINO-PITTA, M. R. et al. Niche for acridine derivatives in anticancer therapy. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 13, n. 9, p. 1256–71, 2013.

GALLUZZI, L. et al. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. **Cell Death & Differentiation**, v. 14, n. 7, p. 1237–1243, 2007.

GALLUZZI, L. et al. Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. **Cell death & disease**, v. 5, n. 5, p. e1257, 2014.

GANSS, R. Cytokine Therapy in the Tumor Microenvironment: Old Players, New Tricks. In: **Cytokine Effector Functions in Tissues**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. p. 239–256.

GAUR, P. et al. Inter-relation of Th1, Th2, Th17 and Treg cytokines in oral cancer patients and their clinical significance. **Human Immunology**, v. 75, n. 4, p. 330–337, 2014.

GENSICKA-KOWALEWSKA, M.; CHOLEWIŃSKI, G.; DZIERZBICKA, K. Recent developments in the synthesis and biological activity of acridine/acridone analogues. **RSC Advances**, v. 7, n. 26, p. 15776–15804, 2017.

GEWIRTZ, D. A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. **Biochemical Pharmacology**, v. 57, n. 7, p. 727–741, 1999.

GHORAB, M. M.; BASHANDY, M. S.; ALSAID, M. S. Novel thiophene derivatives with sulfonamide, isoxazole, benzothiazole, quinoline and anthracene moieties as potential anticancer agents. **Acta Pharmaceutica**, v. 64, n. 4, p. 419–431, 2014.

GIALELI, C.; THEOCHARIS, A. D.; KARAMANOS, N. K. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. **FEBS Journal**, v. 278, n. 1, p. 16–27, 2011.

GIAMPAZOLIAS, E.; TAIT, S. W. G. Caspase-independent cell death: An anti-cancer double whammy. **Cell Cycle**, v. 17, n. 3, p. 269–270, 2018.

GLEZERMAN, I. G.; JAIMES, E. A. Chemotherapy and Kidney Injury. **Onco-Nephrology Curriculum**, 2016.

GOLAY, J.; INTRONA, M. Mechanism of action of therapeutic monoclonal antibodies: Promises and pitfalls of in vitro and in vivo assays. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 526, n. 2, p. 146–153, 2012.

GRAMEC, D.; PETERLIN MAŠIČ, L.; SOLLNER DOLENC, M. Bioactivation Potential of Thiophene-Containing Drugs. **Chemical Research in Toxicology**, v. 27, n. 8, p. 1344–1358, 2014.

GRANDMAISON, P. A.; NANOWSKI, T. S.; VANCE, J. E. Externalization of phosphatidylserine during apoptosis does not specifically require either isoform of phosphatidylserine synthase. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular**

and Cell Biology of Lipids, v. 1636, n. 1, p. 1–11, 2004.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.

GRIGORIAN, A.; B. O'BRIEN, C. Hepatotoxicity Secondary to Chemotherapy. **Journal of Clinical and Translational Hepatology**, v. 2, n. 2, 2014.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883–899, 2010.

GUPTA, S. C. et al. Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 29, n. 3, p. 405–434, 2010.

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, p. 102962, 2019.

HALLARE, A. V.; KÖHLER, H. R.; TRIEBSKORN, R. Developmental toxicity and stress protein responses in zebrafish embryos after exposure to diclofenac and its solvent, DMSO. **Chemosphere**, v. 56, n. 7, p. 659–666, 2004.

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

HASSANPOUR, S. H.; DEHGHANI, M. Review of cancer from perspective of molecular. **Journal of Cancer Research and Practice**, v. 4, n. 4, p. 127–129, 2017.

HEIDENREICH, R.; RÖCKEN, M.; GHORESCHI, K. Angiogenesis drives psoriasis pathogenesis. **International journal of experimental pathology**, v. 90, n. 3, p. 232–48, 2009.

HEUSSLER, V. T.; KÜENZI, P.; ROTTENBERG, S. Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. **International journal for parasitology**, v. 31, n. 11, p. 1166–76, 2001.

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

HINTZSCHE, H. et al. Fate of micronuclei and micronucleated cells. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 771, p. 85–98, 2017.

HIRAHARA, K. et al. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in Th17 cell differentiation. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 21, n. 6, p.

425–434, 2010.

HOLOHAN, C. et al. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nature reviews. Cancer**, v. 13, n. 10, p. 714–26, 2013.

HUERTA. Nitric oxide donors: Novel cancer therapeutics (Review). **international Journal of Oncology**, v. 33, n. 5, p. 909–927, 1992.

HUERTA, S. Nitric oxide for cancer therapy. **Future Science OA**, v. 1, n. 1, p. 44–53, 2015.

HUGHES, P. E.; CAENEPEEL, S.; WU, L. C. Targeted Therapy and Checkpoint Immunotherapy Combinations for the Treatment of Cancer. **Trends in Immunology**, v. 37, n. 7, p. 462–476, 2016.

HUITING, L. N.; LAROCHE, F.; FENG, H. The Zebrafish as a Tool to Cancer Drug Discovery. **Austin journal of pharmacology and therapeutics**, v. 3, n. 2, p. 1069–1087, 2015.

HYNDMAN, I. J. Review: the Contribution of both Nature and Nurture to Carcinogenesis and Progression in Solid Tumours. **Cancer Microenvironment**, v. 9, n. 1, p. 63–69, 2016.

HYOUDOU, K. et al. SOD derivatives prevent metastatic tumor growth aggravated by tumor removal. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 25, n. 5, p. 531–536, 2008.

IARC. Biological Agents. **IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum**, v. 100B, p. 1–443, 2012.

IARC. **Cancer TodayWorld Health Organization**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>>. Acesso em: 4 nov. 2019.

IMRAN, A. et al. Role of Molecular Biology in Cancer Treatment: A Review Article. **Iranian journal of public health**, v. 46, n. 11, p. 1475–1485, 2017.

INCA. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2019.

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, p. 1018, 2017.

IVANOVA, D. et al. The impact of reactive oxygen species on anticancer therapeutic strategies. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 22, n. 6, p. 899–908, 2013.

IWAMOTO, T. Clinical Application of Drug Delivery Systems in Cancer

Chemotherapy: Review of the Efficacy and Side Effects of Approved Drugs. **Biology Pharmacy Bulliten**, v. 36, n. May, p. 715–718, 2013.

JADESKI, L. C. et al. Nitric oxide promotes murine mammary tumour growth and metastasis by stimulating tumour cell migration, invasiveness and angiogenesis. **International journal of cancer**, v. 86, n. 1, p. 30–9, 2000.

JAKOWLEW, S. B. Transforming growth factor- β in cancer and metastasis. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 25, n. 3, p. 435–457, 2006.

JANSSEN, A. et al. Chromosome Segregation Errors as a Cause of DNA Damage and Structural Chromosome Aberrations. **Science**, v. 333, n. 6051, p. 1895–1898, 2011.

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.

JENKINS, D. C. et al. Roles of nitric oxide in tumor growth. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 10, p. 4392–6, 1995.

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, n. 22, 2019.

JESPERSEN, C. et al. Molecular mechanisms of nitric oxide-dependent inhibition of TPA-induced matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in MCF-7 cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 219, n. 2, p. 276–287, 2009.

JONES, R.; OCEN, J. Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects. **Medicine**, v. 48, n. 2, p. 97–102, 2020.

JOSHI, E. M. et al. In Vitro Metabolism of 2-Acetylbenzothiophene: Relevance to Zileuton Hepatotoxicity. **Chemical Research in Toxicology**, v. 17, n. 2, p. 137–143, 2004.

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KAIS, B. et al. Acetylcholinesterase in zebrafish embryos as a tool to identify neurotoxic effects in sediments. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 21, p. 16329–16339, 2015.

KALIRAJAN, R. et al. Docking studies, synthesis, characterization of some novel oxazine substituted 9-anilinoacridine derivatives and evaluation for their antioxidant and anticancer activities as topoisomerase II inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, p. 217–224, 2012.

- KANDOTH, C. et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. **Nature**, v. 502, n. 7471, p. 333–339, 2013.
- KAO-SHAN, C. S. et al. Cytogenetic effects of amsacrine on human lymphocytes in vivo and in vitro. **Cancer treatment reports**, v. 68, n. 7–8, p. 989–997, 1984.
- KASALA, E. R. et al. Chemopreventive and therapeutic potential of chrysin in cancer: mechanistic perspectives. **Toxicology Letters**, v. 233, n. 2, p. 214–225, 2015.
- KINGHORN, A. D.; CHIN, Y.-W.; SWANSON, S. M. Discovery of natural product anticancer agents from biodiverse organisms. **Current opinion in drug discovery & development**, v. 12, n. 2, p. 189–96, 2009.
- KIRSCH-VOLDERS, M. et al. The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. **Archives of Toxicology**, v. 85, n. 8, p. 873–899, 2011.
- KISCHKEL, F. C. et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. **The EMBO Journal**, v. 14, n. 22, p. 5579–5588, 1995.
- KLEIN, G. et al. The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukemia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 50, n. 2, p. 87–100, 2004.
- KOCH, A. E.; DISTLER, O. Vasculopathy and disordered angiogenesis in selected rheumatic diseases: rheumatoid arthritis and systemic sclerosis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 9, n. Suppl 2, p. S3, 2007.
- KONG, Q.; BEEL, J. A.; LILLEHEI, K. O. A threshold concept for cancer therapy. **Medical Hypotheses**, v. 55, n. 1, p. 29–35, 2000.
- KONG, Q.; LILLEHEI, K. O. Antioxidant inhibitors for cancer therapy. **Medical hypotheses**, v. 51, n. 5, p. 405–9, 1998.
- KORDE CHOUDHARI, S. et al. Nitric oxide and cancer: A review. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 11, p. 118–129, 2013.
- KORNEEV, K. V. et al. TLR-signaling and proinflammatory cytokines as drivers of tumorigenesis. **Cytokine**, v. 89, p. 127–135, 2017.
- KUBO, T. et al. Inhibitory effects of a new bisphosphonate, minodronate, on proliferation and invasion of a variety of malignant bone tumor cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 24, n. 6, p. 1138–1144, 2006.
- KUMARI, S. et al. Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer

- Survival. **Biomarker Insights**, v. 1–9, p. 117727191875539, 2018.
- LAHTZ, C.; PFEIFER, G. P. Epigenetic changes of DNA repair genes in cancer. **Journal of molecular cell biology**, v. 3, n. 1, p. 51–8, 2011.
- LALA, P. K.; ORUCEVIC, A. Role of nitric oxide in tumor progression: Lessons from experimental tumors. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 17, n. 1, p. 91–106, 1998.
- LEAL, S. et al. Evaluation of progressive hepatic histopathology in long-term tamoxifen therapy. **Pathology Research and Practice**, v. 214, n. 12, p. 2115–2120, 2018.
- LECHNER, M.; LIRK, P.; RIEDER, J. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: The two sides of the same coin. **Seminars in Cancer Biology**, v. 15, n. 4, p. 277–289, 2005.
- LEE, S.; MARGOLIN, K. Cytokines in cancer immunotherapy. **Cancers**, v. 3, n. 4, p. 3856–93, 2011.
- LEE, Y.-C. et al. Amsacrine-induced apoptosis of human leukemia U937 cells is mediated by the inhibition of AKT- and ERK-induced stabilization of MCL1. **Apoptosis**, v. 22, n. 3, p. 406–420, 2017.
- LEPAILLEUR, A. et al. Assessment of the genotoxic and carcinogenic potentials of 3-aminothiophene derivatives using in vitro and in silico methodologies. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, n. 7, p. 775–786, 2014.
- LEPOIVRE, M.; FLAMAN, J. M.; HENRY, Y. Early loss of the tyrosyl radical in ribonucleotide reductase of adenocarcinoma cells producing nitric oxide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 32, p. 22994–23000, 1992.
- LEWIS, C. E. et al. Cytokine regulation of angiogenesis in breast cancer: the role of tumor-associated macrophages. **Journal of leukocyte biology**, v. 57, n. 5, p. 747–51, 1995.
- LI, L. M. et al. Role of nitric oxide in lysis of tumor cells by cytokine-activated endothelial cells. **Cancer research**, v. 51, n. 10, p. 2531–5, 1991.
- LI, X. et al. Emodin enhances cisplatin-induced cytotoxicity in human bladder cancer cells through ROS elevation and MRP1 downregulation. **BMC Cancer**, v. 16, n. 1, 2016.
- LI, X. X. et al. Emodin as an effective agent in targeting cancer stem-like side population cells of gallbladder carcinoma. **Stem Cells and Development**, v. 22, n. 4, p. 554–566, 2013.

- LIM, S.; KALDIS, P. Cdk, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. **Development**, v. 140, n. 15, p. 3079–3093, 2013.
- LIN, C. et al. Structure-activity Relationships of Antioxidant Activity in vitro about Flavonoids Isolated from *Pyrethrum Tatsienense*. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v. 3, n. 3, p. 123, 2014.
- LIU, G.-Y.; STORZ, P. Reactive oxygen species in cancer. **Free radical research**, v. 44, n. 5, p. 479–96, 2010a.
- LIU, G. Y.; STORZ, P. **Reactive oxygen species in cancer** **Free Radical Research**, 2010b.
- LIPSICK, J. A History of Cancer Research: Tumor Suppressor Genes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 12, n. 2, p. 835–907, 2020.
- LISBOA, T. et al. Toxicity and Antitumor Activity of a Thiophene–Acridine Hybrid. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 64, 2019.
- LIU, F. S. Mechanisms of Chemotherapeutic Drug Resistance in Cancer Therapy-A Quick Review. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 48, n. 3, p. 239–244, 2009.
- LIU, J. et al. Suppression of the malignant phenotype in pancreatic cancer by overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. **Human Gene Therapy**, v. 17, n. 1, p. 105–116, 2006.
- LIU, W.-H. et al. Amsacrine suppresses matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)/MMP-9 expression in human leukemia cells. **Journal of cellular physiology**, v. 229, n. 5, p. 588–98, 2014.
- LOGAN, I. E. et al. Antiproliferative and cytotoxic activity of xanthohumol and its non-estrogenic derivatives in colon and hepatocellular carcinoma cell lines. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 5, p. 1203–1215, 2019.
- LOK, H. C. et al. A nitric oxide storage and transport system that protects activated macrophages from endogenous nitric oxide cytotoxicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 53, p. 27042–27061, 2016.
- LORIOT, M.-A. et al. Dépistage du déficit en dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD) et sécurisation des chimiothérapies à base de fluoropyrimidines : mise au point et recommandations nationales du GPCO-Unicancer et du RNPGx. **Bulletin du Cancer**, v. 105, n. 4, p. 397–407, 2018.
- LÜDER, C. G.; GROSS, U.; LOPES, M. F. Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite-host interactions. **Trends in**

parasitology, v. 17, n. 10, p. 480–6, 2001.

LUO, X. et al. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. **Cell**, v. 94, n. 4, p. 481–490, 1998.

LUO, Y. et al. Synthesis of a novel thiophene derivative that induces cancer cell apoptosis through modulation of AKT and MAPK pathways. **MedChemComm**, v. 3, n. 9, p. 1143, 2012.

MA, J.; WAXMAN, D. J. Combination of antiangiogenesis with chemotherapy for more effective cancer treatment. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 7, n. 12, p. 3670–3684, 2008.

MAEDA, H. et al. Enhanced vascular permeability in solid tumor is mediated by nitric oxide and inhibited by both new nitric oxide scavenger and nitric oxide synthase inhibitor. **Japanese journal of cancer research : Gann**, v. 85, n. 4, p. 331–4, 1994.

MAES, A. et al. The therapeutic potential of cell cycle targeting in multiple myeloma. v. 8, n. 52, p. 90501–90520, 2017.

MALONE, J. M. et al. The effects of the inhibition of inducible nitric oxide synthase on angiogenesis of epithelial ovarian cancer. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 194, n. 4, p. 1110–1116, 2006.

MALUMBRES, M. Physiological Relevance of Cell Cycle Kinases. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 3, p. 973–1007, 2011.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Milestones in cell division: To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 1, n. 3, p. 222–231, 2001.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 3, p. 153–166, 2009.

MAŁYSZKO, J. et al. Nephrotoxicity of anticancer treatment. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 32, n. 6, p. 924–936, 2016.

MANCHADO, E.; GUILLAMOT, M.; MALUMBRES, M. Killing cells by targeting mitosis. **Cell Death & Differentiation**, v. 19, n. 3, p. 369–377, 2012.

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

MANGUEIRA, V. M. **Efeito Antitumoral e Antinociceptivo do n'-(6-cloro-2-**

metoxiacridin- 9-il)-2-cianoacetohidrazide (ACS-AZ), um novo derivado acridínico. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, 2019.

MANTOVANI, A. et al. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 436–444, 2008.

MANTOVANI, A. Molecular pathways linking inflammation and cancer. **Current molecular medicine**, v. 10, n. 4, p. 369–73, 2010.

MARROGI, A. J. et al. Nitric oxide synthase, cyclooxygenase 2, and vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of non-small cell lung carcinoma. **Clinical cancer research**, v. 6, n. 12, p. 4739–44, 2000.

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.

MARTINS, D. et al. Manipulação de quimioterápicos pelos profissionais da saúde 1. **Rev. Ibirapuera**, v. 10, p. 57–61, 2015.

MARUYAMA, T. et al. Distribution of Th17 cells and FoxP3(+) regulatory T cells in tumor-infiltrating lymphocytes, tumor-draining lymph nodes and peripheral blood lymphocytes in patients with gastric cancer. **Cancer Science**, v. 101, n. 9, p. 1947–1954, 2010.

MCARTHUR, K.; KILE, B. T. Apoptotic Caspases: Multiple or Mistaken Identities? **Trends in Cell Biology**, v. 28, n. 6, p. 475–493, 2018.

MCINTOSH, J. R. Mitosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 8, n. 9, p. a023218, 2016.

MCMILLIN, D. W.; NEGRI, J. M.; MITSIADES, C. S. The role of tumour–stromal interactions in modifying drug response: challenges and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 3, p. 217–228, 2013.

MEACHAM, C. E.; MORRISON, S. J. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. **Nature**, v. 501, n. 7467, p. 328–337, 2013.

MELLMAN, I.; COUKOS, G.; DRANOFF, G. Cancer immunotherapy comes of age. **Nature**, v. 480, n. 7378, p. 480–9, 2011.

MELO, P. S. et al. Warifteine and milonine, alkaloids isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl: Cytotoxicity on rat hepatocyte culture and in V79 cells. **Toxicology Letters**, v. 142, n. 1–2, p. 143–151, 2003.

MISHRA, S. et al. Subcutaneous Ehrlich Ascites Carcinoma mice model for

studying cancer-induced cardiomyopathy. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 5599–5610, 2018.

MITTAL, D. et al. New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. **Current opinion in immunology**, v. 27, p. 16–25, 2014.

MIZUTANI, H. et al. Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. **Life Sciences**, v. 76, n. 13, p. 1439–1453, 2005.

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.

MOTA, T. **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)**. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, 2019.

MOURA, A. P. G. **Toxicidade e Potencial Antitumoral de um Derivado Sintético 2-aminotiofeno**. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, 2016.

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

MULLER, P. A. J.; VOUSDEN, K. H. **Mutant p53 in cancer: New functions and therapeutic opportunities** Cancer Cell Press, , 2014.

MUNTANÉ, J.; DE LA MATA, M. Nitric oxide and cancer. **World Journal of Hepatology**, v. 2, n. 9, p. 337–344, 2010.

MURDOCH, C. et al. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 8, p. 618–631, 2008.

NELSON, S. K. et al. The induction of human superoxide dismutase and catalase in vivo: A fundamentally new approach to antioxidant therapy. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, n. 2, p. 341–347, 2006.

NEUZILLET, C. et al. Targeting the TGF β pathway for cancer therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 147, p. 22–31, 2015.

NICCO, C.; BATTEUX, F. ROS Modulator Molecules with Therapeutic Potential in Cancers Treatments. **Molecules**, v. 23, n. 1, p. 84, 2017.

NISARI, M. et al. The detection of curcumins' antitumoral effects via argyrophilic

nucleolar organizing region-associated protein synthesis in mice with ehrlich's ascitic carcinoma. **Bratislava Medical Journal**, v. 118, n. 1, p. 61–65, 2017.

NISHIDA, N. et al. Angiogenesis in cancer. **Vascular health and risk management**, v. 2, n. 3, p. 213–9, 2006a.

NISHIDA, N. et al. Angiogenesis in cancer. **Vascular Health and Risk Management**, v. 2, n. 3, p. 213–219, 2006b.

NISHIKAWA, M. et al. Inhibition of metastatic tumor growth by targeted delivery of antioxidant enzymes. **Journal of Controlled Release**, v. 109, n. 1–3, p. 101–107, 2005.

NORDLINGER, B. et al. Perioperative chemotherapy with FOLFOX4 and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC Intergroup trial 40983): a randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 371, n. 9617, p. 1007–1016, 2008.

O'SULLIVAN, S. et al. Nitric oxide-matrix metalloproteinase-9 interactions: Biological and pharmacological significance NO and MMP-9 interactions. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 3, p. 603–617, 2014.

O'SULLIVAN, T. et al. Cancer immunoediting by the innate immune system in the absence of adaptive immunity. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 10, p. 1869–1882, 2012.

OECD. **Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test**. Paris: OECD Guideline for Testing of Chemicals n. 474, 1997.

OECD. **Acute Oral toxicity**. Paris: Oecd Guideline for Testing of Chemicals n. 423, 2002.

OECD. **Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test**. Paris: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals n. 236, 2013.

OLIVEIRA, J. et al. The synthesis and the in vitro cytotoxicity studies of bisnaphthalimidopropyl polyamine derivatives against colon cancer cells and parasite *Leishmania infantum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 1, p. 541–545, 2007.

OLIVEIRA, J. S. et al. In vivo growth inhibition of sarcoma 180 by latex proteins from *Calotropis procera*. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 382, n. 2, p. 139–149, 2010.

OLSZEWSKA, P. et al. Novel tetrahydroacridine derivatives inhibit human lung

- adenocarcinoma cell growth by inducing G1 phase cell cycle arrest and apoptosis. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 68, n. 8, p. 959–967, 2014.
- ONO, A. et al. Primary malignant lymphoma of the gallbladder: A case report and literature review. **British Journal of Radiology**, v. 82, n. 973, p. e15-9, 2009.
- OOYAMA, A. et al. Anti-angiogenic effect of 5-Fluorouracil-based drugs against human colon cancer xenografts. **Cancer Letters**, v. 267, n. 1, p. 26–36, 2008.
- OTHUKE, O.; UWAKWE, B.; MONAGO, A. Antiplasmodial Activity of Methanolic Stem Bark Extract of *Anthocleista grandiflora* in Mice. **International Journal of Applied Science and Technology**, v. 2, n. 4, 2012.
- OUYANG, W.; KOLLS, J. K.; ZHENG, Y. The Biological Functions of T Helper 17 Cell Effector Cytokines in Inflammation. **Immunity**, v. 28, n. 4, p. 454–467, 2008.
- OUYANG, Z.; PENG, D.; DHAKAL, D. P. Risk factors for hematological toxicity of chemotherapy for bone and soft tissue sarcoma. **Oncology Letters**, v. 5, n. 5, p. 1736–1740, 2013.
- OZAKI, T.; NAKAGAWARA, A. Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. **Cancers**, v. 3, n. 1, p. 994–1013, 2011.
- PAJUELO-LOZANO, N. et al. XPA, XPC, and XPD Modulate Sensitivity in Gastric Cisplatin Resistance Cancer Cells. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. OCT, 2018.
- PAN, S.-T. et al. Molecular mechanisms for tumour resistance to chemotherapy. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 43, n. 8, p. 723–737, 2016.
- 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, n. 4, p. 778–783, 2007.
- PARDINI, B. et al. 5-Fluorouracil-based chemotherapy for colorectal cancer and MTHFR/MTRR genotypes. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 72, n. 1, p. 162–163, 2011.
- PATEL, V. K. et al. Combretastatin A-4 based thiophene derivatives as antitumor agent: Development of structure activity correlation model using 3D-QSAR, pharmacophore and docking studies. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2017.
- PATHAK, A. et al. Present and Future Prospect of Small Molecule & Related Targeted Therapy Against Human Cancer. **Vivechan international journal of**

research, v. 9, n. 1, p. 36–49, 2018.

PATHAK, B. R. et al. Cysteine-rich secretory protein 3 plays a role in prostate cancer cell invasion and affects expression of PSA and ANXA1. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 411, n. 1–2, p. 11–21, 2016.

PAYNE, S.; MILES, D. 1 Mechanisms of anticancer drugs. **Scott-Brown's Otorhinolaryngology: Head and Neck Surgery**, p. 34–46, 2008.

PELICANO, H.; CARNEY, D.; HUANG, P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. **Drug Resistance Updates**, v. 7, n. 2, p. 97–110, 2004.

PERAZELLA, M. A. Onco-nephrology: Renal toxicities of chemotherapeutic agents. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 7, n. 10, p. 1713–1721, 2012.

PÉREZ-AGUILAR, B. et al. Acetylcholinesterase is associated with a decrease in cell proliferation of hepatocellular carcinoma cells. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1852, n. 7, p. 1380–1387, 2015.

PETTY, A. J.; YANG, Y. Tumor-associated macrophages: implications in cancer immunotherapy. **Immunotherapy**, v. 9, n. 3, p. 289–302, 2017.

PFLAUM, J.; SCHLOSSER, S.; MÜLLER, M. p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. **Frontiers in oncology**, v. 4, p. 285, 2014.

PLENDERLEITH, I. H. Treating the treatment: toxicity of cancer chemotherapy. **Canadian Family Physician**, v. 36, n. OCT., p. 1827–1830, 1990.

PRAKASH, O. et al. Anticancer Potential of Plants and Natural Products: A Review. **American Journal of Pharmacological Sciences**, v. 1, n. 6, p. 104–115, 2013.

PRITCHETT, J. C.; NAESENS, L.; MONTOYA, J. Treating HHV-6 Infections: The Laboratory Efficacy and Clinical Use of Anti-HHV-6 Agents. The Laboratory Efficacy and Clinical Use of Anti-HHV-6 Agents. In: **Human Herpesviruses HHV-6A, HHV-6B, and HHV-7, Third Edition**. [s.l.] Elsevier B.V., 2014. p. 311–331.

PUTEROVÁ, Z.; KRUTOŠÍKOVÁ, A.; VÉGHÉ, D. Gewald reaction: Synthesis, properties and applications of substituted 2-aminothiophenes. **Arkivoc**, v. 2010, n. 1, p. 209–246, 2010.

QIAN, B.-Z.; POLLARD, J. W. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 39–51, 2010.

QUISPE-TINTAYA, W. et al. Bleomycin-induced genome structural variations in normal, non-tumor cells. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018.

- RAJABI, M.; MOUSA, S. A. The Role of Angiogenesis in Cancer Treatment. **Biomedicines**, v. 5, n. 2, 2017.
- RAKESH, K. et al. Anti-Cancer Activity of 2,4-Disubstituted Thiophene Derivatives: Dual Inhibitors of Lipoxigenase and Cyclooxygenase. **Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 5, p. 462–472, 2015.
- RAM, V. J. et al. Synthesis of thiophenes and thieno[3,2-c]pyran-4-ones as antileishmanial and antifungal agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 7, n. 24, p. 3101–3106, 1997.
- RAMJIAWAN, R. R.; GRIFFIOEN, A. W.; DUDA, D. G. Anti-angiogenesis for cancer revisited: Is there a role for combinations with immunotherapy? **Angiogenesis**, v. 20, n. 2, p. 185–204, 2017.
- RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, C. C. S.; CAVALHEIRO, É. T. G. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 1114–1120, 2006.
- RAMPAL, G. et al. Role of isothiocyanates as anticancer agents and their contributing molecular and cellular mechanisms. **Medicinal Chemistry & Drug Discovery**, v. 3, n. 2, p. 79–93, 2012.
- RANIERI, G. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) as a target of bevacizumab in cancer: from the biology to the clinic. **Current medicinal chemistry**, v. 13, n. 16, p. 1845–57, 2006.
- RATHMELL, J. C.; THOMPSON, C. B. Pathways of Apoptosis in Lymphocyte Development, Homeostasis, and Disease. **Cell**, v. 109, n. 2, p. S97–S107, 2002.
- RAVI, R. et al. Elimination of hepatic metastases of colon cancer cells via p53-independent cross-talk between irinotecan and Apo2 ligand/TRAIL. **Cancer Research**, v. 64, n. 24, p. 9105–9114, 2004.
- RAY, P. D.; HUANG, B.-W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular Signalling**, v. 24, n. 5, p. 981–990, 2012.
- REDZA-DUTORDOIR, M.; AVERILL-BATES, D. A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 12, p. 2977–2992, 2016.
- REED, J. C. Mechanisms of Apoptosis. **The American Journal of Pathology**, v. 157, n. 5, p. 1415–1430, 2000.
- RENZI, D.; VALTOLINA, M.; FORSTER, R. The evaluation of a multi-endpoint

- cytotoxicity assay system. **ATLA Altern.Lab**, v. 1, n. 1, p. 89–96, 1993.
- RICART, A. D. Drug-induced liver injury in Oncology. **Annals of Oncology**, v. 28, n. 8, p. 2013–2020, 2017.
- RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1458–1461, 2006.
- RICCIARDI, M. et al. Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) induced by inflammatory priming elicits mesenchymal stromal cell-like immune-modulatory properties in cancer cells. **British Journal of Cancer**, v. 112, n. 6, p. 1067–1075, 2015.
- 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.
- RIVERA, G. et al. Phase I clinical and pharmacokinetic study of 4'-(9-acridinylamino)-methanesulfon-m-anisidide in children with cancer. **Cancer research**, v. 40, n. 11, p. 4250–3, 1980.
- ROMAGNOLI, R. et al. Design, synthesis and biological evaluation of 3,5-disubstituted 2-amino thiophene derivatives as a novel class of antitumor agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 18, p. 5097–5109, 2014.
- ROMERO-LAORDEN, N.; CASTRO, E. Inherited mutations in DNA repair genes and cancer risk. **Current Problems in Cancer**, 2017.
- RUDOLF SANDMEIER, K. S. **Thiophene derivatives**, 1983. Disponível em: <<https://www.google.tl/patents/US4472425>>. Acesso em: 25 nov. 2017
- RYUNO, H.; NAGURO, I.; KAMIYAMA, M. ASK family and cancer. **Advances in Biological Regulation**, 2017.
- SABAA, M. et al. Anticancer activity of salicin and fenofibrate. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, p. 1–11, 2017.
- SAFARZADEH, E.; SANDOGHCHIAN SHOTORBANI, S.; BARADARAN, B. Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment. **Advanced pharmaceutical bulletin**, v. 4, n. Suppl 1, p. 421–7, 2014.
- SALEM, M. L.; ATTIA, Z. I.; GALAL, S. M. Acute inflammation induces immunomodulatory effects on myeloid cells associated with anti-tumor responses in a tumor mouse model. **Journal of Advanced Research**, v. 7, n. 2, p. 243–253, 2016.

- SALIMIAN RIZI, B.; ACHREJA, A.; NAGRATH, D. Nitric Oxide: The Forgotten Child of Tumor Metabolism. **Trends in Cancer**, v. 3, n. 9, p. 659–672, 2017.
- SÁNCHEZ, I. et al. Synthesis and biological evaluation of modified acridines: the effect of N- and O- substituent in the nitrogenated ring on antitumor activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 3, p. 340–352, 2006.
- SANTOS, J. et al. Th1-Biased Immunomodulation and In Vivo Antitumor Effect of a Novel Piperine Analogue. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 9, p. 2594–2616, 2018.
- SATO, K. et al. A third-generation bisphosphonate, minodronic acid (YM529), successfully prevented the growth of bladder cancer in vitro and in vivo. **British Journal of Cancer**, v. 95, n. 10, p. 1354–1361, 2006.
- SCHMIDT, A.; LIU, M. Recent Advances in the Chemistry of Acridines. **Advances in Heterocyclic Chemistry**, v. 115, p. 287–353, 2015.
- SEDDER, L. M. et al. Extreme lymphoproliferative disease and fatal autoimmune thrombocytopenia in FasL and TRAIL double-deficient mice. **Blood**, v. 115, n. 16, p. 3258–3268, 2010.
- SEIFRIED, H. E. et al. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, n. 9, p. 567–579, 2007.
- SENAPATI, S. et al. **Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance** *Signal Transduction and Targeted Therapy* Springer Nature, , 2018.
- SENTURK, E.; MANFREDI, J. J. p53 and cell cycle effects after DNA damage. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 962, p. 49–61, 2013.
- SERAFIM, V. D. L. **Síntese e Avaliação anti-Leishmania de novos derivados híbridos tiofênicos-acridínicos**. [s.l.] Universidade Federal da Paraíba, 2016.
- SERAFIM, V. D. L. et al. New Thiophene-Acridine Compounds: Synthesis, Antileishmanial Activity, DNA Binding, Chemometric and Molecular Docking Studies. p. 0–2, 2018.
- SHETH, K. R.; CLARY, B. M. Management of Hepatic Metastases from Colorectal Cancer. **Clinics in Colon and Rectal Surgery**, v. 18, n. 03, p. 215–223, 2005.
- SHIBUYA, M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-

- Angiogenic Therapies. **Genes & cancer**, v. 2, n. 12, p. 1097–105, 2011.
- SHIRATSUCHI, A. et al. Essential role of phosphatidylserine externalization in apoptosing cell phagocytosis by macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 246, n. 2, p. 549–555, 1998.
- SIAUCIUNAITE, R. et al. Evolution Shapes the Gene Expression Response to Oxidative Stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 12, p. 3040, 2019.
- SIDDIQUI, I. A. et al. Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1348, n. 1, p. 20–31, 2015.
- SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2013. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 63, n. 1, p. 11–30, 2013.
- SILVA-JÚNIOR, E. F. et al. Design, synthesis, molecular docking and biological evaluation of thiophen-2-iminothiazolidine derivatives for use against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 18, p. 4228–4240, 2016.
- SILVA, D. K. F. et al. Antitumor Effect of a Novel Spiro-Acridine Compound is Associated with Up-Regulation of Th1-Type Responses and Antiangiogenic Action. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 29, 2019.
- SILVA, C. T. DA; JASIULIONIS, M. G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 1, p. 38–42, 2014.
- SINGH, R.; LETAI, A.; SAROSIEK, K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 3, p. 175–193, 2019.
- SINGH, S. R. et al. Cancer stem cells: Recent developments and future prospects. **Cancer Letters**, v. 338, n. 1, p. 1–2, 2013.
- SIPES, N. S.; PADILLA, S.; KNUDSEN, T. B. Zebrafish-As an integrative model for twenty-first century toxicity testing. **Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews**, v. 93, n. 3, p. 256–267, 2011.
- SOARES, D. C. F. et al. Antitumoral activity and toxicity of PEG-coated and PEG-folate-coated pH-sensitive liposomes containing 159Gd-DTPA-BMA in Ehrlich tumor bearing mice. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 1–2, p. 58–64, 2012.
- 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.

SONG, Y.; YANG, J. M. Role of interleukin (IL)-17 and T-helper (Th)17 cells in cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 493, n. 1, p. 1–8, 2017.

SOTO, J. et al. Miltefosine for New World Cutaneous Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 9, p. 1266–1272, 2004.

SOULE, B. P. et al. **The chemistry and biology of nitroxide compounds**Free Radical Biology and Medicine, 2007.

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)**. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, 2019.

STEGER, F.; HAUTMANN, M. G.; KÖLBL, O. 5-FU-induced cardiac toxicity - an underestimated problem in radiooncology? **Radiation Oncology**, v. 7, n. 1, 2012.

STEWART, B. W. et al. **World cancer report 2014**. [s.l.] International Agency for Research on Cancer, 2014.

STORZ, P. Reactive oxygen species in tumor progression. **Frontiers in Bioscience**, v. 10, n. 1–3, p. 1881, 2005.

STURCHIO, E. et al. Gene expression and environmental exposure to xenobiotics: Overview and applications. **Giornale Italiano di Medicina del Lavoro ed Ergonomia**, v. 30, n. 2, p. 101–114, 2008.

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

SU, Z. et al. Th17 cell expansion in gastric cancer may contribute to cancer development and metastasis. **Immunologic Research**, v. 58, n. 1, p. 118–124, 2014.

SUDHAKAR, A. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. **Journal of cancer science & therapy**, v. 1, n. 2, p. 1–4, 2009.

SULPIZIO, C. et al. Synthesis, structure, and antioxidant activity of methoxy- and hydroxyl-substituted 2'-aminochalcones. **Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly**, v. 147, n. 10, p. 1747–1757, 2016.

SUN, J. et al. A systematic analysis of FDA-approved anticancer drugs. **BMC Systems Biology**, v. 11, n. S5, p. 87–104, 2017.

SZATROWSKI, T. P.; NATHAN, C. F. Production of Large Amounts of Hydrogen

Peroxide by Human Tumor Cells. **Cancer Research**, v. 51, n. 3, p. 794–798, 1991.

SZYMAŃSKI, P. et al. Novel tetrahydroacridine and cyclopentaquinoline derivatives with fluorobenzoic acid moiety induce cell cycle arrest and apoptosis in lung cancer cells by activation of DNA damage signaling. **Tumor Biology**, v. 39, n. 3, 2017.

TAKIMOTO, C. H.; CALVO, E. Principles of Oncologic Pharmacotherapy. 2007.

TALMADGE, J. E.; FIDLER, I. J. AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective. **Cancer Research**, v. 70, n. 14, p. 5649–5669, 2010.

TAO, M. et al. Inflammatory stimuli promote growth and invasion of pancreatic cancer cells through NF- κ B pathway dependent repression of PP2Ac. **Cell Cycle**, v. 15, n. 3, p. 381–393, 2016.

TAVARES, J. et al. Characterization of the anti-Leishmania effect induced by cisplatin, an anticancer drug. **Acta Tropica**, v. 103, n. 2, p. 133–141, 2007.

THOMAS, R. K. et al. High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer. **Nature Genetics**, v. 39, n. 3, p. 347–351, 2007.

THORN, C. F. et al. Doxorubicin pathways: Pharmacodynamics and adverse effects. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 21, n. 7, p. 440–446, 2011.

THYAGARAJAN, A.; SAHU, R. P. Potential Contributions of Antioxidants to Cancer Therapy: Immunomodulation and Radiosensitization. **Integrative Cancer Therapies**, v. 17, n. 2, p. 210–216, 2018.

TONG, H.; ISENRING, E.; YATES, P. The prevalence of nutrition impact symptoms and their relationship to quality of life and clinical outcomes in medical oncology patients. **Supportive Care in Cancer**, v. 17, n. 1, p. 83–90, 2009.

TONG, L. et al. Reactive oxygen species in redox cancer therapy. **Cancer Letters**, v. 367, n. 1, p. 18–25, 2015.

TOZER, G. M.; PRISE, V. E.; CHAPLIN, D. J. Inhibition of nitric oxide synthase induces a selective reduction in tumor blood flow that is reversible with L-arginine. **Cancer research**, v. 57, n. 5, p. 948–55, 1997.

UMANSKY, V.; SCHIRRMACHER, V. Nitric oxide-induced apoptosis in tumor cells. **Advances in cancer research**, v. 82, p. 107–31, 2001.

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.

VALDERRAMA, J. et al. Synthesis and in Vitro Antiprotozoal Activity of Thiophene Ring-Containing Quinones. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, n. 9, p. 1221–1226, 1999.

VAN DER VELDT, A. A. M. et al. Rapid decrease in delivery of chemotherapy to tumors after anti-VEGF therapy: implications for scheduling of anti-angiogenic drugs. **Cancer cell**, v. 21, n. 1, p. 82–91, 2012.

VAN GENDEREN, H. O. et al. Extracellular annexin A5: Functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1783, n. 6, p. 953–963, 2008.

VASUDEV, N. S.; REYNOLDS, A. R. Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. **Angiogenesis**, v. 17, n. 3, p. 471–494, 2014.

VENKATARAMAN, S. et al. Manganese superoxide dismutase overexpression inhibits the growth of androgen-independent prostate cancer cells. **Oncogene**, v. 24, n. 1, p. 77–89, 2005.

VENKATESAN, N.; RAMANATHAN, M. Preclinical Toxicity Studies-Tool of Drug Discovery. **Pharmacovigilance and Pharmacoepidemiology**, v. 1, p. 104, 2017.

VÉRAS OF AGUIAR, A. C. et al. Evaluation of the antiproliferative activity of 2-amino thiophene derivatives against human cancer cells lines. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 403–414, 2016.

VERMA, P. Nitric Oxide—An Important Biomolecule in Breast Carcinoma. **Research & Reviews: A Journal of Health Professions**, v. 8, n. 3, p. 55–59, 2018.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell proliferation**, v. 36, n. 3, p. 131–49, 2003.

VIEIRA, L. R. et al. Acute effects of Benzo[a]pyrene, anthracene and a fuel oil on biomarkers of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). **Science of the Total Environment**, v. 395, n. 2–3, p. 87–100, 2008.

VISCONTI, R.; DELLA MONICA, R.; GRIECO, D. Cell cycle checkpoint in cancer: A therapeutically targetable double-edged sword. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 35, n. 1, p. 1–8, 2016.

- WANG, G. et al. Th17 Cytokines and Barrier Functions. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, p. 1–2, 2016.
- WANG, H. et al. Mechanisms of verapamil-enhanced chemosensitivity of gallbladder cancer cells to platinum drugs: Glutathione reduction and MRP1 downregulation. **Oncology Reports**, v. 29, n. 2, p. 676–684, 2013a.
- WANG, H.; ZHANG, X. ROS reduction does not decrease the anticancer efficacy of X-Ray in two breast cancer cell lines. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.
- WANG, J. et al. Synthesis, structure-activity relationship and biological activity of acridine derivatives as potent MDR-reversing agents. **Current medicinal chemistry**, v. 20, n. 32, p. 4070–9, 2013b.
- WANG, J.; YI, J. Cancer cell killing via ROS: To increase or decrease, that is the question. **Cancer Biology & Therapy**, v. 7, n. 12, p. 1875–1884, 2008.
- WANG, M. et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 5, p. 761–773, 2017.
- WANG, Y. YI et al. Role of Reduced Nitric Oxide in Liver Cell Apoptosis Inhibition During Liver Damage. **Archives of Medical Research**, v. 49, n. 4, p. 219–225, 2018.
- WEI, H. et al. Type two cytokines predominance of human lung cancer and its reverse by traditional Chinese medicine TTMP. **Cellular & molecular immunology**, v. 1, n. 1, p. 63–70, 2004.
- WEINBERG, F.; RAMNATH, N.; NAGRATH, D. Reactive Oxygen Species in the Tumor Microenvironment: An Overview. **Cancers**, v. 11, n. 8, p. 1191, 2019.
- WEINLANDER, G. et al. Treatment of advanced colorectal cancer with doxorubicin combined with two potential multidrug-resistance-reversing agents: high-dose oral tamoxifen and dexverapamil. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 123, n. 8, p. 452–455, 1997.
- WEISS, R. B. The anthracyclines: Will we ever find a better doxorubicin? **Seminars in Oncology**, v. 19, n. 6, p. 670–686, 1992.
- WILLETT, W. C. Diet and cancer. **The oncologist**, v. 5, n. 5, p. 393–404, 2000.
- WILLIAMS, G. H.; STOEBER, K. The cell cycle and cancer. **The Journal of Pathology**, v. 226, n. 2, p. 352–364, 2012.
- WRZESINSKI, S. H.; WAN, Y. Y.; FLAVELL, R. A. Transforming Growth Factor- and the Immune Response: Implications for Anticancer Therapy.

Clinical Cancer Research, v. 13, n. 18, p. 5262–5270, 2007.

WU, J. New insights into the regulation of cell cycle. **Journal of molecular cell biology**, v. 10, n. 1, p. 1, 2018.

XIE, Y. et al. Cloning and characterization of a novel sigma-like glutathione S-transferase from the giant panda parasitic nematode, *Baylisascaris schroederi*. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 44–57, 2015.

XIONG, S.; XIAO, G. W. Reverting doxorubicin resistance in colon cancer by targeting a key signaling protein, steroid receptor coactivator. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 15, n. 4, p. 3751–3758, 2018.

XU, H. et al. Acetylcholinesterase overexpression mediated by oncolytic adenovirus exhibited potent anti-tumor effect. **BMC Cancer**, v. 14, n. 1, p. 1–11, 2014.

XU, X. et al. Expression of Th1- Th2- and Th17-associated cytokines in laryngeal carcinoma. **Oncology letters**, v. 12, n. 3, p. 1941–1948, 2016.

YADAV, L. 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 & Clinical Cancer Research**, v. 37, n. 1, p. 266, 2018.

YANG, H. T. et al. VEGF₁₂₁ - and bFGF-induced increase in collateral blood flow requires normal nitric oxide production. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 280, n. 3, p. H1097–H1104, 2001.

YANG, L.; ZHANG, Y. Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 10, n. 1, p. 58, 2017.

YANG, Y.; ZHU, Y.; XI, X. **Anti-inflammatory and antitumor action of hydrogen via reactive oxygen species** *Oncology Letters* Spandidos Publications, , 2018.

YARCHOAN, M. et al. Targeting neoantigens to augment antitumour immunity. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 4, p. 209–222, 2017.

YEH, C. L. et al. Effect of arginine on angiogenesis induced by human colon cancer: In vitro and in vivo studies. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, n. 6, p. 538–543, 2010.

YING, L.; HOFSETH, L. J. An emerging role for endothelial nitric oxide synthase in chronic inflammation and cancer. **Cancer Research**, v. 67, n. 4, p. 1407–1410,

2007.

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, J. et al. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1–18, 2016.

ZHANG, X. et al. Synaptic acetylcholinesterase targeted by microRNA-212 functions as a tumor suppressor in non-small cell lung cancer. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 45, n. 11, p. 2530–2540, 2013.

ZHAO, M. et al. Thiophene Derivatives as New Anticancer Agents and Their Therapeutic Delivery Using Folate Receptor-Targeting Nanocarriers. **ACS Omega**, v. 4, n. 5, p. 8874–8880, 2019.

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.

ZICHE, M.; MORBIDELLI, L.; MORBIDELLI, L. Molecular regulation of tumour angiogenesis by nitric oxide. **Eur. Cytokine Netw.**, v. 20, n. 4, p. 164–70, 2009.

Anexos

ANEXOS

ANEXO A - 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 **“Investigação da atividade antitumoral de novos derivados híbridos tiofênicos-acridínicos em linhagem de carcinoma ascítico de Ehrlich em camundongos Swiss”**, protocolo nº **093/2017** sob a responsabilidade da pesquisadora Dra. **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) em reunião de 05 de outubro de 2017.

Vigência do Projeto	2017 - 2021
Espécie/linhagem	Camundongo Swiss (<i>Mus musculus</i>)
Número de animais	474 animais
Idade/peso	6 – 8 semanas/ 25 - 32 g
Sexo	Fêmeas
Origem	Unidade de Produção Animal (UPA) do IPeFarM - UFPB

Profa. Dra. Islania Giselia Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da CEUA-UFPB

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



Universidade
Federal da
Paraíba



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

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

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

ANEXO C – Parecer da Comissão de Ética em Pesquisa para PBMC

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 DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Parcial

Detalhe:

Justificativa: O relatório é referente aos dados do trabalho "Toxicidade e atividade antitumoral de

Data do Envio: 28/11/2019

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.760.437

Apresentação da Notificação:

Bem apresentada

Objetivo da Notificação:

Bem definido

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Realizada

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

Está de acordo com as normas vigentes

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentou documento de recepção do relatório pelo Laboratório de Oncofarmacologia (OncoFar)

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: 3.760.437

do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

Recomendações:

nenhum

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O relatório parcial desta parte do projeto é válido e está aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Parcial	DECLARACAO_PPgPNSB.PDF	28/11/2019 19:18:26	MARIANNA VIEIRA SOBRAL CASTELLO BRANCO	Postado
Envio de Relatório Parcial	RELATORIO_PARCIAL_PBMC_CEP_2019.pdf	28/11/2019 19:18:57	MARIANNA VIEIRA SOBRAL CASTELLO BRANCO	Postado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JOAO PESSOA, 11 de Dezembro de 2019

Assinado por:

**Eliane Marques Duarte de Sousa
(Coordenador(a))**

Endereço: UNIVERSITARIO S/N

Bairro: CASTELO BRANCO

CEP: 58.051-900

UF: PB

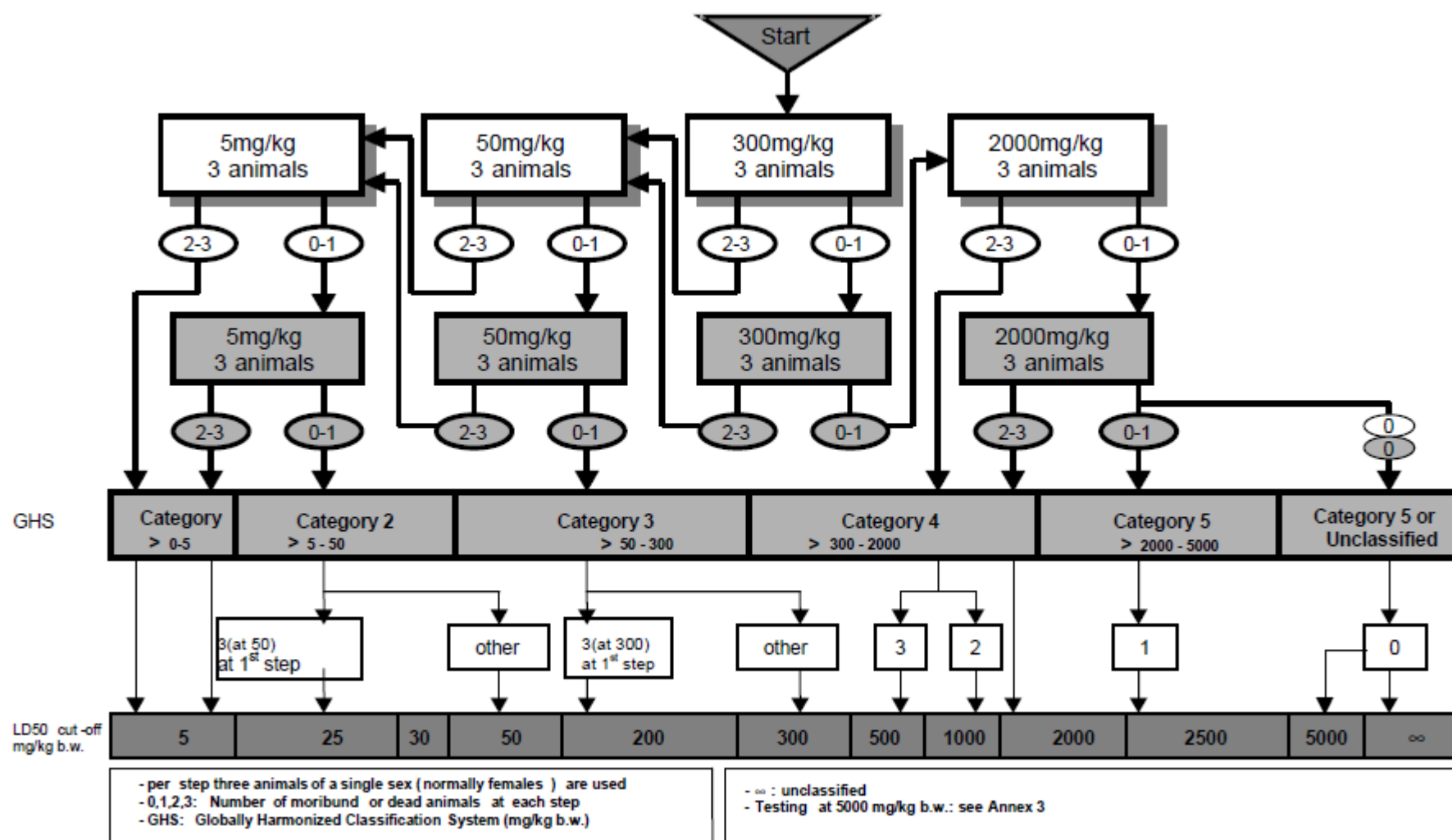
Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br

ANEXO D – Fluxograma de realização do teste de toxicidade aguda com uma dose inicial de 300 mg/kg.



Apêndice

Apêndice

APÊNDICE A - Artigos Publicados durante o Doutorado

Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 486 (2017) 22–31



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Experimental Marine Biology and Ecology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jembeEffects of salinity on the immune system cells of the tropical sea urchin *Echinometra lucunter*Thaís Bezerra Mangeon Honorato^a, Raianna Boni^a, Patrícia Mirella da Silva^b, Luis Fernando Marques-Santos^{a,*}^a Laboratório de Biologia Celular e do Desenvolvimento (LABID), Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil^b Laboratório de Imunologia e Patologia de Invertebrados (LABIFI), Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 February 2016

Received in revised form 20 September 2016

Accepted 23 September 2016

Available online xxxxx

Keywords:

Salinity

Sea urchin

Immune system

Phagocytosis

ROS

ABC transporter

ABSTRACT

Human activities have caused climate changes and altered the salinity of the oceans. The reduction of the salinity is one of the factors that may limit the distribution and the survival of marine organisms. Coelomocytes are the immune system cells of the echinoderms and have been studied as biomarkers of stress. The aim of the present study was to investigate the effect of the salinity on the immune system cells of the tropical sea urchin *Echinometra lucunter*. Animals were collected in João Pessoa coast (Brazilian Northeast). Animals or coelomocytes were exposed to different salinities (25, 35, 45) from 4 to 24 h. Phagocytic parameters, production of reactive oxygen species (ROS), mitochondrial activity and ABC transporter activity were analyzed. The phagocytic parameters did not change when animals or cells were exposed to a salinity of 25 or 45 in any time intervals monitored. However, the coelomocytes concentration increased when animals were exposed to the lower salinity. The levels of ROS were higher when cells were incubated at a salinity of 25 but lower when cells were kept at a salinity of 45. It was observed the loss of the mitochondrial inner membrane potential when coelomocytes were incubated at a salinity of 45. The activity of ABC transporters decreased when cells were incubated at the lowest salinity and increased when cells were incubated at the highest salinity tested. The present work shows that the immune system of the tropical sea urchins *E. lucunter* tolerates salinity changes from 25 to 45, and suggests two cellular parameters (ROS levels and ABC transporters activity) as potential biomarkers for the monitoring of the impact of environmental salinity changes.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Deuterostome invertebrates have developed a variety of immune responses against foreign pathogens and molecules (Gross et al., 1999). The genomic sequencing of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* revealed that these animals have a robust immune system which is comprised by a vast repertoire of genes involved in the innate recognition of pathogen molecules (Sodergren et al., 2006). The main mechanisms of immune defense against infectious agents used by the most of the invertebrates are: a) synthesis and secretion of proteins/molecules with recognition, neutralizing or lytic activity, which participate in nodule formation; b) encapsulation, phagocytosis of foreign particles and cell lysis (Cervello et al., 1996; Gerardi et al., 1990; Li et al., 2014; Loker et al., 2004; Majeske et al., 2013; Stabili et al., 1996; Tahseen, 2009).

In echinoderms, the immune response is divided into humoral (mediated by molecules present in the body fluids) and cellular (cell mediated). The cells responsible for the innate immunity are known as coelomocytes. The coelomocytes are found in the coelomic perivisceral cavity, vascular water system, circulatory system, connective tissue and the tissues of various organs (Tahseen, 2009); and consist of four subpopulations: phagocytes; vibratile cells; red spherule cells and colorless spherule cells (Johnson, 1969). The phagocytes are involved in cell migration and phagocytosis, and represent the major subpopulation of coelomocytes. Phagocytosis is a mechanism in which immune cells migrate to the infected site, recognize, ingest and destroy the foreign particle (inert or alive) and is the main immune defense mechanism of the marine invertebrates (Ellis et al., 2011). Several phagocytic receptors, such as Toll-like receptors and scavengers receptors, are responsible for the phagocytic process in the specialized cells (Aderem and Underhill, 1999). It is estimated that about 4 to 5% of the genes in the genome of *S. purpuratus* are directly involved with the immune system (Hibino et al., 2006).

The production of reactive oxygen species (ROS) is a cellular process associated with phagocytosis and the response to the stress (Buggé et al., 2007; Coteur, 2004; Forman and Torres, 2002; Lesser, 2006). The reactive oxygen species are produced during phagocytosis to destroy the internalized particles (Forman and Torres, 2002). The process begins

Abbreviations: ROS, reactive oxygen species; FSW, filtered seawater; ASW, artificial seawater; M.F.I., mean of fluorescence intensity; LB, latex beads; MK, MK-571; Rev, reversin 205; $\Delta\psi_m$, mitochondrial inner membrane potential.

* Corresponding author at: Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, Cidade Universitária, CEP: 58051-900, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

E-mail address: marques@df.ufpb.br (L.F. Marques-Santos).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2016.09.012>

0022-0981/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

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

¹ 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.); thaismangeon@gmail.com (T.M.H.L.); rafaelcarlos@lft.ufpb.br (R.C.F.); ana.lopes0407@gmail.com (A.L.d.O.L.); sandra@cbiotec.ufpb.br (S.R.-M.)

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

³ Department of Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB 58051-970, Brazil; mirella_dasilva@hotmail.com

⁴ Post Graduation Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, PE 50670-901, Brazil; miguelsssegundo@gmail.com

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

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

⁷ 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. LD₅₀ (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 β , TNF- α , 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

Communication

Toxicity and Antitumor Activity of a Thiophene–Acridine Hybrid

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

¹ 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@lff.ufpb.br (R.F.); camyla.andrade03@gmail.com (C.A.); ana.lopes0407@gmail.com (A.L.L.); hemersoniury@gmail.com (H.M.)

² 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.)

³ 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.)

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

⁵ 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, $IC_{50} = 23.11 \pm 1.03 \mu M$). In zebrafish embryos, ACS03 induced an increase in lactate dehydrogenase, glutathione S-transferase, and acetylcholinesterase activities. The LD₅₀ (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