

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

VALGRÍCIA MATIAS DE SOUSA

Potencial antitumoral e toxicidade do (*E*)-1'-((4-bromo-benzilideno)amino)5'-oxo-1'5'-dihidro-10*H*-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-19), um novo derivado espiro-acridínico

JOÃO PESSOA - PB

2020

VALGRÍCIA MATIAS DE SOUSA

Potencial antitumoral e toxicidade do (*E*)-1'-((4-bromo-benzilideno)amino)5'-oxo-1'5'-dihidro-10*H*-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-19), um novo derivado espiro-acridínico

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

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães

JOÃO PESSOA – PB

2020

Catálogo na Publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S725p Sousa, Valgrícia Matias de.
Potencial antitumoral e toxicidade do (E)-1'-((4-bromo-benzilideno)amino)5'-oxo-1'5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-19), um novo derivado espiro-acridínico / Valgrícia Matias de Sousa. - João Pessoa, 2020.
90 f. : il.

Orientação: Hemerson Iury Ferreira Magalhães.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Farmacologia. 2. Compostos espiro-acridínicos.
3. Atividade antitumoral. 5. Citotoxicidade. I. Magalhães, Hemerson Iury Ferreira. II. Título.

UFPB/BC

CDU 615

VALGRÍCIA MATIAS DE SOUSA

Potencial antitumoral e toxicidade do (E)-1'-((4-bromo-benzilideno)amino)5'-oxo-1'5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-19), um novo derivado espiro-acridínico

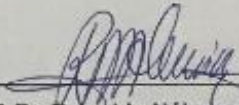
APROVADA EM 28 10 2020

COMISSÃO EXAMINADORA



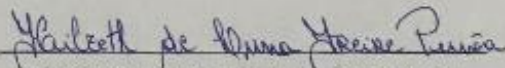
Prof. Dr. Hémerston Iury Ferreira Magalhães

Orientador



Prof. Dr. Renaldo Nóbrega de Almeida

Membro interno



Prof. Dr. Hílzeth de Luna Freire Pessoa

Membro externo

*Aos meus pais, José Agrício de Sousa Filho e Josivalda
Matias de Sousa, por todo incentivo, amor e carinho
em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelas bênçãos recebidas, sonhos e conquistas alcançados, e por sua fidelidade e amor, sempre estando ao meu lado me conduzindo pelos melhores caminhos.

Aos meus pais, **José Agrício Filho** e **Josivalda Sousa**, que sonharam o meu sonho, e por serem meus alicerces, e inspiração de fé e sabedoria. Obrigada por todos os ensinamentos, que me fizeram querer ser uma pessoa melhor, e por compreender e apoiar minhas escolhas, sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis, sendo meu consolo e porto seguro. Agradeço à Deus por ter me concebido pais maravilhosos.

Aos meus irmãos, **Adiel Agrício** e **Agrício Neto**, que sempre estiveram ao meu lado nas conquistas e nas dificuldades. Pela amizade e união, por todas as palavras de carinho e pelo apoio diário. Obrigada por serem meus melhores amigos para todas as horas.

Aos meus avós, **Maria do Livramento** e **Agrício Souza** (*in memorian*), **Joana Maia** e **Pedro Maia** (*in memorian*), por me ensinarem que a felicidade está nas coisas mais simples da vida, nos pequenos gestos de amor e atenção. Obrigado pelos conselhos e pelas orações.

À minha família como um todo por estar sempre presente em todos os meus momentos.

Ao meu “Grupinho”, **Alzimary**, **Bianca**, **Nayara**, **Namibia** e **Thaynara**, por serem muito mais que amigas, irmãs, uma apoiando a outra em todos os momentos. Sou grata a Deus pela vida de cada uma, e por tornarem meus dias mais felizes.

Ao meu orientador, **Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães** por todos os ensinamentos passados, pela paciência e dedicação.

A professora **Dra. Marianna Vieira Sobral** por todo apoio e incentivo diário, e por toda contribuição de conhecimentos compartilhados e pelas discussões enriquecedoras ao longo do mestrado.

Ao professor **Ricardo** pelo fornecimento da molécula para ser testada no mestrado.

Aos professores **Reinaldo Nóbrega de Almeida e Hilzeth de Luna Freire Pessoa** pela disponibilidade e gentileza de participar da avaliação deste trabalho.

Aos meus amigos da pós-graduação do Laboratório de Oncofarmacologia (OncoFar), **Rafael, Rawny, Camyla, Ana Luiza, Sâmia, Thaís, Renata e Ana Paula** pelo apoio, torcida e força nos momentos difíceis, e por estarem sempre ao meu lado durante essa trajetória. E em especial, a minha amiga **Daiana** por todos os ensinamentos, pelo carinho e amizade, e por ter me acolhido tão bem. Agradeço também, ao Professor **Dr. Juan Carlos Gomes Gonçalves** e aos alunos de iniciação científica, **Paulo Bruno, Moisés, Ramon, Junior e Karine**, pela torcida e incentivo!

À minha **turma de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB)**, pelos diálogos e conhecimentos partilhados durante esse período.

Às minhas amigas **Gleice e Marina** pela amizade, carinho e risadas, e por toda paciência e companheirismo durante os estudos, obrigada por estarem sempre comigo!

Aos **professores do PPgPNSB**, que me instruíram com dedicação todos os conhecimentos durante o mestrado. Obrigado por serem exemplos de profissionais.

Ao funcionário **Seu Josué** pela torcida e carinho constante!

A todos os funcionários do IPeFarM e as secretárias da Pós-graduação **Caroline e Nilmar** pelo apoio e serviços prestados.

A **Fátima** do Laboratório Cardiovascular pela disponibilidade e ajuda.

A **Universidade Federal da Paraíba**, pela contribuição no meu desenvolvimento profissional.

A **CAPES** pelo apoio financeiro.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

Valgrícia Sousa

SOUSA, V. M. Potencial antitumoral do (*E*)-1'-((4-bromo-benzilideno)amino)5'-oxo-1'5'-dihidro-10*H*-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-19), um novo derivado espiro-acridínico 2020. 90 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB/ CCS, João Pessoa.

RESUMO

O câncer é um termo utilizado para definir um grupo de doenças caracterizadas pela proliferação descontrolada de células transformadas, provenientes do acúmulo progressivo de alterações genéticas e epigenéticas. Diversos problemas na terapia do câncer, como desenvolvimento de resistência ao tratamento e alta toxicidade, impulsionam a busca por novos fármacos. Nesse contexto, destacam-se os compostos acridínicos que apresentam relatos de atividade antitumoral associada, principalmente, à intercalação no DNA e inibição de topoisomerases. O objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade de derivados espiro-acridínicos em células tumorais e não tumorais, bem como os possíveis mecanismos de ação do composto mais promissor, na linhagem tumoral mais sensível. A citotoxicidade dos compostos foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT em linhagens de células tumorais (HCT-116, MCF-7, HeLa, PC-3 e SK-MEL-28) e não tumorais (HaCat e L929), bem como em células mononucleares de sangue periférico (PBMC). O 5'-oxo-1'-((4-(piperidina-1-il) benzilideno)amino)-1',5'- dihidro-10*H*-espiro[acridina- 9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-23) induziu o menor percentual de inibição do crescimento em células tumorais PC-3 ($0 \pm 0,85\%$), e em células não tumorais L929 ($11,93 \pm 1,91\%$). O composto mais citotóxico foi o (*E*)-1'-((4-bromo-benzilideno)amino)5'-oxo-1'5'-dihidro-10*H*-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-19), que inibiu o crescimento de células de carcinoma colorretal HCT-116 em $88,56 \pm 0,58\%$, e de células não tumorais L929 em $70,42 \pm 1,74\%$. A concentração que inibe 50% do crescimento celular (CI_{50}) foi de $10,35 \pm 1,66 \mu\text{M}$ em células HCT-116, e $4,89 \pm 1,18 \mu\text{M}$ em PBMC, após tratamento de 72 horas com AMTAC-19. A análise do índice de seletividade mostrou que este acridínico apresenta um efeito mais seletivo em células HCT-116, quando comparado com a droga padrão doxorrubicina. Na sequência, foram avaliados os efeitos de AMTAC-19 sobre o ciclo celular, a indução de apoptose e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), nas concentrações de 10 ou 20 μM , após 48 horas de tratamento. AMTAC-19 induziu aumento significativo do pico sub-G1 ($p < 0,05$), que está associado a apoptose, bem como parada nas fases S e G2/M ($p < 0,05$), impedindo a síntese do material genético e a multiplicação celular. Foi observado aumento da marcação com anexina V e iodeto propídeo ($p < 0,05$), o que é indicativo de morte celular por apoptose. Alterações morfológicas características de apoptose foram observadas após tratamento com AMTAC-19 por meio de análise em microscopia confocal a laser utilizando laranja de acridina e iodeto de propídeo. Tais alterações incluíram a presença de *blebs* de membrana, fragmentação do DNA e condensação da cromatina, o que confirma a presença de células apoptóticas. Além disso, AMTAC-19 reduziu a produção de espécies reativas de oxigênio ($p < 0,05$) em células HCT-116, o que sugere que o efeito antioxidante é parte do mecanismo de ação antitumoral do composto. Os dados apresentados indicam que AMTAC-19 induz atividade antitumoral em células HCT-116 por interferir na progressão do ciclo celular e induzir apoptose e efeito antioxidante.

Palavras-chave: Compostos acridínicos. Compostos espiro-acridínicos, Carcinoma colorretal humano. Atividade antitumoral. Citotoxicidade. Apoptose.

SOUSA, V. M. Antitumor potential of (E)-1'-((4-bromo-benzylidene) amino) 5'-oxo-1'5'-dihydro-10H-spiro[acridine-9,2'-pyrrole]-4'-carbonitrile (AMTAC-19), a new spiro-acridine derivative 2020. 90 f. Dissertation (Master in Natural and Bioactive Synthetic Products) - UFPB / CCS, João Pessoa.

ABSTRACT

Cancer is a term used to define a group of diseases characterized by the uncontrolled proliferation of transformed cells, resulting from the progressive accumulation of genetic and epigenetic changes. Several problems in cancer therapy, such as the development of resistance to treatment and high toxicity, drive the search for new drugs. In this context, acridine compounds that have reports of antitumor activity, mainly associated with DNA intercalation and inhibition of topoisomerases, stand out. The objective of this work was to evaluate the cytotoxicity of spiro-acridine derivatives in tumor and non-tumor cells, as well as the possible mechanisms of action of the most promising compound, in the most sensitive tumor line. The cytotoxicity of the compounds was evaluated by the MTT reduction assay in tumor cell lines (HCT-116, MCF-7, HeLa, PC-3 and SK-MEL-28) and non-tumor cells (HaCat and L929), as well as in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). 5'-oxo-1'-((4-(piperidine-1-yl) benzylidene) amino)-1', 5'-dihydro-10H-spiro [acridine-9,2'-pyrrole]-4'- carbonitrile (AMTAC-23) induced the lowest percentage of growth inhibition in PC-3 tumor cells ($0 \pm 0.85\%$), and in non-tumoral L929 cells ($11.93 \pm 1.91\%$). The most cytotoxic compound was (E)-1'-((4-bromo-benzylidene) amino) 5'-oxo-1'5'-dihydro-10H-spiro [acridine-9,2'-pyrrole]-4'-carbonitrile (AMTAC-19), which inhibited the growth of HCT-116 colorectal carcinoma cells by $88.56 \pm 0.58\%$, and of non-tumoral L929 cells by $70.42 \pm 1.74\%$. The concentration that inhibits 50% of cell growth (CI_{50}) was $10.35 \pm 1.66 \mu\text{M}$ in HCT-116 cells, and $4.89 \pm 1.18 \mu\text{M}$ in PBMC, after 72 hours of treatment with AMTAC-19. The analysis of the selectivity index showed that this acridine has a more selective effect on HCT-116 cells, when compared to the standard drug doxorubicin. Then, the effects of AMTAC-19 on the cell cycle, the induction of apoptosis and the production of reactive oxygen species (ROSs), in concentrations of 10 or 20 μM , were evaluated after 48 hours of treatment. AMTAC-19 induced a significant increase in the sub-G1 peak ($p < 0.05$), which is associated with apoptosis, as well as stopping in phases S and G2 / M ($p < 0.05$), preventing the synthesis of genetic material and cell multiplication. An increase in staining with annexin V and propidium iodide ($p < 0.05$) was observed, which is indicative of cell death due to apoptosis. Characteristic morphological changes of apoptosis were observed after treatment with AMTAC-19 by means of laser confocal microscopy analysis using acridine orange and propidium iodide. Such changes included the presence of membrane blebs, DNA fragmentation and chromatin condensation, which confirms the presence of apoptotic cells. In addition, AMTAC-19 reduced the production of reactive oxygen species ($p < 0.05$) in HCT-116 cells, which suggests that the antioxidant effect is part of the compound's anti-tumor mechanism of action. The data presented indicate that AMTAC-19 induces antitumor activity in HCT-116 cells by interfering with the progression of the cell cycle and inducing apoptosis and antioxidant effect.

Keywords: Acridinic compounds. Spiro-acridine compounds, Human colorectal carcinoma. Antitumor activity. Cytotoxicity. Apoptosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas da carcinogênese.....	24
Figura 2. Características biológicas do câncer.....	25
Figura 3. Progressão do ciclo celular.....	27
Figura 4. Vias da apoptose.....	30
Figura 5. Estruturas dos compostos espiro-acridínicos.....	39
Figura 6. Efeito de AMTAC-19* e doxorubicina** sobre a viabilidade de células da linhagem HCT-116 após 72 e 48 horas de tratamento.....	54
Figura 7. Efeito de AMTAC-19* e doxorubicina** sobre a viabilidade de células da linhagem não tumoral HaCat após 72 horas de tratamento.....	55
Figura 8. Efeito de AMTAC-19* e DXR** sobre a viabilidade de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) após 72 horas de tratamento.....	56
Figura 9. Efeito de AMTAC-19* (10 e 20 µM) e DXR** (2,5 µM) sobre a progressão do ciclo celular após 48 horas de tratamento.....	58
Figura 10. Efeito de AMTAC-19* e DXR** sobre a marcação com anexina V/IP em células HCT-116 após 48 horas de tratamento.....	59
Figura 11. Imagens representativas de células HCT-116 marcadas com LA/IP após 48 horas de tratamento com AMTAC-19* e DXR**.....	61
Figura 12. Imagens representativas ampliadas de células HCT-116 marcadas com LA/IP após 48 horas de tratamento com AMTAC-19* e DXR**.....	62
Figura 13. Efeito do AMTAC-19* (10 ou 20 µM) na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) após 48 horas de tratamento.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Citotoxicidade dos compostos espiro-acridínicos frente linhagens de células tumorais e não tumorais pelo ensaio de MTT após 72 horas de exposição.....	53
Tabela 2. Valores de CI50 (μM) de AMTAC-19* e doxorubicina** em células HCT-116, HaCat e PBMC, após 72 h de tratamento	57

LISTA DE ESQUEMA

Esquema 1. Via sintética para obter compostos espiro-acridínicos.....	44
--	----

LISTA DE QUADRO

Quadro 1. Características biológicas do câncer.....	26
Quadro 2. Linhagens de células tumorais e não tumorais <i>in vitro</i>	45

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

5-FU	5-fluorouracila
AMTAC-19	(<i>E</i>)-1'-((4-bromo-benzilideno)amino)5'-oxo-1'5'- dihidro-10 <i>H</i> -espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila
ANOVA	Análise de Variância
APAF1	Fator de ativação de protease associada à apoptose 1
ATP	Adenosina Trifosfato
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CDK	Cinase Ciclina-Dependentes
CI50	Concentração que produz 50% de inibição no crescimento celular
DCFH-DA	Fluoróforo 2',7'-diacetato diclorofluoresceína
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DXR	Doxorrubicina
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
e.p.m.	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
HaCaT	Linhagem celular não tumoral de queratinócito humano
HCT-116	Linhagem celular de carcinoma colorretal humano
HeLa	Linhagem celular de colo do útero humano
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
IP	Iodeto de propídio
IPeFarM	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
IS	Índice de seletividade
L929	Linhagem celular não tumoral de fibroblastos murinos
LA	Laranja de acridina
m-AMSA	Amsacrina

mAb	Anticorpos monoclonais
MCF-7	Linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano
MDA-MB-231	Linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico humano
PBS	Solução tampão fostato
PC-3	Linhagem celular de carcinoma de próstata humano
PPgPNSB	Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Rb	Retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SK-MEL-28	Linhagem celular de melanoma humano
TNF	Fator de necrose tumoral
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VEGFR	Receptor do fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
2.1 Aspectos gerais do câncer	21
2.2 O controle do ciclo celular e apoptose	26
2.3 Estresse oxidativo no contexto do câncer	32
2.4 Terapia do câncer	34
2.5 Derivados acridínicos	36
3 OBJETIVOS	41
3.1 Objetivo geral	41
3.2 Objetivos específicos	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 Local da pesquisa	43
4.2 Material	43
4.2.1 Amostras teste	43
4.2.2 Linhagens de células tumorais e não tumorais	44
4.2.3 Obtenção das células mononucleares de sangue periférico (PBMCs).....	46
4.3 Métodos	46
4.3.1 Avaliação da citotoxicidade em células tumorais e não tumorais.....	46
4.3.2 Investigação de mecanismos de ação antitumoral <i>in vitro</i>	48
4.4 Análise estatística	50
5 RESULTADOS	52
5.1 Avaliação da citotoxicidade de compostos acridínicos em linhagens de células tumorais e não tumorais.....	52
5.2 Avaliação dos efeitos de AMTAC-19 sobre a viabilidade de células tumorais e não tumorais	53
5.3 Investigação do mecanismo de ação antitumoral <i>in vitro</i>	57

5.3.1 Avaliação dos efeitos de AMTAC-19 sobre o ciclo celular	57
5.3.2 Avaliação do mecanismo de morte celular (apoptose/necrose)	59
5.3.3 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio	62
6 DISCUSSÃO	65
7 CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS	76
ANEXOS	89

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O câncer é caracterizado especialmente pela produção rápida de células transformadas, provenientes do acúmulo progressivo de alterações genéticas e epigenéticas. Tais alterações produzem modificação na expressão ou função de genes-chave para a manutenção da homeostasia celular, levando a transformação progressiva de células normais em derivados malignos, que passam a não mais responder aos sinais de controle de proliferação, diferenciação e morte celular (TAN; LE, 2018). No câncer, as células tumorais compartilham várias características, dentre estas, a proliferação sustentada, a resistência à apoptose e propriedades de invasão e metástase (HANAHAN, 2014).

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que a incidência global do câncer aumenta constantemente, sendo considerada a segunda causa de morte no mundo, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares (YASHIN; STALLARD; LAND, 2016).

Em relação ao tratamento, várias alternativas podem ser utilizadas, como cirurgia, imunoterapia, terapia alvo, quimioterapia e radioterapia, podendo ser utilizadas isoladamente ou em combinação (PAJUELO-LOZANO et al., 2018). Essas terapias convencionais são muitas vezes ineficazes na cura da doença, especialmente pelo desenvolvimento de resistência por parte das células tumorais, além de produzirem efeitos indesejáveis graves, que compilam para uma série de limitações frequentemente observadas no tratamento dessa doença (GAO et al., 2014). Dessa forma, a pesquisa e o desenvolvimento de novos medicamentos antineoplásicos com maior eficiência e menor toxicidade são crescentes no mundo inteiro.

Dentro das possibilidades de novos compostos com potencial anticâncer se inserem as acridinas, que são compostos aromáticos policíclicos com estrutura planar (GOUVEIA et al., 2018). Esses compostos são formados por dois anéis fundidos a um anel de piridina em uma posição central, conhecido por denominações como: dibenzo-piridina, 10-azaaantraceno, 2,3-dibenzoquinolina, 2,3,4,6-dibenzopiridina, entre outras (SCHMIDT; LIU, 2015).

Os derivados acridínicos são compostos promissores no tratamento do câncer, seu mecanismo de ação envolve a intercalação entre os pares de bases de ácidos nucleicos no DNA de fita dupla em virtude da sua estrutura planar (GAO et al., 2015),

e, ainda, a inibição das enzimas topoisomerases, interferindo nas suas funções celulares (ALMEIDA et al., 2016; FELIP-LEÓN et al., 2018). A amsacrina (m-AMSA) é o derivado acridínico mais conhecido e utilizado na clínica por exercer atividade contra leucemias e linfomas (DE ALMEIDA et al., 2017; SALEM et al., 2017).

Vislumbrando o potencial farmacológico de derivados acridínicos no tratamento do câncer, e na busca por compostos mais efetivos e mais seletivos para as células tumorais, foram sintetizadas diferentes moléculas com alterações estruturais na molécula de acridina (ZHOU et al., 2018). Nesse sentido, a síntese de derivados acridínicos permitiu a caracterização de diferentes compostos, dentre estes, o (*E*)-1'-((4-bromo-benzilideno)amino)5'-oxo-1'5'-dihidro-10*H*-espiro [acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-19), o qual não possui relatos na literatura de descrição química ou de atividade biológica.

Diante desse contexto, o presente trabalho objetiva contribuir para a pesquisa científica no que se refere à investigação dos efeitos do AMTAC-19, um derivado acridínico inédito, por meio da avaliação da citotoxicidade em células tumorais e não tumorais, investigando os possíveis mecanismos de ação dessa molécula, relacionado com seu efeito no ciclo celular, na produção de espécies reativas de oxigênio e na indução de apoptose.

Fundamentação Teórica

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Aspectos gerais do câncer

As células, unidades estruturais e funcionais dos seres vivos, proliferam por meio de mitoses para formar os tecidos de maneira gradual. A regulação e a homeostasia da proliferação celular ocorre por meio do gerenciamento na produção de fatores promotores ou inibidores do crescimento, necessários para obter um controle eficiente no número de células, na arquitetura e na função dos tecidos (MANASA; KANNAN, 2017). Além disso, a homeostasia da proliferação celular é essencial para garantir a regulação de respostas imunes e o reparo tecidual, respondendo às necessidades específicas do organismo (WANG et al., 2016; YANG et al., 2017).

Em contrapartida, as células que sofrem alterações genéticas (como quebra da dupla fita e substituição ou deleção de uma ou mais bases) e/ou epigenéticas (como metilação, acetilação ou fosforilação e modificações nas histonas) apresentam uma desregulação na integridade genômica, e ativam constitutivamente vias de sinalização envolvidas na tumorigênese (SEVER; BRUGGE, 2015). Isso permite às células escaparem da homeostase e dos controles que normalmente suprimem a proliferação desordenada e inibem a sobrevivência de células modificadas (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Essas vias controlam o crescimento celular, motilidade, metabolismo celular, morte celular e microambiente tumoral (HISADA; MACKMAN, 2019).

A desregulação da sinalização celular permite a proliferação e crescimento de células indiferenciadas que associadas a mutações leva ao processo de alterações morfológicas, que permite que as células adquiram características específicas que as diferem das células saudáveis, transformando em células especializadas designadas de tumor, que pode ser classificado como benigno ou maligno (TODORIC; KARIN, 2019).

Ambos os tipos de tumores perdem a capacidade de diferenciação celular, estrutural e funcional possibilitando a distinção das células normais (ROBERTSON, 2014). Os tumores benignos e malignos envolvem mutações nos oncogenes (Ras) e

nos genes supressores tumorais (p53) que permitem o desenvolvimento exacerbado e ilimitado de células (DOELLO, 2018).

Nos tumores benignos, essas alterações geralmente promovem progressão e proliferação de células, formando uma massa com morfologia semelhante à do tecido de origem, de crescimento lento e com organização celular. Apesar de não invadirem os tecidos vizinhos, podem comprimir os órgãos e tecidos adjacentes (YASMIN et al., 2015). São exemplos de tumores benignos, os lipomas, os miomas e os adenomas, que tem origem no tecido adiposo, no músculo liso do miométrio e em glândulas, respectivamente (KOGURE et al., 2017).

Por outro lado, os tumores malignos apresentam morfologia anormal em comparação ao tecido de origem, são de crescimento rápido, possuem desorganização celular e a capacidade de se disseminar pela corrente sanguínea ou linfática, invadindo os tecidos adjacentes ou distantes, em uma sequência de eventos denominado de metástase (DE LA HOZ POLO et al., 2017).

Os tumores malignos, ou câncer, podem ser classificados de acordo com seu tecido de origem. Os cânceres que se desenvolvem a partir de células epiteliais de revestimento, presentes em órgãos como pele, fígado, pulmão e pâncreas, são denominados carcinomas (KOENE et al., 2016). Se o tecido epitelial for glandular o tumor maligno é denominado de adenocarcinoma. Células que constituem o tecido conjuntivo, como miócitos, adipócitos, fibroblastos e osteoblastos, quando passam por uma transformação neoplásica, desenvolvem os sarcomas. Já a partir das células do tecido hematopoiético (células brancas e plasmócitos) pode se desenvolver leucemia, linfoma e mieloma (SEVER; BRUGGE, 2015).

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) exibem que a incidência e a mortalidade global do câncer aumentam significativamente, sendo considerada a primeira ou a segunda causa de morte no mundo do século XXI. Sendo assim, o câncer é considerado um grave problema socioeconômico e de saúde pública, que envolve fatores relacionados ao crescimento e ao envelhecimento populacional (BRAY 2018).

O aumento na incidência de casos de câncer diagnosticados difere entre os países, e pode ser baseado no índice de desenvolvimento socioeconômico, fatores sociais e estilo de vida da população (BRAY et al., 2018), com estimavas para o ano de 2040 de mais 26 milhões de novos casos em todo o mundo (WILSON et al., 2019).

Dados da OMS, 8,8 milhões de pessoas morrem de câncer a cada ano, sendo a maioria em países de baixa e média renda (OMS, 2020).

De acordo com os dados obtidos do Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde (SIS/SUS) da Plataforma DATASUS-NET do Ministério da Saúde, no Brasil em 2019, no período de janeiro à setembro, foram realizadas 806.682 internações por câncer, destas 339.860 homens e 466.822 mulheres, destacando-se a região Sudeste 353.718 (43,85%) com maior índice de internações (DATASUS, 2020). Segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), o Brasil terá 625 mil novos casos de câncer a cada ano do triênio 2020-2022, sendo o câncer de pele não melanoma (177 mil casos novos) o mais incidente na população, depois separados por sexo, os mais frequentes entre os homens são: próstata (65.840 novos casos), pulmão (20.520 novos casos) e colorretal (17.760 novos casos). Já nas mulheres, estima-se alta de incidência de câncer de mama (66.280 novos casos), colorretal (20.470 novos casos), colón do útero (16.590 novos casos) e pulmão (12.440 novos casos) (INCA, 2020). No contexto do número de óbitos, ainda segundo a plataforma DATASUS-NET, foram registrados 65.605 em todo o Brasil em 2019, no período de janeiro à novembro, equivalente à 8,13% do total de internações (DATASUS, 2020).

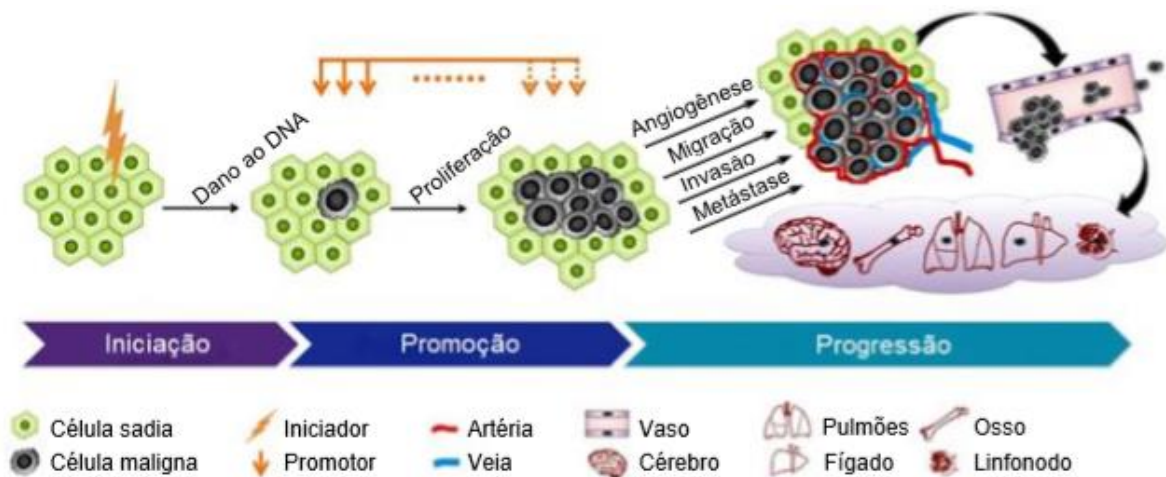
Em relação as características epidemiológicas, o câncer é um conjunto de diversas doenças com características moleculares e fenotípicas distintas (CHATTERJEE; RODGER; ECCLES, 2018), cujo desenvolvimento envolve fatores endógenos (hereditários) e fatores exógenos (ambientais). Os fatores endógenos como os hormônios, as condições imunológicas e os distúrbios genéticos, permitem a produção de células com características específicas e com a capacidade de escapar dos mecanismos regulatórios que controlam o crescimento e a proliferação de células normais (HYNDMAN, 2016), sendo estes fatores responsáveis por cerca de 10% do casos de câncer. Os outros 90% dos casos de câncer são associados a fatores exógenos relacionados ao indivíduo, como infecções, hábitos alimentares, uso do tabaco, sedentarismo, envelhecimento, e à fatores ambientais, como exposição aos raios ultravioletas e inalação de poluentes (SHANKAR; GUPTA; GUPTA, 2019).

Neste contexto, a carcinogênese é caracterizada como um processo de formação do tumor, que ocorre em múltiplas etapas, e é dividido em três fases distintas, denominadas de: iniciação, promoção e progressão (GRAY et al., 2017). A

fase inicial envolve fatores endógenos e exógenos, responsáveis por promover alterações genéticas e/ou epigenéticas que surgem espontaneamente e provocam danos ao DNA e, portanto, podem ativar proto-oncogenes, como RAS e MYC, e inibir genes supressores de tumor, como os que codificam a proteína p53 (TP53) e retinoblastoma (Rb), gerando novos fenótipos que conferem uma transformação de uma célula normal para célula modificada (LIANG et al., 2019; NAPOLI; FLORES, 2020).

A fase seguinte, a promoção, envolve um agente promotor que induz a proliferação de diferentes clones celulares, provenientes da célula transformada na fase anterior, dirigida pela ativação de Proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) e de citocinas inflamatórias (HYNDMAN, 2016). Os efeitos promotores podem permanecer por longo período no tecido alvo, todavia, com a interrupção do contato com o oncopromotor, esse efeito reversível pode desaparecer, e promover a regressão ou impedir o desenvolvimento do tumor. Seguindo o processo de carcinogênese, por último, ocorre a fase de progressão e metástase, etapa irreversível e agressiva que resulta na instalação do câncer (Figura 1) (SIDDIQUI et al., 2015).

Figura 1. Etapas da carcinogênese

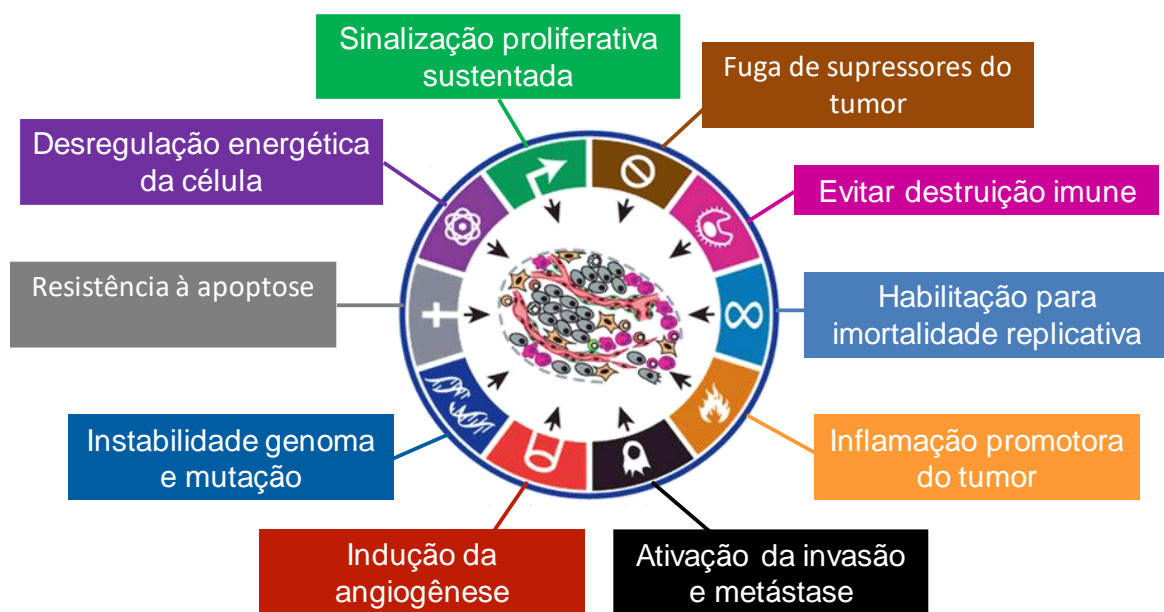


Fonte: Adaptado de Liu et al., 2015.

Legenda: A carcinogênese é dividida em três etapas: **iniciação** que envolve fatores endógenos e exógenos, responsáveis por promover alterações genéticas e/ou epigenéticas, que podem ativar proto-oncogenes e inibir genes supressores de tumor responsáveis pela transformação da célula normal para célula modificada. A fase seguinte, a **promoção** envolve um agente promotor que induz a proliferação das células transformadas na fase anterior, e por último a fase de **progressão** e metástase, etapa irreversível e agressiva que resulta na instalação do câncer.

Considerando os aspectos abordados, pode-se dizer que o desenvolvimento do câncer é de etiologia complexa e multifacetada (BRAY et. al., 2018), que envolve um mecanismo rápido de progressão e alterações celulares diversas, responsáveis por características primordiais, compartilhadas por diferentes tipos de câncer. Essas características são designadas de “marcas” ou “*Hallmarks*” do câncer (Figura 2) (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Figura 2. Características biológicas do câncer



Fonte: Adaptado de HANAHAN; WEINBERG (2011).

Os *hallmarks* compreendem capacidades biológicas distintas, adquiridas durante o processo de desenvolvimento do tumor, e capazes de proporcionar às células cancerígenas sobrevivência, proliferação e disseminação de maneira descontrolada (Quadro 1) (HANAHAN; WEINBERG, 2011; ZEFFERINO et al., 2019).

Quadro 1. Características biológicas do câncer

Proliferação celular sustentada	capacidade da célula prolifera-se constitutivamente na ausência de ligante ou estímulo externo
Evasão de supressão do crescimento	inativação de genes supressores, que regulam negativamente a proliferação celular persistente
Resistência à morte celular	mutações genéticas ou modificações epigenéticas nos reguladores e efetores, membros pró (Bax e Bak) e antiapoptóticos (Bcl-x _L , Bcl-w)
Angiogênese sustentada	suprimento de nutrientes e oxigênio necessários para o desenvolvimento do tumor, além de favorecer metástases
Desregulação da energética celular	promove independência funcional e manutenção das principais características do câncer
Inflamação crônica	relacionado a liberação de diversos mediadores inflamatórios
Ativação da invasão e metástase	envolve eventos celulares, como a degradação da matriz extracelular (ECM), a transição epitélio-mesenquimal (EMT), microambiente inflamatório tumoral e a desregulação da morte celular programada
Imortalidade replicativa	associada a atividade da telomerase em células modificadas ou imortalizadas espontaneamente, que induzem a uma resistência da senescência ou crise/apoptose
Instabilidade genômica	promoção de defeitos na manutenção e reparo do genoma, o que favorece as mutações espontâneas e alterações no DNA que promove a evolução das características das células tumorais
Evasão da destruição imune	atribuída a mudança do microambiente pelas células tumorais altamente imunogênicas, que desativam os componentes do sistema imune designados para destruí-las, suprimindo o ataque imunológico

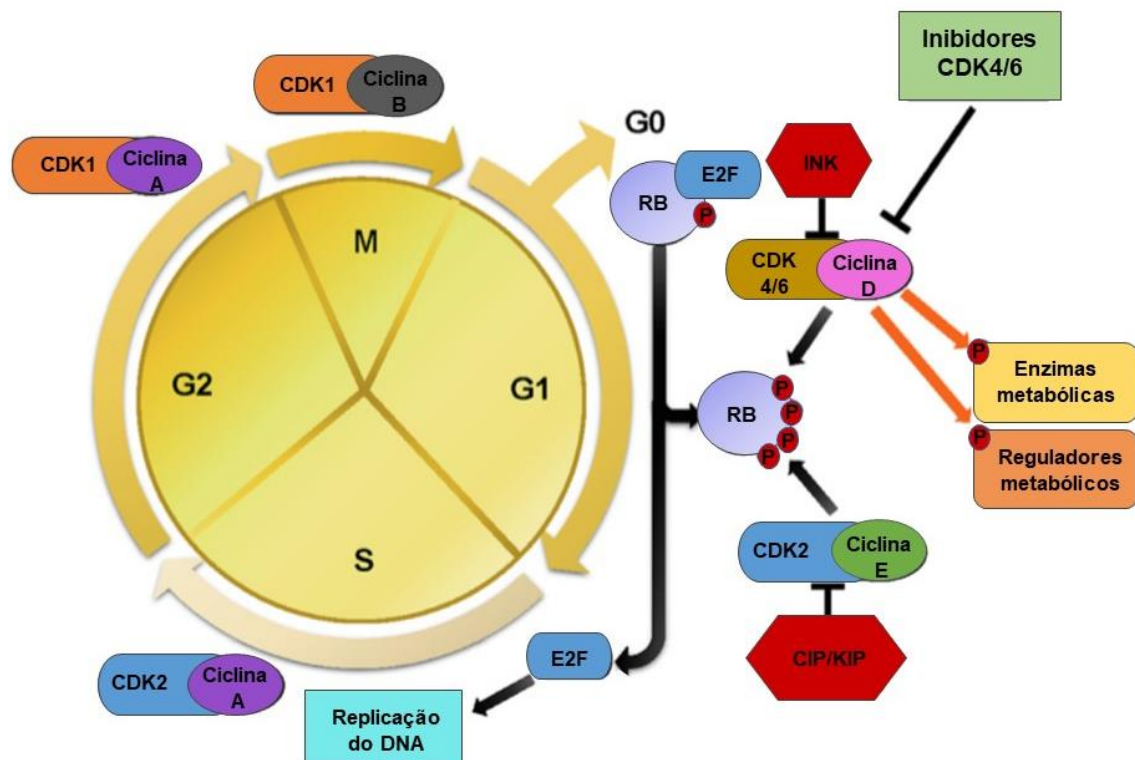
Diante do conhecimento dessas características que possibilitam o desenvolvimento do câncer, é possível identificar os diferentes alvos farmacológicos para o tratamento da doença.

2.2 O controle do ciclo celular e apoptose

O ciclo de divisão celular é uma das atividades celulares primordiais, responsável pela replicação e propagação do genoma. Esse processo é organizado

em várias etapas: fase G1- crescimento e aumento do volume celular, fase S – replicação do genoma e síntese de DNA, fase G2 – síntese de proteínas e aumento celular rápido, com o objetivo de organizar a célula e o seu conteúdo para a divisão e por último a mitose (M) – separação do material genético entre as células filhas (BOWARD; WU; DALTON, 2016; DARLING et al., 2017).

Figura 3. Progressão do ciclo celular



Fonte: Adaptado de BONELLI, 2019.

Legenda: Interação entre regulação do ciclo celular e metabolismo. O complexo CDK4 / 6-ciclina D promove a progressão do ciclo celular em direção à fase S, através da liberação de E2F. Além da regulação do ciclo celular, o complexo CDK4 / 6-Ciclina D e o E2F exercem efeitos no metabolismo celular, modulando a expressão / atividade de enzimas metabólicas e de reguladores metabólicos. Os inibidores da CDK4 / 6 afetam a progressão e o metabolismo do ciclo celular.

A regulação e progressão dos eventos do ciclo celular envolvem uma série de proteínas regulatórias, denominadas de ciclinas, pertencentes à família de cinases dependentes de ciclinas (CDKs) (CHENG; TSE, 2018). As CDKs são serina/treonina cinases específicas, que controlam a ativação de proteínas a partir da fosforilação e

desfosforilação, para favorecer o controle durante a progressão do ciclo (CHENG; TSE, 2018; XIE et al., 2019).

Vários pontos de verificação conhecidos como checkpoint controlam o avanço das células para as fases seguintes do ciclo celular. Esse processo de verificação é controlado pelas ciclinas, que tem a capacidade de formar complexos ativados com CDKs, regulando as fases do ciclo (BONELLI et al., 2019). O primeiro ponto de verificação ocorre na fase G1, em que estímulos mitogênicos relacionados ao crescimento promovem uma sinalização e consequente aumento na síntese de ciclina D, induzindo a formação do complexo CDK4/6-ciclinaD (GRANT; COOK, 2019).

O complexo CDK4/6-ciclinaD promove a fosforilação e inativação da retinoblastoma (Rb), que por sua vez se dissocia do fator de transcrição E2F responsável pela transcrição das ciclinas A e E na fase S, primordiais na síntese do DNA. A ciclina E interage com CDK2 formando um complexo CDK2-ciclinaE que promove a hiperfosforilação do Rb (STALLAERT et al., 2019). Na sequência, a ciclina A associa-se com a CDK2 favorecendo a passagem da fase S para fase G2. Durante a fase G2 a ciclina A liga-se com a CDK1, permitindo transição para fase M. Neste período, encontra-se o segundo ponto de verificação (G2-M), que é estritamente controlado pelo complexo CDK1-ciclinaB envolvido no processo de progressão da mitose na fase M (BONELLI et al., 2019).

As células saudáveis têm o controle da progressão do ciclo celular e o funcionamento correto dos checkpoints, permitindo interrupção da divisão celular em casos de alterações no ciclo, impedindo o desenvolvimento de alterações no DNA e mudanças no metabolismo energético da célula. No entanto, a desregulação ou inativação dos checkpoints resultam no desenvolvimento de células atípicas ou imaturas que podem levar a apoptose ou crescimento e proliferação descontrolada característico de células tumorais. Esse processo envolve alterações no status de fosforilação de uma proteína regulatória, a retinoblastoma (Rb), promovendo mudança do seu estado ativo para inativo, favorecendo ativação de cascatas de reações envolvidas na progressão do ciclo celular (ZAVERI; DHAWAN, 2018).

A desregulação do ciclo celular está relacionada ao mau funcionamento das CDKs, que podem levar ao desenvolvimento do câncer. Neste contexto, a busca por novos candidatos a fármacos inibidores seletivos de CDKs que sejam capazes de controlar o ciclo celular, restringindo a proliferação celular desordenada e induzindo a

morte celular programada, como alternativa terapêutica eficaz. Dentre eles, os inibidores seletivos CDK4/6 que encontram-se em estudo clínico, como o Ribociclibe e Palbociclibe, que atuam suprimindo a fosforilação da proteína Rb induzindo uma parada no ciclo celular, ativando vias que levam a apoptose, sendo uma estratégia para o tratamento do câncer (CHONG et al., 2020; COTTU et al., 2018; YUAN et al., 2020).

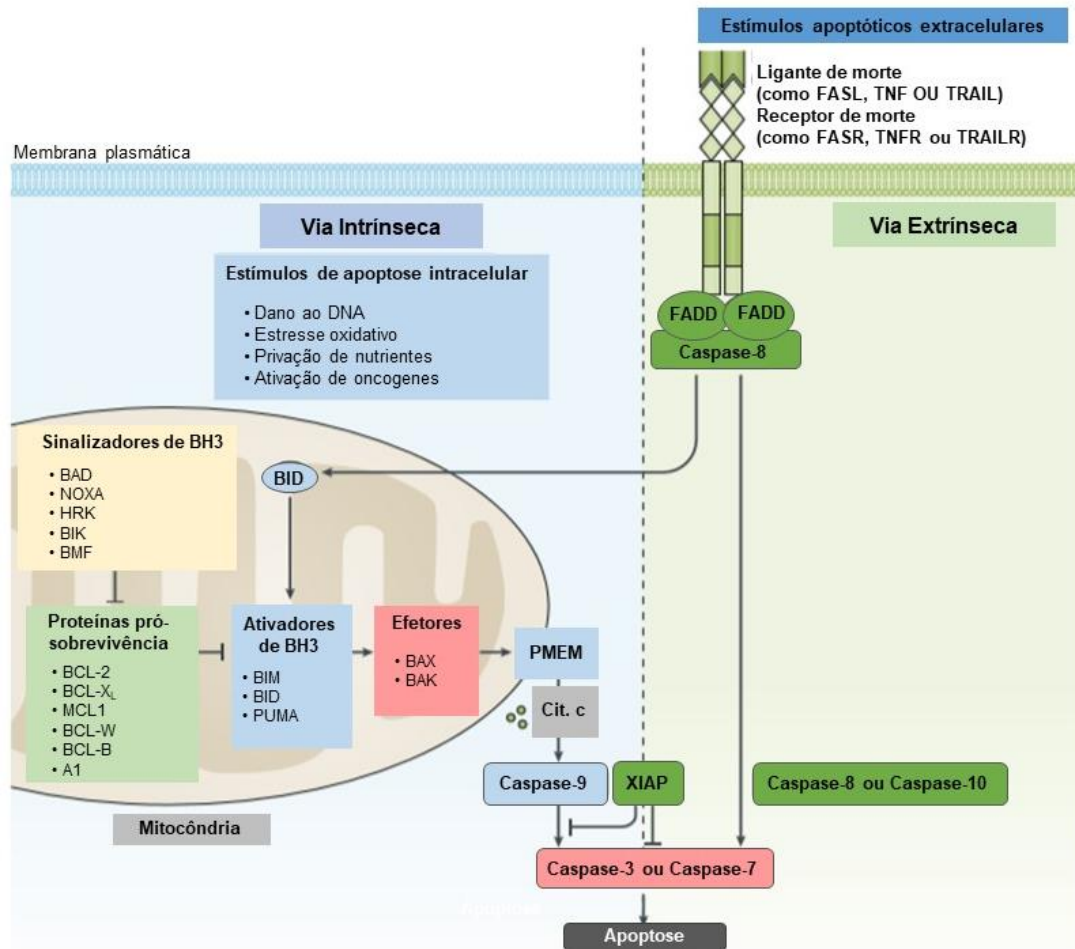
A apoptose é um tipo de morte celular programada, um mecanismo inato, que permite a eliminação de células indesejadas favorecendo a regulação do crescimento e desenvolvimento celular, garantindo a homeostase (NAGATA, 2018). A desregulação no processo de apoptose está diretamente associada ao desenvolvimento de várias doenças, incluindo distúrbios neurológicos, doenças cardiovasculares, doenças autoimunes e o câncer (YU et al., 2019).

O processo de apoptose envolve alterações morfológicas e bioquímicas celulares como a formação de prolongamentos na membrana (*blebs*), diminuição do volume celular, fragmentação do DNA, condensação de cromatina, despolarização da membrana mitocondrial, externalização da fosfatidilserina na membrana citoplasmática e formação dos corpos apoptóticos (JAN; CHAUDHRY, 2019). Esse processo controlado pela ativação de enzimas denominadas de caspases, que dependem da integração e equilíbrio entre as proteínas pró-apoptóticas e antiapoptóticas (GILMORE; KING, 2019).

Ao final do processo são formados corpos apoptóticos, que são reconhecidos por macrófagos, por meio da sinalização derivada da externalização da fosfatidilserina, um fosfolípídeo de membrana que em células viáveis encontra-se voltado para o meio intracelular. A exteriorização da fosfatidilserina para o meio extracelular impede o extravasamento do conteúdo celular, evidenciando a morte celular programada (SHARMA; BOISE; SHANMUGAM, 2019).

A apoptose ocorre por intermédio de duas vias distintas: a via extrínseca (receptores de morte) e a via intrínseca (mitocondrial), que convergem para ativação das caspases (GILMORE; KING, 2019)

Figura 4. Vias da apoptose



Fonte: Adaptado de HINZ, 2019.

Legenda: A apoptose é controlada por duas vias distintas, porém conectadas. A via intrínseca é desencadeada por estímulos de morte intracelulares, como danos no DNA, radiação, privação de nutrientes, estresse oxidativo ou ativação de oncogene, que induzem a apoptose, promovendo a permeabilização da membrana externa mitocondrial (PMEM) e a liberação do citocromo c (cit. C), responsável pela ativação da caspase -9, que cliva e ativa a caspase-3 e a caspase-7, possibilitando a fase de execução da apoptose. Essa via de apoptose é fortemente controlada pela família de proteínas BCL-2, que funcionam como sensibilizadores, proteínas pró-sobrevivência, ativadores e efetores. A via extrínseca é iniciada por ligantes extracelulares, como o ligante FAS (FASL), TNF ou TRAIL, que se ligam aos receptores de superfície celular FASR, TNFR TRAILR, respectivamente. A sinalização é transmitida via domínio de morte associado à FAS (FADD), que aciona a ativação da caspase-8 ou caspase-10, iniciando a apoptose por meio da clivagem e ativação da caspase-3 ou caspase-7. **BH3**, homologia com BCL-2 domínio 3; **XIAP**, inibidor da proteína de apoptose.

A via extrínseca envolve receptores de morte na membrana, que são ativados por ligantes extracelulares, que interagem com seus receptores de superfície específicos, como ligante Fas (CD95), família de ligantes do fator de necrose tumoral - TNF (TNFR1) e ligante indutor de apoptose (TRAIL). A sinalização desencadeada pelo receptor é transmitida via domínio de morte associado a FAS (FADD), que promove a sua ligação com caspase 8 (iniciadora) formando um complexo de sinalização indutor de morte (DISC). O complexo ativado promove a clivagem e ativação das caspases 3 e 7, que são designadas de caspases efetoras responsáveis pela efetivação do processo apoptótico (BOOTH; ROBERTS; DENT, 2019; SHARMA; BOISE; SHANMUGAM, 2019).

A via intrínseca é ativada por vários estímulos extracelulares e intracelulares, como estresse oxidativo, irradiação, dano ao DNA, privação de fatores de crescimento ou tratamento com substâncias citotóxicas, que levam a ativação de membros apenas de proteínas com domínio BH3 da família de proteínas do linfoma de células B2 (BCL-2). As proteínas pró-apoptóticas (Bax/Bak) ativadas são translocadas do citoplasma para a mitocôndria, sofre uma mudança conformacional e inserem-se na membrana externa da mitocôndria, induzindo alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial externa (PMEM)(GIACOMELLO et al., 2020). O PMEM favorece a fragmentação da membrana externa permitindo a liberação do citocromo c (pró-apoptótico), este associa-se com o ATP e ativa o fator de ativação da protease apoptótica 1 (APAF1) formando o apoptossoma, que permeia a ativação da caspase 9, que cliva e ativa as caspases 3 e 7 culminando o processo apoptótico (BOOTH; ROBERTS; DENT, 2019; HINZ; LAGARES, 2019). A via intrínseca pode ser ativada indiretamente em consequência da ativação da via extrínseca.

A regulação da via mitocondrial envolve membros da família BCL-2, que são divididos em proteínas pró-apoptóticas e antiapoptóticas, fundamentais no controle da apoptose. A ativação da via intrínseca envolve as proteínas pró-apoptóticas (Bim, Bid, Bad, Bmf, Bak, Bax, Puma e Noxa), que são sensíveis ao mecanismo de estresse celular estimulando o processo de apoptose (WHITAKER; PLACZEK, 2019). Os membros antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w e A1) são proteínas pró-sobrevivência que controlam a permeabilização da membrana mitocondrial externa, inibindo a formação de poros, não possibilitando a liberação do citocromo c, portanto,

promove a inibição da apoptose (HINZ; LAGARES, 2019; SHARMA; BOISE; SHANMUGAM, 2019).

A apoptose pode ser interrompida por inibidores de proteínas de apoptose (IAPs), como o Xiap, Apollon, Survinin, que podem bloquear a apoptose, alterar a progressão do ciclo celular e modular a transdução de sinal mediada por receptor (Figura 4). Por outro lado, proteínas mitocondriais produzidas endogenamente e liberadas para o citosol durante a apoptose, como as Smac, atuam bloqueando os locais de ligação da caspase aos IAPs e estimulam a ativação de caspases, resultando no processo de apoptose (HINZ; LAGARES, 2019; QIN et al., 2016).

A apoptose é a principal forma de morte produzida por agentes com potencial anticâncer, que induzem esse processo especialmente por induzir danos no DNA e ativar a via mitocondrial (CUI et al., 2018; REN et al., 2017; SUN et al., 2018).

2.3 Estresse oxidativo no contexto do câncer

O estresse oxidativo é designado como estado de desequilíbrio, acarretado pelo aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERN) (THARMALINGAM et al., 2017). Essas moléculas são altamente reativas, contendo elétrons desemparelhados que favorece a interação com macromoléculas promovendo a oxidação, e interferindo na sinalização do controle redox, levando a danos moleculares que induz o surgimento de diferentes patologias, como doenças degenerativas, cardiovasculares e câncer (LIGUORI et al., 2018).

As EROs são espécies químicas instáveis que contem moléculas de oxigênio em sua estrutura, como o ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH^\cdot) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (PRASAD; GUPTA; TYAGI, 2017). Essas moléculas são amplamente produzidas na mitocôndria por intermédio do metabolismo oxidativo, e exercem a função de proteínas sinalizadoras que desencadeiam alterações intracelulares nas proteínas, ácidos nucleicos e lipídios promovendo danos moleculares e consequente estresse oxidativo (GILL; PISKOUNOVA; MORRISON, 2016; KLIESER et al., 2019).

Neste cenário, para manter o equilíbrio redox e proteger a célula contra danos causado pelas EROs, o sistema antioxidante atua neutralizando e reduzindo a quantidade de radicais livres presentes nas células (GALADARI et al., 2017). Esse

sistema é dividido em: 1) enzimático, que inclui enzimas como a catalase, peroxirredoxinas, tioredoxinas, glutathiona peroxidase e superóxido dismutase, e 2) não enzimático, como o ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), selênio e betacarotenos que atuam como defesas antioxidante favorecendo a homeostase (GILL; PISKOUNOVA; MORRISON, 2016; KLIESER et al., 2019).

As EROs exercem papel dual no câncer, atuando nas diferentes fases do processo de carcinogênese. A produção excessiva de EROs, pode promover alterações no DNA, levando a instabilidade genômica que ativa vias de sinalização que impulsiona a proliferação na fase de iniciação (MOLONEY; COTTER, 2018). O estresse oxidativo na fase de promoção estimula a proliferação sustentada da população celular iniciada, por meio da ativação da via da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K)/Akt, que controla a atividade de fatores transcricionais como o fator nuclear kappa B (NF-kB) e genes supressores de tumor incluindo (PTEN) e p53 culminando na sobrevivência tumoral (ZHANG et al., 2016). Na fase de progressão, altos níveis de ROS modulam a sinalização do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) promovendo a angiogênese e metástase, essenciais para o crescimento do tumor (FIOCCHETTI et al., 2019).

As células tumorais tem uma capacidade antioxidante aumentada, o que permite eliminar altos níveis de EROs, favoráveis ao equilíbrio redox pro-tumoral, por meio da ativação de ongeneses que possibilita a progressão e a sobrevivência do tumor (MOLONEY; COTTER, 2018). No entanto, quantidades exacerbadas de EROs nas células tumorais levam a exaustão do sistema antioxidante, progredindo para níveis tóxicos que induz a ativação de vias de sinalização envolvidas na apoptose, como JNK e MAPK, PI3K/Akt (LU et al., 2020).

Neste contexto, o efeito citotóxico exercido pelo aumento nos níveis de ROS é característico de fármacos quimioterápicos, que causam danos a célula tumoral e induz a apoptose, como doxorrubicina, daunorrubicina, cisplatina, bleomicina usados no tratamento do câncer (GALADARI et al., 2017).

Todavia, estudos mostram que agentes terapêuticos que envolvam a redução dos níveis de ROS para níveis basais, exercem seu efeito por inibir a sinalização de vias pro-tumorais, responsáveis pela a proliferação do tumor. Sendo assim, esses processos culminam no efeito antioxidante essencial no mecanismo de compostos com potencial anticâncer (KLAUNIG, 2019; MOLONEY; COTTER, 2018).

2.4 Terapia do câncer

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que o percentual de mortes por câncer aumenta constantemente, sendo considerada um problema de saúde pública. Neste contexto, o uso do tratamento adequado é essencial para reduzir o desenvolvimento de toxicidade e de resistência pelas células tumorais (YASHIN; STALLARD; LAND, 2016).

A farmacoterapia do câncer compreende diversas modalidades terapêuticas, como cirurgias, quimioterapia, radioterapia, terapia alvo e imunoterapia, as quais podem ser utilizadas isoladamente ou em combinações (PAJUELO-LOZANO et al., 2018). Dentre as abordagens terapêuticas utilizadas no tratamento do câncer, a quimioterapia é a terapia de primeira escolha (DANCSOK; ASLEH-ABURAYA; NIELSEN, 2017).

Os fármacos quimioterápicos convencionais são classificados de acordo com os diferentes mecanismos de ação: 1) os agentes alquilantes como ciclofosfamida, promovem danos ao DNA; 2) agentes antimetabólitos como metrotexato, atuam no bloqueio da síntese do DNA na fase S (ALIMBETOV et al., 2018; ANSARIZADEH; SINGH; RICHARDS, 2017) e 3) produtos naturais como alcaloides da vinca (vincristina e vimblastina), taxanos (paclitaxel e docetaxel) e antibióticos (daunorrubicina e doxorrubicina), promovem a ativação de vias de sinalização que induzem parada do ciclo celular e apoptose (TRENDOWSKI, 2015).

No entanto, os agentes quimioterápicos apresentam alta toxicidade associada à sua baixa seletividade as células tumorais. A toxicidade produzida por esses fármacos está relacionada a atuação em células de rápida proliferação, como folículo pilosos, células do trato gastrointestinal e medula óssea, levando ao desenvolvimento de efeitos colaterais indesejáveis como alopecia, náuseas, vômitos e mielosupressão respectivamente (DICKENS; AHMED, 2018).

Sendo assim, considerando os efeitos colaterais graves e as limitações associada ao tratamento, bem como a elevada toxicidade e desenvolvimento de resistência pelas células tumorais impulsionam para busca de novas estratégias terapêuticas direcionadas, que incluem a terapia alvo, hormonioterapia e imunoterapia (ATANASOV et al., 2015; BURSTEIN et al., 2017).

A terapia alvo compreende dois grupos distintos de fármacos: os anticorpos monoclonais e as pequenas moléculas sintéticas. Os anticorpos monoclonais (mAb) exercem seus efeitos antitumorais por meio de três mecanismos principais: (1) inibição direta mediada pelo reconhecimento dos antígenos específicos tumorais, modulando a resposta imune do indivíduo (KIMIZ-GEBOLOGLU; GULCE-IZ; BIRAY-AVCI, 2018); (2) a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) compreende a ligação do mAb a um antígeno específico na superfície da célula tumoral, o qual é apresentado a região FC dos receptores de células imunes, que por sua vez atua inibindo vias de sinalização envolvidas na proliferação celular (WILKES, 2018) e (3) citotoxicidade dependente de complemento (CDC), os mAb se ligam aos antígenos específicos da membrana da célula alvo, que ativam vias responsáveis pelo recrutamento e ativação do sistema complemento (KIZHEDATH; WILKINSON; GLASSEY, 2018).

Os mAb são classificados pela sua estrutura química e biológica em três classes: anticorpos quiméricos, humanizados e totalmente humanos, os quais são amplamente utilizados para o tratamento do câncer por atuarem seletivamente nas células tumorais e reduzem o grau de toxicidade dessas moléculas (KIZHEDATH; WILKINSON; GLASSEY, 2018). Dentre eles, destacam-se o cetuximabe, trastuzumabe e panitumumabe, que se ligam especificamente ao domínio extracelular do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e impede a sinalização do receptor dependente de ligante, sendo utilizados em tipos de câncer que superexpressam esse receptor, como câncer de cabeça e pescoço, ovário, colorretal entre outros (FALAHATGAR et al., 2018). O bevacizumabe liga-se ao fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) bloqueando sua interação com o receptor, impedindo o processo de angiogênese, essencial no desenvolvimento e sobrevivência das células tumorais (WANG et al., 2017).

As pequenas moléculas sintéticas inibem a atividade intrínseca do receptor tirosina cinase por impedir a ligação do ATP ao sítio ativo do receptor, bloqueando os sinais de ativação de várias tirosinas cinases envolvidas na proliferação celular. Dentre eles, os inibidores do receptor BCR-abl cinase como imatinibe, desatinibe e nilotinibe usados no tratamento de leucemia (FARRAN; MÜLLER; MONTENEGRO, 2017), inibidor do receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER-2), por exemplo, o lapatinibe indicado para o tratamento do câncer de mama com amplificação do HER2 (WAHDAN-ALASWAD; LIU; THOR, 2020) , e o inibidor

do EGRF como o gefitinibe usado contra o câncer de pulmão de células pequenas (SUTIMAN et al., 2017).

A terapia hormonal envolve a utilização de agentes que modulam a atividade de receptores sensíveis ao estrógeno e progesterona, como o tamoxifeno que atua como antagonista seletivo do receptor de estrogênio impedindo a ligação do hormônio ao receptor, interrompendo o desenvolvimento e progressão de cânceres de mama HR+ (GAJULAPALLI et al., 2016; SMITH; PREWETT, 2017), e a flutamida, bloqueador competitivo do receptor de andrógeno, usada no tratamento do câncer de próstata e endométrio associados a outros medicamentos (ZACHARIA, 2017).

A imunoterapia almeja estratégias terapêuticas com a finalidade de estimular o sistema imunológico e induzir respostas antitumorais específicas contra os diferentes tipos de câncer (SALEM; ATTIA; GALAL, 2016). Neste contexto, Os inibidores de checkpoint como ipilimumabe, nivolumabe pembrolizumabe e atezolizumabe, atuam como agentes moduladores do sistema imune, regulando negativamente a ativação das células T e restabelecendo a sinalização do sistema imune responsável por destruir as células tumorais (SHENG et al., 2017), e ainda utilização de citocinas, interferon, interleucina-2 e vacinas imunogênicas que modulam o sistema imune para induzir a citotoxicidade (VENTOLA, 2017).

Neste cenário, diante das várias modalidades terapêuticas utilizadas no tratamento do câncer, a falta de seletividade e o alto nível de toxicidade, influenciam para o desenvolvimento de resistência associado ao tratamento. Sendo assim, estudos em busca de novas alternativas terapêuticas são primordiais para possibilitar o desenvolvimento de fármacos mais eficazes e com baixa toxicidade, bem como reduzido potencial de resistência pelas células tumorais.

2.5 Derivados acridínicos

As acridinas são compostos aromáticos policíclicos com estrutura planar, classificadas como alcaloide antraceno (GOUVEIA et al., 2018). Estruturalmente, as acridinas são formadas por dois anéis fundidos a um anel de piridina em uma posição central, conhecido por denominações como: dibenzo-piridina, 10-azaantraceno, 2,3-dibenzoquinolina, 2,3,4,6-dibenzopiridina, entre outras (SCHMIDT; LIU, 2015).

Estudos químicos descrevem que a atividade biológica dessas moléculas é associada à planaridade das estruturas aromáticas, que podem se intercalar entre os

pares de bases de ácidos nucleicos no DNA de fita dupla, interferindo nas suas funções celulares (ALMEIDA et al., 2016; BARROS et al., 2012; FELIP-LEÓN et al., 2018).

Algumas modificações químicas nas acridinas, como a inserção de substituintes, incluindo halogênios, ou anéis heterocíclicos diferentes, favorecem a síntese de novos derivados acridínicos com atividades biológicas diversificadas e melhor interação estrutura-atividade (GAO et al., 2015). Diversas atividades farmacológicas já foram descritas para acridínicos, tais como, atividade antimalárica (VALDÉS, 2011), anti-alzheimer (MUNAWAR et al., 2016) e antimicrobiana (WAINWRIGHT, 2001).

Devido as propriedades farmacológicas das acridinas e seus derivados, a síntese desses compostos tem sido de considerável interesse para a busca de novas abordagens para o tratamento de diversas doenças, incluindo o câncer (DE ALMEIDA et al., 2015). Em relação à sua atividade anticâncer, mecanismos como intercalação do DNA e inibição da enzima topoisomerase I ou II tem sido associados à citotoxicidade observada (CHEN et al., 2019; MENEZES et al., 2019).

Nesse cenário, os derivados acridínicos, por meio da sua interação com o DNA, podem induzir mudanças estruturais locais no DNA, como o desenovelamento da dupla hélice e o alongamento da fita do DNA, e interromper o sistema de reparo e a replicação, levando a morte celular (FAHRENHOLTZ et al., 2016; KOVVURI et al., 2018).

Alguns fármacos derivados da acridina foram aprovados como quimioterápicos em ensaios clínicos devido à sua significativa atividade. Dentre estes, a amsacrina (m-AMSA), que tem sido utilizada clinicamente em vários países para o tratamento da leucemia e linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin e cânceres de cabeça e pescoço (CHEN et al., 2019). Todavia, os efeitos adversos da m-AMSA, como o desenvolvimento de resistência por parte das células tumorais, baixa biodisponibilidade e tempo de meia-vida curta, limitam o seu uso na terapêutica. Sendo assim, esses fatores impulsionam os pesquisadores a modificarem estruturalmente este composto e produzirem diferentes derivados acridínicos, com o objetivo de maximizar a atividade antitumoral e minimizar a toxicidade e o desenvolvimento de resistência (FANG et al., 2016; FU et al., 2017).

Os novos derivados de acridina denominados espiro-acridinas, sintetizadas por meio da inserção do grupo ciano-N-acil-hidrazona entre os anéis fenil da acridina, seguidos de ciclização espontânea (ALMEIDA et al., 2016) constituem um grupo de moléculas promissoras. Esses novos compostos espiro-acridínicos, (E)-1'-((benzilidenamino)-5'-oxo-1',5'-di-hidro-10H-espiro [acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrilo (AMTAC-01) e (E)-1'-((4-metoxibenzilideno) amino)-5'-oxo-1',5'-di-hidro-10H-espiro [acridina-9,2'-pirrole]-4'-carbonitrila (AMTAC-02), tem propriedades de ligação ao DNA e inibem a topoisomerase II α , resultando em atividade antiproliferativa contra diferentes linhagens celulares de melanoma (MENEZES et al., 2019).

Gouveia e colaboradores (2018) demonstraram no teste de inibição da topoisomerase II α humano (Topo II), que o ((E)-1'-((4-clorobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-diidro-10H-espiro[acridina] 9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-06), com cloro na posição *para* no anel fenil, apresentou um alto valor de inibição (84,34%). Os estudos com o AMTAC-06 mostraram sua capacidade de intercalar com os pares de bases de DNA no sítio ativo Topo II, impedindo a religação do DNA, em um processo conhecido como envenenamento. A atividade *in vitro* de novos derivados espiro-acridínicos, como o AMTAC-06 indica uma atividade promissora para o desenvolvimento de novos agentes anticancerígenos.

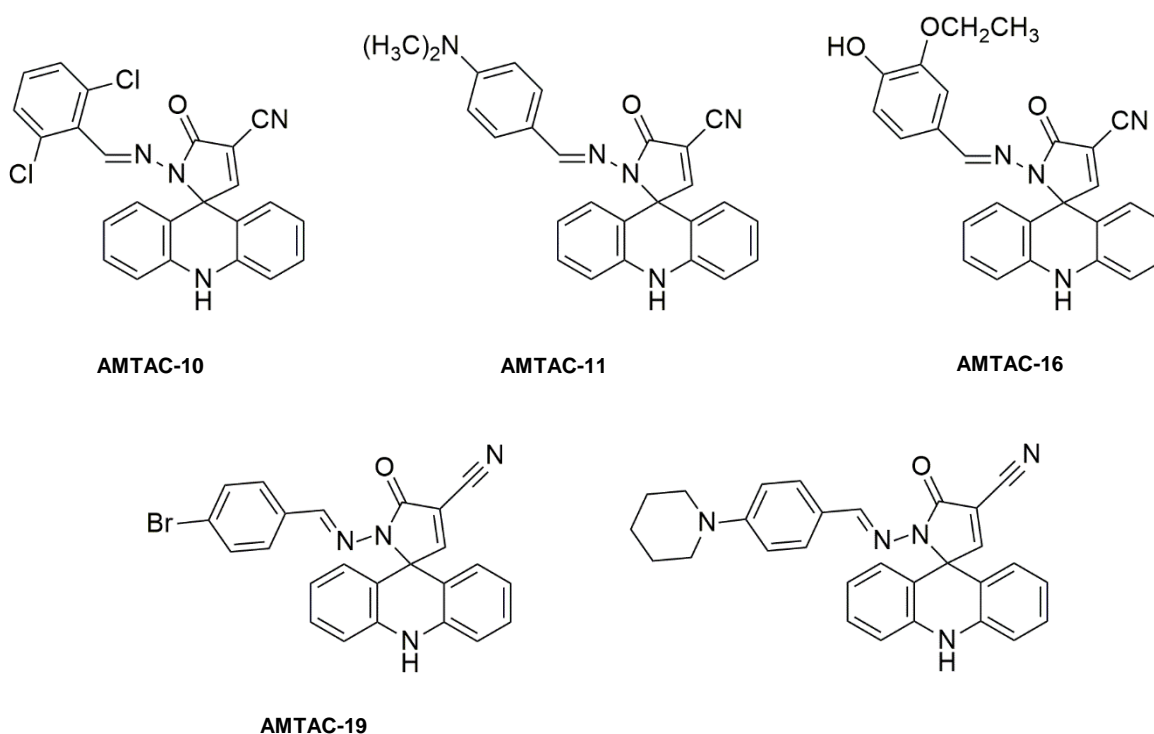
Resultados preliminares obtidos pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que outros derivados acridínicos (espiro-acridínicos, N-acilhidrazônicos acridínicos, tiosemicarbamidas acridínicos), como N'-(2-chloro-6-methoxy-acridin-9-yl)-2-cyano-3-(4-dimethylaminophenyl)-acrilohidrazida (ACS-AZ10) e (E)-1'-((4-flúorbenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-diidro-10H-espiro[acridina9,2'-pirrol]-4'carbonitrila (AMTAC-07) apresentaram potente atividade antitumoral *in vivo* em modelo de Carcinoma Ascítico de Ehrlich (BATISTA, 2019; MANGUEIRA et al., 2017). Dentre os compostos estudados, o AMTAC-07 apresentou atividade antitumoral *in vitro* nas linhagens MOLT-4 (células T de leucemia), HL-60 (leucemia promielocítica humana) e HCT-116 (carcinoma de cólon humano) (BATISTA, 2019).

Considerando o potencial farmacológico dos derivados acridínicos foram obtidos os compostos acridínicos (E)-1'-((2,6-diclorobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-10), (E)-1'-((4-(dimetilamino) benzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-

4'-carbonitrila (AMTAC-11), (*E*)-1'-((3-etoxi-4-hidroxibenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-dihidro-10*H*-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-16), (*E*)-1'-((4-bromo-benzilideno) amino)5'-oxo-1'5'-dihidro-10*H*-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-19) e 5'-oxo-1' - ((4- (piperidina-1-il) benzilideno) amino) -1', 5'- dihidro-10*H*-espiro [acridina-9,2'-pirrol] - 4'-carbonitrila (AMTAC-23). Sendo os compostos espiro-acridínicos AMTAC-19 e AMTAC-23, compostos inéditos que não apresentam nenhum relato na literatura de atividade farmacológica ou toxicidade (Figura 5).

Nessa perspectiva, esse trabalho baseia-se nos estudos da atividade antitumoral de novos derivados acridínicos, aliado a avaliação de seus mecanismos de ação antitumoral envolvidos nesse efeito.

Figura 5. Estruturas dos compostos espiro-acridínicos



Fonte: SOUSA, 2020.

Legenda: Compostos espiro-acridínicos do estudo: (*E*)-1'-((2,6-diclorobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-dihidro-10*H*-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-10), (*E*)-1'-((4-(dimetilamino) benzilideno) amino)-5'-oxo-1',5'-dihidro-10*H*-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-11), (*E*)-1'-((3-etoxi-4-hidroxibenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-dihidro-10*H*-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-16), (*E*)-1'-((4-bromo-benzilideno) amino)5'-oxo-1'5'-dihidro-10*H*-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-19) e 5'-oxo-1' - ((4- (piperidina-1-il) benzilideno) amino) -1', 5'- dihidro-10*H*-espiro [acridina-9,2'-pirrol] - 4'-carbonitrila (AMTAC-23).

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antitumoral e a toxicidade do derivado espiro-acridínico (*E*)-1'-((4-bromo-benzilideno)amino)5'-oxo-1'5'-dihidro-10*H*-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-19), por meio de ensaios *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade de novos derivados espiro-acridínicos em linhagens de células tumorais e não tumorais;
- Caracterizar os efeitos do composto mais promissor sobre a viabilidade celular da linhagem mais sensível, em diferentes tempos de tratamento;
- Investigar mecanismos de ação antitumoral *in vitro* do composto selecionado na linhagem celular mais sensível: interferência na regulação do ciclo celular, nos mecanismos de morte celular (apoptose/necrose) e na produção de espécies reativas de oxigênio.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da pesquisa

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

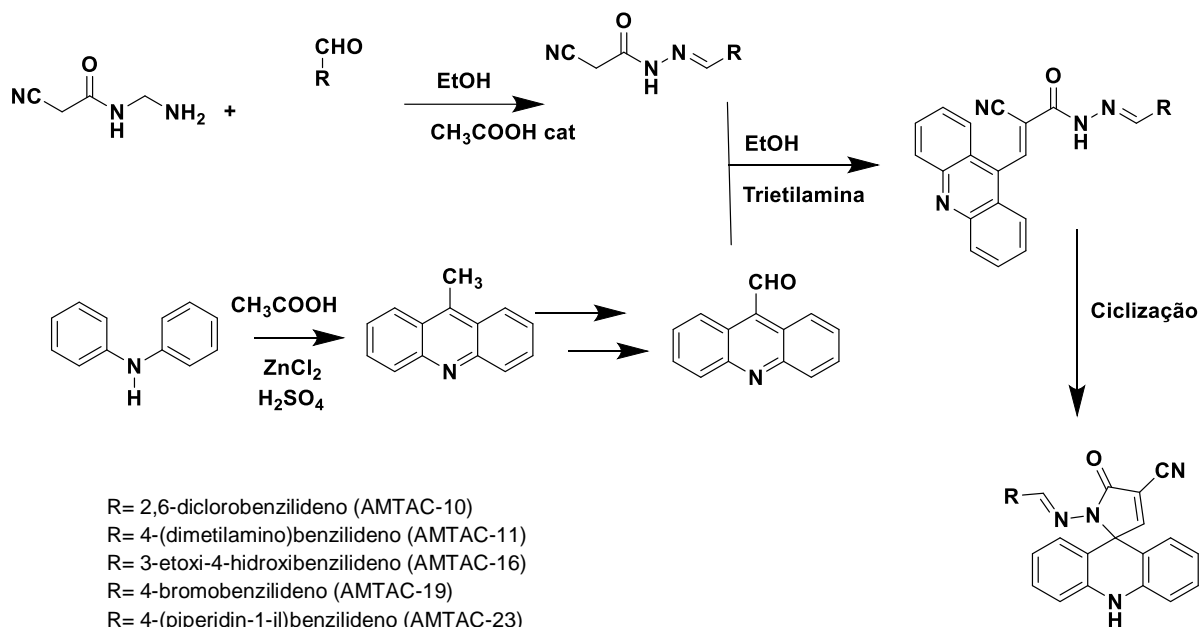
4.2 Material

4.2.1 Amostras teste

As amostras teste, compostos espiro-acridínicos (AMTAC-10, AMTAC-11, AMTAC-16, AMTAC-19 e AMTAC-23), foram fornecidas pelo professor Dr. Ricardo Olímpio de Moura do Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM) da Universidade Estadual da Paraíba, sintetizadas de acordo com metodologia já descritas (ALMEIDA et al., 2016; GOUVEIA et al., 2018).

A via sintética usada para obter os compostos espiro-acridínicos foi paralela e convergente, sendo realizada a síntese de 2-ciano-N'-(benzilideno)-aceto-hidrazida (JRs) substituídos como intermediários e em paralelo com o aldeído acridínico. Para obter os JRs, partiu-se da 2-ciano-acetado-hidrazida que foi condensada com diferentes aldeídos aromáticos, como mostrado no Esquema 1, em meio etanólico e em equivalentes molares na presença de ácido acético como catalisador à temperatura ambiente por 24 horas. Para a síntese do aldeído acridínico, partiu-se da difenilamina, que sofre reação de acilação de Friedel-Crafts seguidas de ciclização em meio ácido, obtendo-se a 9-metilacridina, que após oxidações sucessivas permitiu a obtenção do 9-carboxialdeído-acridínico. Para obter os compostos espiro-acridínicos, partiu-se do aldeído de acridina que foi condensado com os intermediários JRs em meio etanólico e básico em equivalentes molares a 78 °C por 6 horas, os quais sofrem ciclização espontânea levando aos derivados finais da espiro-acridina.

Esquema 1. Via sintética para obter compostos espiro-acridínicos



Fonte: Pinheiro Segundo; Moura, 2020.

Legenda: Compostos espiro-acridínicos do estudo: (*E*)-1'-((2,6-diclorobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-dihidro-10*H*-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-10), (*E*)-1'-((4-(dimetilamino) benzilideno) amino)-5'-oxo-1',5'-dihidro-10*H*-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-11), (*E*)-1'-((3-etoxi-4-hidroxibenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-dihidro-10*H*-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-16), (*E*)-1'-((4-bromo-benzilideno) amino)-5'-oxo-1',5'-dihidro-10*H*-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-19) e 5'-oxo-1'-((4-(piperidina-1-il) benzilideno) amino)-1',5'-dihidro-10*H*-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-23).

4.2.2 Linhagens de células tumorais e não tumorais

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 2). As células HCT-116 foram generosamente fornecidas pelo Dr. Manoel de Moraes (Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil). HeLa, SK-MEL-28 e PC-3 foram adquiridas no banco de células do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brasil). MCF-7 e L929 foram fornecidas pelo Dr. João Ernesto de Carvalho (Universidade de Campinas, Campinas, São Paulo,

Brasil). HaCaT foi fornecida pela Dra. Jaciana Aguiar (Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil).

Quadro 2. Linhagens de células tumorais e não tumorais *in vitro*

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

Fonte: SOUSA, 2020.

As linhagens celulares foram cultivadas (5×10^4 células/mL) em frascos de cultivo utilizando o meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) ou F-12K (Banco de Células do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil), suplementadas com 10% de soro bovino fetal (SBF) inativado (GIBCO, Grand Island, NY, EUA), e 1% de solução de antibióticos (penicilina 10.000 U/ml e estreptomicina 10 mg/mL) (Sigma Aldrich). As células foram manipuladas em fluxo laminar, para garantir que não houvesse contaminações, e mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂. O crescimento celular foi acompanhado a cada 24 horas, e ao atingirem 80% de confluência, normalmente após 48 horas de cultivo, foi feita a adição 2 mL de solução de tripsina (Sigma Aldrich), por 5-10 minutos, para o deslocamento da monocamada das células aderentes da parede do frasco. Após esse período, adicionou-se meio suplementado com SBF, na mesma proporção de tripsina, para interromper a ação desta. As células foram centrifugadas a 500 g por 5 minutos e ressuspensas em meio suplementado para a contagem em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi avaliada por meio da utilização do corante azul de Tripán (Sigma Aldrich).

4.2.3 Obtenção das células mononucleares de sangue periférico (PBMCs)

Para a realização do ensaio de citotoxicidade em células normais humanas, as células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs) foram isoladas a partir de amostras de sangue humano, cedidas por doadores voluntários. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do 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 AMTAC-19.

4.3 Métodos

4.3.1 Avaliação da citotoxicidade em células tumorais e não tumorais

A avaliação da citotoxicidade foi realizada por meio do ensaio de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio), o qual é um método colorimétrico que mede indiretamente a citotoxicidade, proliferação ou viabilidade celular. O MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido em cristais de formazan de cor púrpura, insolúveis em água, após clivagem do anel de tetrazólio

por desidrogenases mitocondriais e outras enzimas lisossomais presentes em células metabolicamente ativas. Uma vez solubilizado, o 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 em placas de 96 poços na concentração de 3×10^5 células/mL (HCT-116, HeLa, MCF-7, PC-3, SK-MEL-28, L929 e HaCat) e 1×10^6 células/mL (PBMC). Após 24 horas, as substâncias previamente dissolvidas em DMSO foram incubadas na concentração de 50 μ M (triagens), ou em diferentes concentrações (3,125-200 μ M) com a suspensão celular, não ultrapassando a concentração final de 0,5% de DMSO, por 24, 48 e/ou 72 horas, conforme o caso, em uma estufa com 5% de CO₂, a 37 °C. A doxorrubicina foi utilizada como droga padrão, e testada em concentrações variando entre 0,31 e 20 μ M. Prosseguido o período de incubação, as placas foram centrifugadas (500 x g, 5 min, 25 °C), o sobrenadante foi parcialmente removido e a solução de MTT adicionada (5 mg/mL em PBS) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As placas foram incubadas por 3 horas, em seguida foi adicionado 100 μ L de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% e os cristais de formazan produzidos foram dissolvidos *overnight*. A absorbância foi mensurada em um espectrofotômetro (leitor de microplacas BioTek Instruments, Sinergy HT, Winooski, VT, EUA), no comprimento de onda de 570 nm.

Neste ensaio, primeiramente todas as células foram expostas a uma concentração limiar fixa de 50 μ M dos compostos AMTAC-10, AMTAC-11, AMTAC-16, AMTAC-19 e AMTAC-23, incubados por 72 horas. Esta triagem preliminar foi realizada para inferir quais compostos apresentariam melhor atividade antitumoral. Em seguida, o composto de maior atividade e a linhagem tumoral em que foi obtido o maior percentual de inibição, foram selecionados para a determinação da CI₅₀ (concentração que produz 50% de inibição no crescimento celular) nos tempos de 48 e 72 horas. Para a determinação da CI₅₀ foram testadas diferentes concentrações de AMTAC-19 (3,12 – 200 μ M), em quadruplicata, sendo realizado o ensaio conforme descrito anteriormente. O índice de seletividade foi obtido a partir da razão entre a CI₅₀ da célula não tumoral pela CI₅₀ da célula tumoral (DE LIMA SERAFIM et al., 2018).

4.3.2 Investigação de mecanismos de ação antitumoral *in vitro*

4.3.2.1 Avaliação da regulação do ciclo celular

As células HCT-116 foram incubadas (2×10^5 células/mL) em placas de 24 poços com o AMTAC-19 nas concentrações de 10 e 20 μM (correspondentes a CI_{50} e o dobro), por 48 horas. Como droga padrão foi usada a doxorrubicina (2,5 μM). Após o tratamento, as células foram coletadas por centrifugação (500 x g, 20 °C, 5 minutos), ressuspensas em PBS, fixadas cuidadosamente com etanol 70% previamente gelado, em vórtex, e congeladas (-20 °C) até a análise. No momento da análise, as células foram recuperadas por centrifugação (400 xg, 10 min, 4 °C), lavadas em PBS e incubadas com RNase (0,1 mg/mL) e iodeto de propídio (PI; 0,05 mg/mL) (Sigma-Aldrich, 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. Os dados foram obtidos com o programa Flowing Software 2.5.1 e tratados no programa GraphPad Prism 7.0. Foi determinado o percentual de células nas diferentes fases do ciclo celular (G0, G1, S, G2, M), bem como células sub-diplóides (sub-G1), considerando que o marcador iodeto de propídio se liga especificamente ao DNA e, portanto, a intensidade de fluorescência detectada pode ser relacionada com a quantidade de DNA nas células em cada fase do ciclo (JAYAT; RATINAUD, 1993).

4.3.2.2 Avaliação do mecanismo de morte celular (apoptose/necrose)

4.3.2.2.1 Avaliação dos efeitos de AMTAC-19 sobre a externalização da fosfatidilserina

As células HCT-116 foram incubadas (2×10^5 células/mL) em placas de 24 poços com o AMTAC-19 nas concentrações de 10 e 20 μM (correspondentes a CI_{50} e o dobro), por 48 horas. Como controle positivo foi usada a doxorrubicina (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 e a 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 com o tampão de ligação. Em seguida, o iodeto de propídio (IP) (20 µg/mL) foi adicionado. A anexina V possui alta afinidade com o fosfolípido fosfatidilserina presente na membrana externa de células em apoptose. Já o PI 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. Os dados foram obtidos com o programa Flowing Software 2.5.1.

4.3.2.2.2 Quantificação da apoptose por laranja de acridina (LA) e iodeto de propídio (IP)

As células HCT-116 foram incubadas (1×10^6 células/mL) em placas de 24 poços com o AMTAC-19 na concentração de 10 µM, por 48 horas. Como controle positivo foi usada a doxorrubicina (2,5 µM). Após o tratamento, as células foram coletadas por centrifugação (500 x g, 20 °C, 5 minutos), ressuspensas em PBS, marcadas com 10 µg/mL de laranja de acridina (µM) e iodeto de propídio (10 µg/mL) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As células recém-coradas foram observadas sob microscópio confocal de varredura a laser (Leica, Alemanha). As percentagens de células necróticas viáveis, apoptóticas precoces, apoptóticas tardias e secundárias foram determinadas. Os critérios para identificação foram os seguintes: (a) as células viáveis parecem ter um núcleo verde claro e uma estrutura intacta; (b) as células apoptóticas iniciais exibem um núcleo verde claro mostrando condensação da cromatina; (c) as células apoptóticas tardias mostram áreas alaranjadas densas (verde/vermelho) de condensação da cromatina e *blebs* de membrana; (d) as células necróticas parecem ter núcleo vermelho (RENVOIZÉ et al., 1998; TAN; NORHAIZAN, 2019).

4.3.2.3 Quantificação de espécies reativas de oxigênio

A produção de espécies reativas de oxigênio foi avaliada utilizando o fluoróforo 2',7'-diacetato diclorofluoresceína (DCFH-DA). Esta molécula não fluorescente é muito sensível 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/mL) em placas de 24 poços com o AMTAC-19 nas concentrações de 10 e 20 μM (correspondentes a CI_{50} e o dobro), por 48 horas. Após o tratamento, as células foram coletadas por centrifugação (500 x g, 20 °C, 5 minutos), ressuspensas em PBS (2×10^6 cél/mL), foram posteriormente marcadas com DCFH-DA (concentração final 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 530 nm de fluorescência e 485 nm de comprimento de excitação. A quantificação das espécies reativas de oxigênio (EROs) foi estimada pela intensidade média de fluorescência.

4.4 Análise estatística

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

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da citotoxicidade de compostos acridínicos em linhagens de células tumorais e não tumorais

Na tabela 1 estão expressos os percentuais de inibição do crescimento celular dos diferentes compostos acridínicos testados em linhagens de células tumorais humanas (HCT-116 – carcinoma colorretal, HeLa – colo do útero, SK-MEL-28 – melanoma, MCF-7 – adenocarcinoma de mama, PC-3 – carcinoma de próstata) e não tumorais (L929 – fibroblasto murino e HaCat – queratinócito humano), na concentração de 50 μ M.

Pode-se observar que o percentual de inibição do crescimento celular variou de $0 \pm 0,85\%$, para o composto AMTAC-23, a $88,56 \pm 0,58\%$, para o composto AMTAC-19, nas linhagens tumorais PC-3 e HCT-116, respectivamente. Para as linhagens não tumorais, o mesmo padrão de resposta foi observado, o composto que induziu maior percentual de inibição do crescimento celular foi o AMTAC-19 ($88,08 \pm 0,35$) na linhagem HaCat, enquanto o AMTAC-23 induziu o menor efeito citotóxico ($11,93 \pm 1,91\%$) na linhagem L929.

Comparando os efeitos dos compostos acridínicos testados, pode-se observar então que o AMTAC-19 apresentou o mais potente efeito citotóxico na linhagem HCT-116 ($88,56 \pm 0,58\%$ de inibição do crescimento celular), sendo então selecionado esse composto e essa linhagem de células para a investigação de mecanismos de ação antitumoral *in vitro*.

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

Linhagem celular	IC**(%)				
	AMTAC-10	AMTAC-11	AMTAC-16	AMTAC-19	AMTAC-23
HCT-116	62,23 ± 0,99*	55,11 ± 1,30*	46,60 ± 0,74*	88,56 ± 0,58*	33,41 ± 0,24*
HeLa	NT	NT	NT	78,45 ± 0,42	11,67 ± 0,47
SK-MEL-28	NT	NT	NT	62,28 ± 1,59	1,68 ± 1,59
MCF-7	36,32 ± 0,79	19,24 ± 0,67	39,31 ± 0,76	66,21 ± 1,30	20,82 ± 1,39
PC-3	NT	NT	NT	56,38 ± 1,39	0 ± 0,85
L929	NT	NT	NT	70,42 ± 1,74	11,93 ± 1,91
HaCat	NT	NT	NT	88,08 ± 0,35	NT

Fonte: SOUSA, 2020

Legenda: Dados foram obtidos de um experimento realizado em quadruplicata e apresentados em valores de porcentagem de inibição obtidos a partir da média ± erro padrão da média em comparação com o controle negativo. Linhagens celulares: HCT-116 – Carcinoma colorretal, HeLa – Colo do útero, SK-MEL-28 – Melanoma, MCF-7 – Adenocarcinoma de mama, PC-3 – Carcinoma de próstata, L929 – Fibroblasto murino e HaCat – Queratinócito humano.

* $p < 0,05$ comparado ao grupo controle

**IC: Inibição do crescimento (porcentagem)

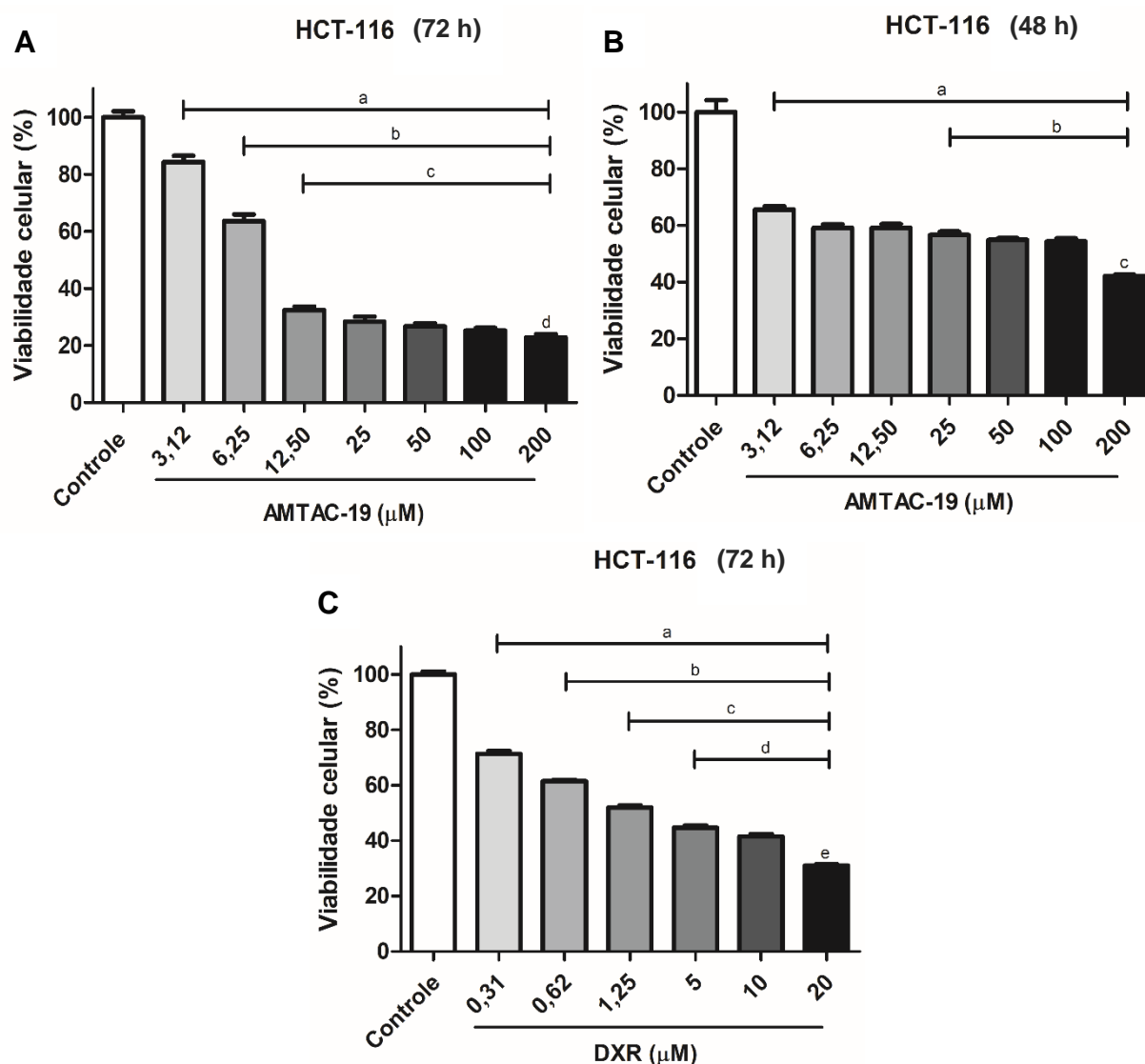
NT: Não testado

5.2 Avaliação dos efeitos de AMTAC-19 sobre a viabilidade de células tumorais e não tumorais

AMTAC-19 reduziu significativamente a viabilidade de células tumorais da linhagem HCT-116 (Figura 6A), apresentando CI_{50} de $10,35 \pm 1,66 \mu\text{M}$, após 72 horas. A viabilidade de células HCT-116 também foi avaliada após o tratamento de 48 horas com AMTAC-19 (Figura 6B). Pode-se observar que este composto reduziu significativamente a viabilidade celular, com CI_{50} de $107,4 \pm 1,64 \mu\text{M}$.

A doxorubicina, usada como droga padrão, reduziu a viabilidade celular (Figura 6C), com valor de CI_{50} determinado em $2,5 \pm 0,001 \mu\text{M}$, após 72 horas.

Figura 6. Efeito de AMTAC-19* e doxorrubicina** sobre a viabilidade de células da linhagem HCT-116 após 72 e 48 horas de tratamento



Fonte: SOUSA, 2020

Legenda: Dados são expressos como média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes em quadruplicata analisados por ANOVA seguido por Tukey.

No gráfico **A** (72 h): ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo AMTAC-19 (3,12 μM); ^c $p < 0,05$ comparado ao grupo AMTAC-19 (6,25 μM); ^d $p < 0,05$ comparado ao grupo AMTAC-19 (12,50 μM). No gráfico **B** (48 h): ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo AMTAC-19 (3,12 μM); ^c $p < 0,05$ comparado ao grupo AMTAC-19 (6,25 à 100 μM). No gráfico **C** (72 h): ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo DXR (0,31 μM); ^c $p < 0,05$ comparado ao grupo DXR (0,62 μM); ^d $p < 0,05$ comparado ao grupo DXR (1,25 μM); ^e $p < 0,05$ comparado ao grupo DXR (5 e 10 μM).

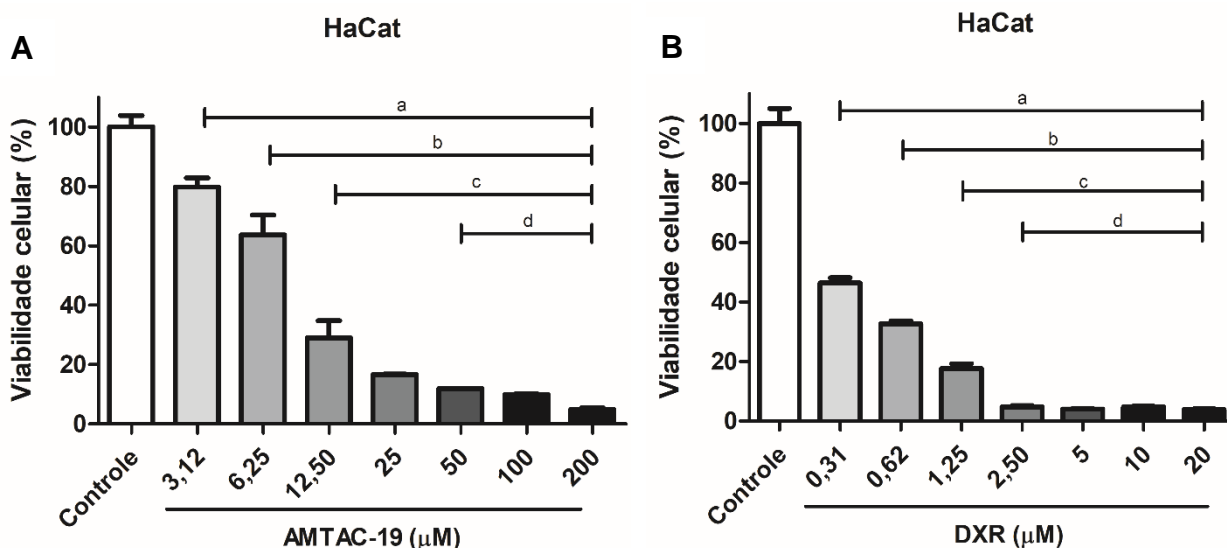
*AMTAC-19: (E)-1'-((4-bromo-benzilideno)amino)5'-oxo-1'5'-dihidro-10h-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

**DXR: droga padrão doxorrubicina

Foi também avaliada a viabilidade de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs), coletadas de voluntários saudáveis, bem como de linhagem de células não tumoral (HaCat), após tratamento com AMTAC-19 por 72 h.

A viabilidade em HaCat (Figura 7A) foi significativamente reduzida por AMTAC-19, com o valor de CI_{50} de $8,19 \pm 1,10 \mu\text{M}$, e para a doxorrubicina (Figura 7B), o valor de CI_{50} foi de $0,28 \pm 0,001 \mu\text{M}$.

Figura 7. Efeito de AMTAC-19* e doxorrubicina** sobre a viabilidade de células da linhagem não tumoral HaCat após 72 horas de tratamento



Fonte: SOUSA, 2020

Legenda: Dados são expressos como média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes em quadruplicata analisados por ANOVA seguido por Tukey.

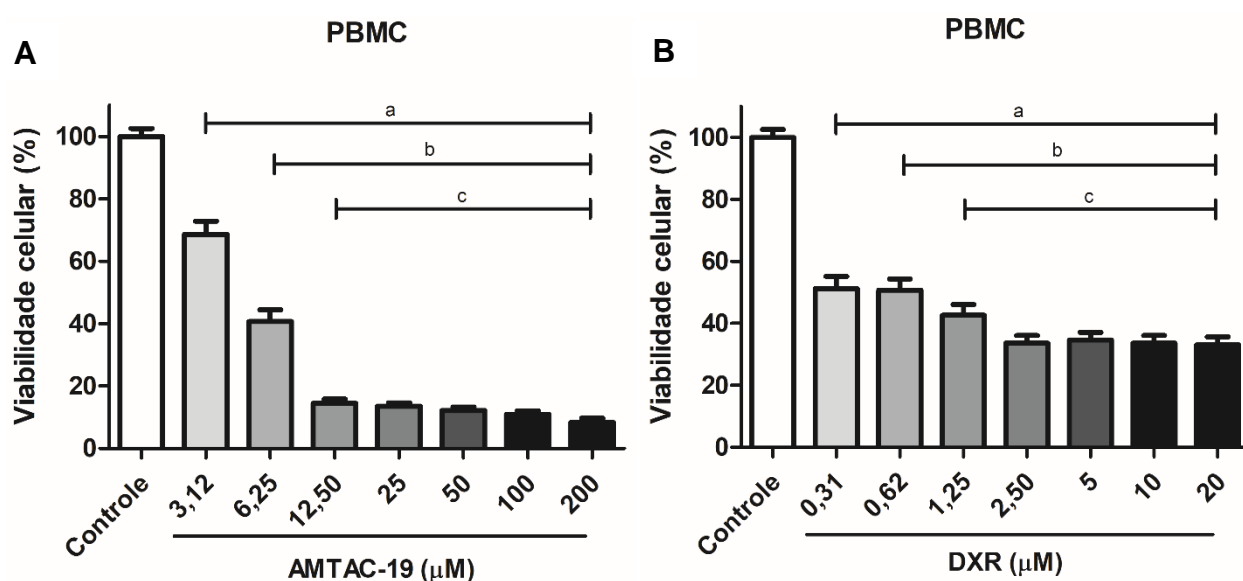
No gráfico **A**: ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo AMTAC-19 (3,12 μM); ^c $p < 0,05$ comparado ao grupo AMTAC-19 (6,25 μM); ^d $p < 0,05$ comparado ao grupo AMTAC-19 (12,50 μM); No gráfico **B**: ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo DXR (0,31 μM); ^c $p < 0,05$ comparado ao grupo DXR (0,62 μM); ^d $p < 0,05$ comparado ao grupo DXR (0,62 μM).

* AMTAC-19: (E)-1'-((4-bromo-benzilideno)amino)5'-oxo-1'5'-dihidro-10h-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

**DXR: doxorrubicina

Para PBMCs, o AMTAC-19 (Figura 8A) exibiu valor de CI_{50} de $4,89 \pm 1,18 \mu\text{M}$, enquanto a droga padrão doxorubicina (Figura 8B) apresentou valor de CI_{50} de $0,05 \pm 0,002 \mu\text{M}$.

Figura 8. Efeito de AMTAC-19* e DXR** sobre a viabilidade de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) após 72 horas de tratamento



Fonte: SOUSA, 2020

Legenda: Dados são expressos como média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes em quadruplicata analisados por ANOVA seguido por Tukey.

No gráfico **A**: ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo AMTAC-19 (3,12 μM); ^c $p < 0,05$ comparado ao grupo AMTAC-19 (6,25 μM);

No gráfico **B**: ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo DXR (0,31 μM); ^c $p < 0,05$ comparado ao grupo DXR (0,62 μM).

* AMTAC-19: (E)-1'-((4-bromo-benzilideno)amino)5'-oxo-1'5'-dihidro-10h-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

**DXR: doxorubicina

Os valores de CI_{50} do AMTAC-19 e doxorubicina estão expressos na tabela 2, juntamente com o índice de seletividade desses compostos.

Tabela 2. Valores de CI_{50} (μM) de AMTAC-19* e doxorrubicina** em células HCT-116, HaCat e PBMC, após 72 h de tratamento

Células	CI_{50}^{***} (μM)			IS^{****}	
	AMTAC-19	AMTAC-19	DXR	AMTAC-19	DXR
	(48 h)	(72 h)	(72 h)	(72 h)	(72 h)
HCT-116	107,4 \pm 1,64	10,35 \pm 1,66	2,5 \pm 0,001	-	-
HaCat	NT	8,19 \pm 1,10	0,28 \pm 0,001	0,79	0,10
PBMC	NT	4,89 \pm 1,18	0,05 \pm 0,002	0,47	0,02

Fonte: SOUSA, 2020

Legenda: Dados são expressos como média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes em quadruplicata analisados por ANOVA seguido por Tukey. HCT-116: carcinoma colorretal; HaCat: queratinócito humano; PBMC: células mononucleares de sangue periférico humano.

* AMTAC-19: (*E*)-1'-((4-bromo-benzilideno)amino)5'-oxo-1'5'-dihidro-10h-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

**DXR: doxorrubicina.

*** CI_{50} : concentração que inibe 50% de inibição do crescimento celular.

****IS: índice de seletividade (CI_{50} da célula não tumoral – HaCat ou PBMC)/ CI_{50} da célula tumoral – HCT-116)

NT: Não testado.

5.3 Investigação do mecanismo de ação antitumoral *in vitro*

Para a investigação do mecanismo de ação antitumoral de AMTAC-19 foram utilizadas duas concentrações (10 e 20 μM), selecionadas a partir do valor da CI_{50} do composto em linhagem de células HCT-116 (o valor da CI_{50} e o dobro da CI_{50}). As análises foram realizadas após 48 h de tratamento com AMTAC-19, com o objetivo de avaliar o processo que culmina com a morte celular observada.

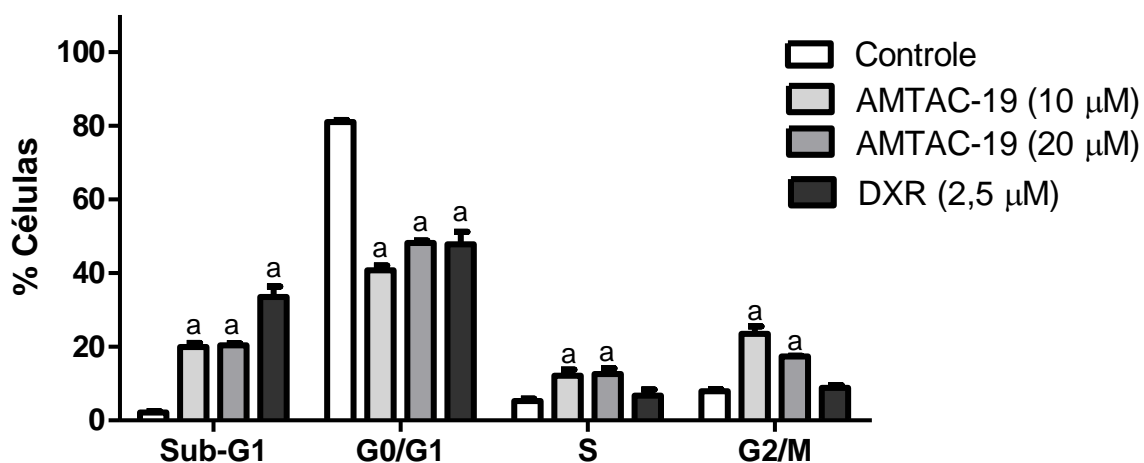
5.3.1 Avaliação dos efeitos de AMTAC-19 sobre o ciclo celular

AMTAC-19 induziu alterações significativas na distribuição de células da linhagem HCT-116 nas diferentes fases do ciclo celular (Figura 9).

Pode-se observar que houve um aumento no pico sub-G1 para $19,96 \pm 1,04\%$ ($p < 0,05$) e $20,41 \pm 0,51\%$ ($p < 0,05$), após tratamento com 10 e 20 μM de AMTAC-19, respectivamente, em comparação ao grupo controle ($2,19 \pm 0,29\%$). Esse efeito foi acompanhado de uma redução na fase G0/G1 para $40,70 \pm 1,28\%$ (10 μM ; $p < 0,05$) e $48,14 \pm 0,68\%$ (20 μM ; $p < 0,05$), em relação ao grupo controle ($81,02 \pm 0,51\%$).

Ainda, foi possível observar que AMTAC-19 induziu significativo aumento no percentual de células nas fases S ($12,14 \pm 1,67\%$ em 10 μM e $12,63 \pm 1,54\%$ em 20 μM ; $p < 0,05$) e G2/M ($23,54 \pm 2,03\%$ em 10 μM e $17,39 \pm 0,20\%$ em 20 μM ; $p < 0,05$), comparado aos respectivos controles (S: $5,29 \pm 0,65\%$ e G2/M: $7,90 \pm 0,54\%$).

Figura 9. Efeito de AMTAC-19* (10 e 20 μM) e DXR** (2,5 μM) sobre a progressão do ciclo celular após 48 horas de tratamento



Fonte: SOUSA, 2020

Legenda: Dados são expressos como média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes em quadruplicata analisados por ANOVA seguido por Tukey.

^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

* AMTAC-19: (E)-1'-((4-bromo-benzilideno)amino)5'-oxo-1'5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila.

**DXR: droga padrão doxorrubicina

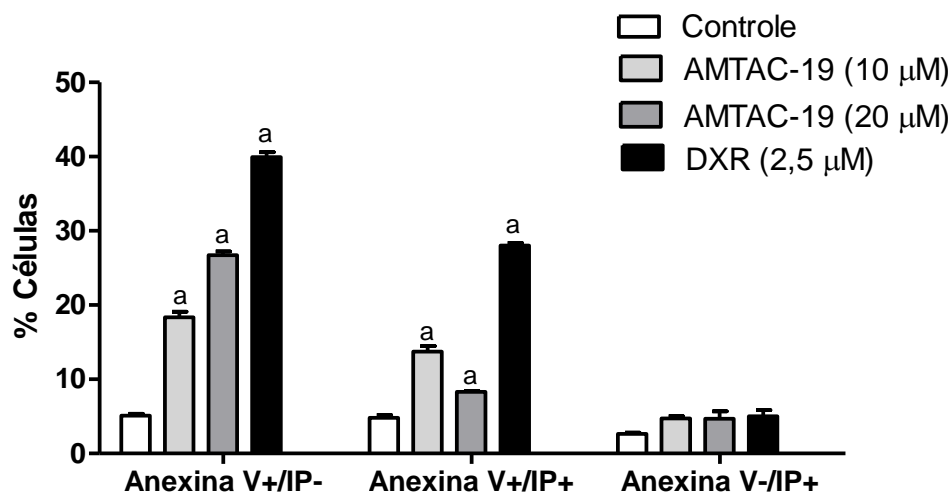
5.3.2 Avaliação do mecanismo de morte celular (apoptose/necrose)

5.3.2.1 Avaliação dos efeitos de AMTAC-19 sobre a externalização da fosfatidilserina

Após 48 h, foi observado que AMTAC-19 (10 ou 20 μM) induziu aumento no percentual de células marcadas apenas com anexina V ($18,37 \pm 1,46\%$ e $26,71 \pm 0,99$, respectivamente; $p < 0,05$ para ambas), assim como o grupo tratado com a doxorrubicina ($39,92 \pm 1,39$; $p < 0,05$) em comparação ao controle ($5,09 \pm 0,50\%$).

De forma semelhante, pode-se observar que houve aumento significativo no percentual de células duplamente marcadas após tratamento com 10 ($13,72 \pm 0,76$; $p < 0,05$) ou 20 ($8,32 \pm 0,12$; $p < 0,05$) de AMTAC-19, bem como com a doxorrubicina ($28,01 \pm 0,32$; $p < 0,05$), em comparação com o controle ($4,80 \pm 0,37$) (Figura 10). Por outro lado, não ocorreram diferença significativa entre os diferentes grupos e o controle, em relação a marcação apenas com o IP.

Figura 10. Efeito de AMTAC-19* e DXR** sobre a marcação com anexina V/IP em células HCT-116 após 48 horas de tratamento



Fonte: SOUSA, 2020

Legenda: Dados são expressos como média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes em quadruplicata analisados por ANOVA seguido por Tukey.

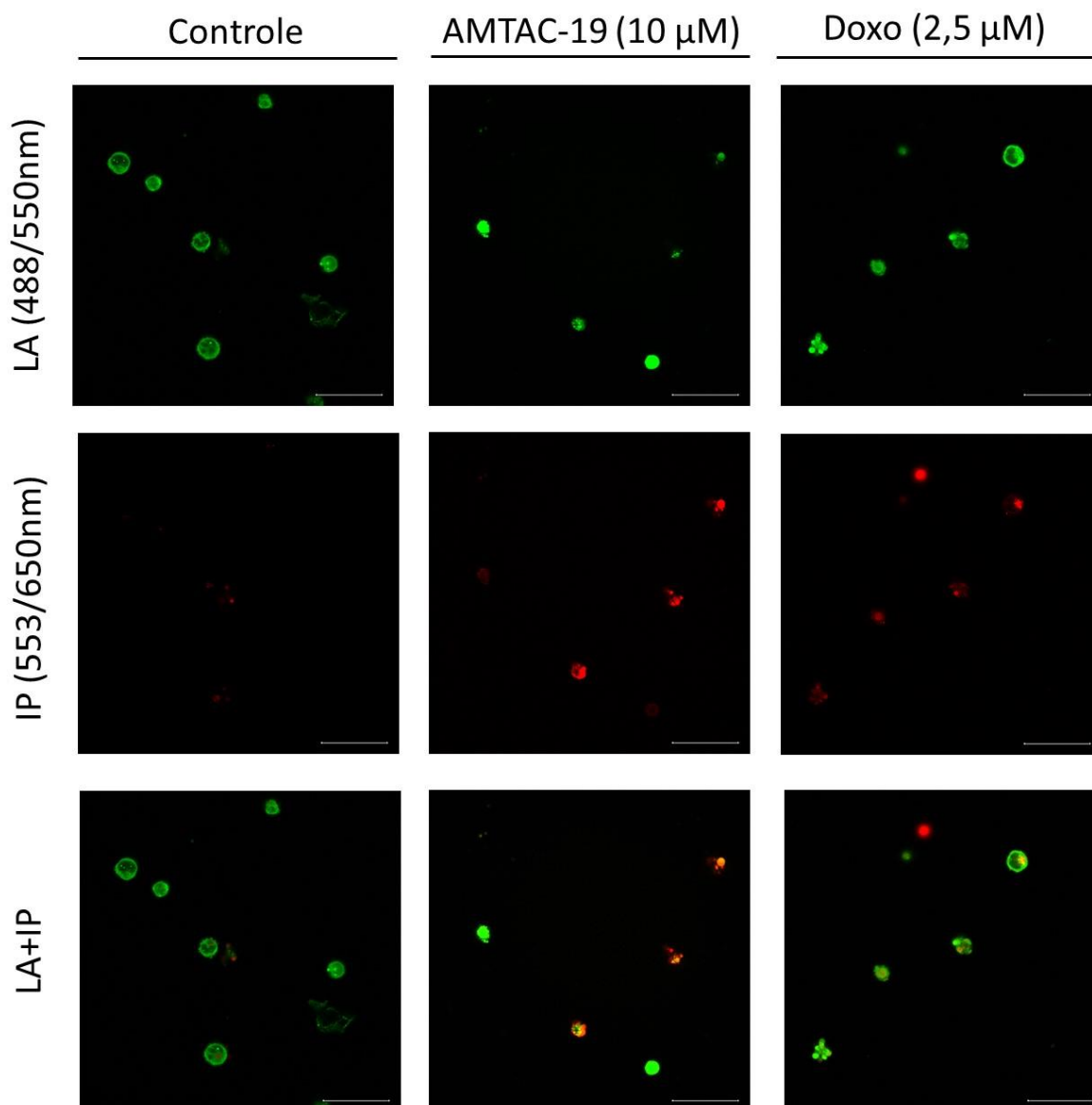
^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

*AMTAC-19: (E)-1'-((4-bromo-benzilideno)amino)5'-oxo-1'5'-dihidro-10h-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila. **DXR: droga padrão doxorrubicina

5.3.2.2 Quantificação de apoptose/necrose por microscopia confocal

A análise morfológica por microscopia confocal a laser permitiu a identificação de alterações características de apoptose, tais como, formação de prolongamentos na membrana celular (“*blebs*” da membrana), fragmentação do DNA, condensação da cromatina e a formação de corpos apoptóticos, após tratamento de 72 horas com 10 μ M de AMTAC-19 (Figuras 11 e 12).

Figura 11. Imagens representativas de células HCT-116 marcadas com LA/IP após 48 horas de tratamento com AMTAC-19* e DXR**



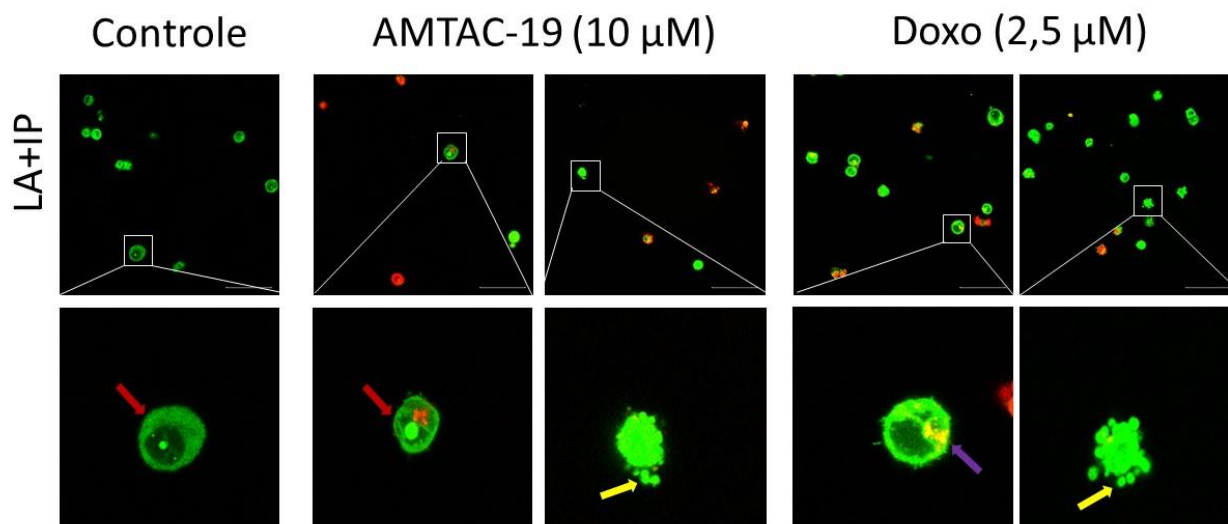
Fonte: SOUSA, 2020

Legenda: Imagens representativas de células HCT-116 após 48 horas de incubação com AMTAC-19 (10 μ M) ou doxorubicina (DXR, 2,5 μ M) como droga padrão, marcadas com laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP). As células viáveis apresentam núcleo verde claro e uma estrutura intacta; as células apoptóticas iniciais exibem um núcleo verde claro mostrando condensação da cromatina; as células apoptóticas tardias mostram áreas alaranjadas densas (verde/vermelho) de condensação da cromatina e *blebs* de membrana; e as células necróticas parecem ter núcleo vermelho.

*AMTAC-19: (E)-1'-((4-bromo-benzilideno)amino)5'-oxo-1'5'-dihidro-10h-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila.

**DXR: droga padrão doxorubicina

Figura 12. Imagens representativas ampliadas de células HCT-116 marcadas com LA/IP após 48 horas de tratamento com AMTAC-19* e DXR**



Fonte: SOUSA, 2020

Legenda: Imagens representativas ampliadas de células HCT-116, após 48 horas de incubação com AMTAC-19 (10 µM) ou doxorubicina (DXR, 2,5 µM), marcadas com laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP). Seta vermelha indica condensação da cromatina; seta amarela indica “blebs de membrana” e seta roxa indica fragmentação do DNA.

*AMTAC-19: (*E*)-1'-((4-bromo-benzilideno)amino)5'-oxo-1'5'-dihidro-10h-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila.

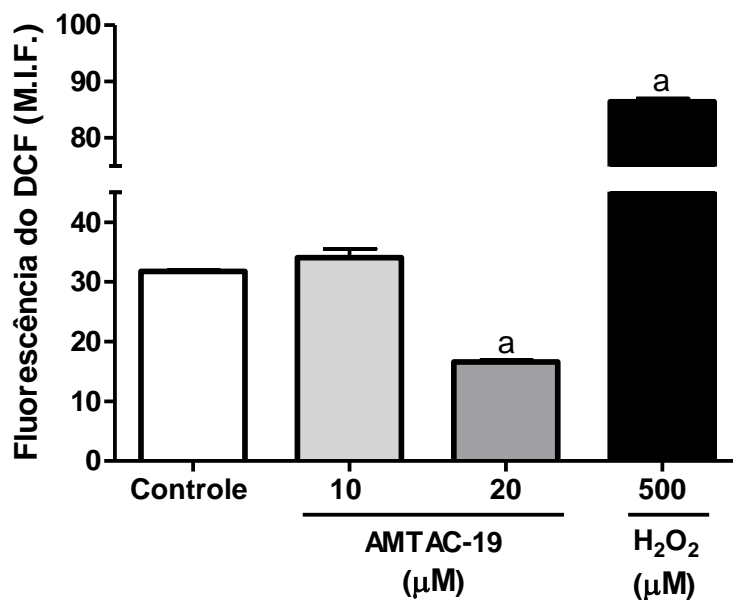
**DXR: droga padrão doxorubicina

5.3.3 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio

A Figura 13 representa o efeito do tratamento com AMTAC-19 nas concentrações 10 ou 20 µM sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em linhagem de células HCT-116, utilizando-se o ensaio do DCFH.

AMTAC-19 não alterou a produção de EROs na concentração de 10 µM ($34,07 \pm 1,47$) em relação ao grupo controle ($31,78 \pm 0,24$), no entanto, o aumento da concentração para 20 µM induziu uma redução significativa dos níveis de EROs ($16,59 \pm 0,29$; $p < 0,05$).

Figura 13. Efeito do AMTAC-19* (10 ou 20 μM) na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) após 48 horas de tratamento



Fonte: SOUSA, 2020

Legenda: Dados são expressos como média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes em quadruplicata analisados por ANOVA seguido por Tukey.

^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

*AMTAC-19: (E)-1'-((4-bromo-benzilideno)amino)5'-oxo-1'5'-dihidro-10h-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila.

Discussão

6 DISCUSSÃO

Apesar dos avanços no conhecimento das características do câncer e do desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas, o número de mortes por câncer continua aumentando (KHAN, 2018). Isso por que muitas terapias são invasivas ou inespecíficas, o que reflete em potencial toxicidade, associada também a ineficácia do tratamento que, por sua vez, pode estar relacionada ao grau de agressividade da doença ou aos mecanismos de resistência das células neoplásicas (DE ALMEIDA et al., 2015). Sendo assim, a procura por novos medicamentos para o tratamento do câncer é incessante (KHAN, 2018).

Nesse contexto, inserem-se os compostos acridínicos, os quais têm sido amplamente utilizados como agentes potenciais na terapia anticâncer por se intercalarem no DNA e inibirem a atividade de enzimas topoisomerases (ZHANG et al., 2016; CUI et al., 2016).

Vislumbrando o potencial farmacológico de compostos acridínicos para o tratamento do câncer, diversos compostos dessa classe vêm sendo sintetizados e testados em relação à atividade antitumoral e toxicidade (BATISTA, 2019; LISBOA et al., 2020; MANGUEIRA, 2019; SILVA et al., 2020; SOUSA, 2019).

Nesse sentido, o presente trabalho iniciou com a realização de uma triagem farmacológica de diferentes compostos acridínicos para avaliação da citotoxicidade em linhagens de células tumorais humanas (HCT-116, HeLa, SK-MEL-28, MCF-7 e PC-3) e não tumorais (L929 e HaCat), por meio do ensaio de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio).

Os dados de percentuais de inibição do crescimento celular após tratamento com 50 μ M mostram que todos os compostos testados (AMTAC-10, AMTAC-11, AMTAC-16, AMTAC-19 e AMTAC-23) apresentaram potencial citotóxico em diferentes linhagens celulares, todavia, o composto AMTAC-23 foi considerado o menos citotóxico, e o AMTAC-19 foi considerado o mais citotóxico para a maioria das linhagens.

Esse resultado corrobora dados da literatura que mostram potencial citotoxicidade para outros derivados acridínicos. Almeida e colaboradores (2015) sintetizaram uma série de derivados de acridina-tiossemicarbazona, sendo o

composto (Z) -2- (acridin-9-ilmetileno) -N-fenil-hidrazinocarbotioamida o mais ativo como agente antiproliferativo contra linhagem celulares de glioma (U251), leucemia (K-562), mama (MCF-7 e NCI-ADR), rim (786-0), pulmão (NCI-460), ovário (OVCAR), próstata (PC-3) e cólon (HT-29). Estudos em linhagem celular de adenocarcinoma alveolar (A549) mostraram que derivados acridínicos 3,6,9-trissubstituídos fluoretados desempenharam atividade antiproliferativa por inibir topoisomerase II e intercala-se ao DNA (NUNHART et al., 2020). Outros seis derivados da série acridina N-fenilbenzamida-4-metilamina também mostraram citotoxicidade contra células de leucemia mieloide crônica (K562), leucemia linfocítica aguda (CCRF-CEM) e linfoma histiocítico (U937) (ZHANG et al., 2019).

Comparando os dados obtidos para os diferentes compostos, pode-se inferir que o AMTAC-19 induziu maior citotoxicidade pois trata-se de um composto halogenado, que apresenta o elemento bromo (Br) na posição *para* em sua estrutura, contribuindo de forma positiva para a potencial atividade em células tumorais. Outros acridínicos *para*-substituídos também apresentaram alta citotoxicidade em diferentes linhagens de células tumorais (GOUVEIA, 2017). Então, supõe-se que a *para*-substituição no anel aromático com os elementos cloro (Cl), flúor (F) e bromo (Br) favorecem a atividade biológica. Estudos adicionais devem ser realizados para avaliar a ação de AMTAC-19 sobre as topoisomerasas e a possível estabilização de um complexo ternário (DNA, AMTAC-19 e a topoisomerase) pela presença do elemento Br no anel aromático. A formação desse complexo pode levar o aumento do período de clivagem do DNA e o impedindo o religamento das fitas não ocorre, induzindo o mecanismo de morte celular programada (ALMEIDA et al., 2016).

O composto AMTAC-19 apresentou seu maior efeito citotóxico frente células da linhagem de carcinoma colorretal humano HCT-116. De fato, dados da literatura demonstram a atividade antitumoral de compostos acridínicos contra células de carcinoma colorretal (BOROWA-MAZGAJ et al., 2017; FU et al., 2017). Ainda, dados recentes publicados pelo nosso grupo de pesquisa corroboram esses achados, uma vez que o híbrido tiofeno-acridínico 2-((6-Chloro-2-methoxy-acridin-9-yl)amino)-5,6,7,8-tetrahydro-4H-cyclohepta[b]-thiophene-3-carbonitrile (ACS03) induziu citotoxicidade seletiva para células HCT-116 (LISBOA et al., 2020).

O câncer colorretal é responsável por 10% dos casos de câncer diagnosticados por ano em todo o mundo, considerado o segundo câncer mais acometido pelas

mulheres e o terceiro em homens (BRAY et al., 2018). O índice de mortalidade nas mulheres é aproximadamente 25% menor comparado aos homens, e varia de acordo com o desenvolvimento do país. Sendo assim, o processo de globalização e o crescimento dos países implica no aumento da incidência de câncer colorretal no mundo, aproximadamente 2,5 milhões de novos casos em 2035 (ARNOLD et al., 2017).

Neste contexto, vários fatores extrínsecos contribuem para predisposição da doença, tais como tabagismo (BOTTERI et al., 2008), ingestão excessiva de álcool (CAI et al., 2014), obesidade (KYRGIU et al., 2017) e ingestão de carne vermelha (CHAN et al., 2011). Esses fatores impulsionam para o desenvolvimento do câncer colorretal, característico pela formação de uma cripta aberrante a partir de células troncos com alterações genéticas e epigenéticas (MUZNY et al., 2012), que inativam genes supressores de tumor e ativam oncogênese responsáveis pela progressão da lesão e desenvolvimento da neoplásica (MEDEMA, 2013; NASSAR; BLANPAIN, 2016).

Os avanços no diagnóstico e a compreensão fisiopatológica ampliam as opções de tratamento, que incluem excisão cirúrgica, radioterapia pré-operatória e terapia sistêmica, quimioterapia e imunoterapia (DEKKER et al., 2019). No entanto, tais terapias são limitantes, pois as células-tronco e a heterogeneidade do tumor são capazes de aumentar o potencial de auto-renovação das células tumorais favorecendo o desenvolvimento de resistência as terapias convencionais (MANHAS et al., 2016).

Dados da literatura mostram o potencial farmacológico de compostos acridínicos contra células de carcinoma colorretal (LISBOA et al., 2020). Neste trabalho, os resultados obtidos com AMTAC-19 indicam que o composto foi capaz de induzir efeito antitumoral em células de carcinoma colorretal HCT-116.

Portando, o derivado espiro-acridínico AMTAC-19 foi selecionado para a continuação dos estudos e investigação dos possíveis mecanismos de ação envolvidos na sua atividade antitumoral.

Em seguida, para melhor caracterizar o efeito citotóxico de AMTAC-19, seus efeitos sobre a viabilidade de células tumorais HCT-116 foram avaliados após diferentes períodos de tratamento (48 e 72 horas). Nessas células, os dados da

concentração que inibe 50% do crescimento celular (CI_{50}) sugerem que o tratamento de 48 horas foi menos efetivo que o tratamento de 72 horas.

A utilização de ensaios toxicológicos que avaliem possíveis alterações em nível celular e tecidual são fundamentais para o desenvolvimento de novos agentes anticâncer mais eficazes e menos tóxicos (DE MELO REGO et al., 2017). Assim, para avaliar o balanço entre a toxicidade e a atividade farmacológica, a citotoxicidade de AMTAC-19 foi estudada em células não tumorais (HaCat e PBMC) após 72 horas de tratamento, e o índice de seletividade para células HCT-116 foi calculado em relação as duas células não tumorais.

Observou-se que AMTAC-19 possui potencial citotóxico também para células não tumorais, o que já é descrito na literatura para outros compostos dessa classe (ALMEIDA et al., 2015). Em contrapartida, a droga padrão utilizada, doxorrubicina, exibiu potencial citotóxico para as células não tumorais superior ao induzido pelo AMTAC-19, o que pode ser confirmado pelo índice de seletividade maior do AMTAC-19 para células HCT-116 em comparação com o índice obtido para a doxorrubicina.

Então, sabendo-se que todas as drogas antineoplásicas disponíveis na clínica apresentam significativa toxicidade e levam ao surgimento de vários efeitos colaterais, como mielossupressão, alopecia, náuseas, vômitos (DICKENS; AHMED, 2018), a observação de citotoxicidade em células não tumorais induzida pelo AMTAC-19 não é um fator limitante para a continuação dos estudos e caracterização de sua atividade farmacológica.

Para a investigação do mecanismo de ação antitumoral, foram escolhidas duas concentrações de AMTAC-19, a saber, o valor da CI_{50} (10 μ M) e o dobro da CI_{50} (20 μ M), e o tempo de tratamento selecionado para análise foi de 48 horas, considerando que o objetivo era identificar os processos que ocorrem durante a morte celular induzida pelo composto.

Inicialmente foi investigado o efeito de AMTAC-19 sobre a distribuição de células HCT-116 nas diferentes fases do ciclo celular, uma vez que, diversas drogas antineoplásicas atuam nesse processo, tais como o 5-fluorouracil (5-FU), metotrexato, tioguanina (6-TG), doxorrubicina (TRENDOWSKI, 2015), além de compostos acridínicos (BOROWA-MAZGAJ et al., 2017; SILVA et al., 2020).

Na análise do ciclo celular, o AMTAC-19 induziu um aumento no conteúdo de DNA sub-diploide, evidenciado pelo aumento no pico sub-G1. No contexto do estudo

do ciclo celular, as células na fase G0/G1 apresentam ploidia típica ($2n$), as células na fase S apresentam uma maior quantidade de DNA ($>2n$), e as células que estão prestes a sofrer citocinese ($4n$) indicam a fase fase G2/M. Então, as células situadas no pico hipodiploide sub-G1 possuem conteúdo de DNA menor que $2n$ e podem representar aumento na ocorrência de DNA fragmentado, característico de apoptose (ZAVERI; DHAWAN, 2018).

O resultado encontrado para o AMTAC-19 corrobora dados obtidos por Silva e colaboradores (2020) que mostraram que o composto AMTAC-17 induziu um aumento no pico sub-G1, associado a uma diminuição na fase G0/G1 em modelo *in vivo* de carcinoma ascítico de Ehrlich (SILVA et al., 2020). Estudos realizados com outro derivado acridínico mostraram um aumento significativo na fração de células sub-G1, vinculada a redução do conteúdo de DNA em células do carcinoma epitelial do ducto pancreático (Panc-1) e células de carcinoma epitelial de pâncreas (MiaPaCa-2), característico da fase de apoptose em estudos *in vitro* (BOROWA-MAZGAJ et al., 2017).

Além disso, foi também possível observar que AMTAC-19 causou parada no ciclo celular nas fases S e G2/M. Muitos compostos anticâncer exercem seu efeito inibidor sobre o crescimento, a síntese do material genético e a progressão do ciclo celular por agirem em um determinado ponto de verificação do ciclo celular ou por indução de apoptose, ou uma combinação de ambos (KOVVURI et al., 2018). Os agentes antimetabólitos, por exemplo, exercem seus efeitos por bloquearem bioquimicamente a síntese do DNA, sendo específicos para atuarem na fase S do ciclo celular, como metotrexato (MXT), 5-fluorouracil (5-FU) e 6-mercaptopurina (6-MP) (CHEN et al., 2017).

Nesse sentido, pode-se sugerir que AMTAC-19 induziu um acúmulo de células na fase S, o que está associado a uma parada no ciclo celular, impedindo a síntese do material genético e a multiplicação celular. Esse dado corrobora efeitos semelhantes observados para os derivados acridínicos de 9- (2- (1-ariletilideno) hidrazinil), que levaram a uma parada no ciclo celular na fase S. Os autores sugeriram então que o mecanismo de ação desses derivados envolve a ligação à topoisomerase I, que pode bloquear a replicação do DNA, e interromper o ciclo na fase S, implicando na indução de apoptose (HAIDER et al., 2019).

Já o efeito em induzir parada no ciclo celular na fase G2/M é um indicativo de ação antimitótica. Considerando que compostos acridínicos são conhecidos como intercalantes de DNA e inibidores de topoisomerasas, o que está associado a ação antimitótica, testes adicionais devem ser realizados para avaliar a possível inibição desta enzima pelo AMTAC-19. Vários inibidores de topoisomerase utilizados clinicamente atuam inibindo a mitose, por exemplo, etoposídeo (KATZ; BALTZ, 2016), vimblastina e paclitaxel (PHAM et al., 2019).

Dados da literatura mostram que diferentes derivados da acridina, que são inibidores de topoisomerase, bloqueiam o ciclo celular em G2/M e induzem parada na fase G2/M com acúmulo transitório de células nesse compartimento (BOROWA-MAZGAJ et al., 2017); NUNHART et al., 2020). A parada do ciclo celular nessa fase é um importante sinal para que ocorra reparo nos danos celulares. Se não ocorrer o reparo, mecanismos apoptóticos são frequentemente ativados (KHWAJA et al., 2018).

Na sequência, considerando os dados que indicam a indução de apoptose na análise do ciclo celular, os efeitos de AMTAC-19 sobre o processo de morte celular (apoptose/necrose) foram investigados.

Em análise por citometria de fluxo, os dados para o AMTAC-19 mostram que houve um aumento no percentual de células marcadas com anexina V, que é capaz de se ligar a fosfatidilserina, um fosfolípido externalizado em células apoptóticas, sendo este um importante indicador de apoptose inicial. Ainda, houve um aumento das células duplamente marcadas (anexina V+/IP+), o que é indicativo de apoptose tardia/necrose, uma vez que, nesse caso, houve marcação celular com o IP, o que sugere perda da integridade da membrana plasmática.

Após tratamento com o AMTAC-19, em análise por microscopia confocal, foi possível observar alterações morfológicas nas células, como a presença de *blebs* de membrana, fragmentação do DNA e condensação da cromatina. Todas essas alterações morfológicas confirmam a indução de apoptose pelo composto acridínico em estudo.

Dados da literatura mostram que outros derivados acridínicos induzem morte celular por apoptose, como o 5'-oxo-1'-fenil-1',5'-diidro-10h-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (ACMD) que aumentou o percentual de células marcadas com anexina V/PI (SOUSA, 2019). O composto 9-cloro-2-(3-(dimetilamino) propil) pirrolo [2,3,4-kl] acridin-1 (2H) -ona induziu danos no DNA e apoptose mediada pela caspase -8 em

células de linhagens carcinoma colorretal (HCT-116, LoVo e DLD1) (FU et al., 2017). Borowa-Mazgaj e colaboradores (2017) evidenciaram o potencial apoptótico do 9-(2'-hidroxietilamino)-4-metil-1-nitroacridina em células Panc-1 e células MiaPaCa-2, e o 9-(2-carbetoxil)etilamino-3-nitroacridina em células de adenocarcinoma mamário (MCF-7 e MDA-MB-231), nas quais foram observadas alterações morfológicas características de apoptose, como condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos. Ainda, os compostos derivados de acridina tiossemicarbazidas em células MT-4 (leucemia linfoblástica aguda) induziram alterações morfológicas como *blebs* de membrana e corpos apoptóticos, indicando a apoptose das células (CHEN et al., 2019).

No câncer, espécies reativas de oxigênio (EROs) exercem efeito dual (pró-tumoral ou citotóxico), a depender dos níveis de exposição celular a essas espécies. Nesse contexto, células tumorais aumentam a produção de EROs que atuam como moléculas de sinalização celular promovendo transformação celular, estimulando o crescimento e proliferação, inibindo vias pró-apoptóticas e favorecendo a invasão e metástase (PRASAD; GUPTA; TYAGI, 2017). O aumento nos níveis de EROs promove o desequilíbrio da sinalização celular e potencializa a expressão de genes, culminando na proliferação celular descontrolada e formação e manutenção do tumor. Além disso, estas espécies induzem a expressão de genes supressores da apoptose, gerando instabilidade genômica, o que leva a diminuição da defesa antioxidante do organismo contra metástase (FIOCCHETTI et al., 2019; MOLONEY; COTTER, 2018)).

Nesse contexto, apesar do mecanismo de citotoxicidade induzido por EROs ser bem caracterizado, quando ocorre a indução de estresse oxidativo por drogas citotóxicas, tais como doxorrubicina, gencitabina e camptotecina (GALADARI et al., 2017), o mecanismo de inibição de EROs em células tumorais pode ser uma alternativa terapêutica contra o câncer (LI et al., 2014). De fato, drogas antitumorais têm mostrado efeito antioxidante associado à atividade antitumoral (CHIEN et al., 2018; SÁEZ et al., 2018) incluindo compostos acridínicos (HAIDER et al., 2019).

Os dados obtidos para o AMTAC-19 mostram que houve redução de EROs em células HCT-116, sugerindo que o efeito antioxidante está envolvido no mecanismo de ação antitumoral. Esses dados corroboram os achados de Sousa (2019) que mostram que o derivado acridínico ACMD, em modelo de tumor de Ehrlich, também induziu redução dos níveis de EROs. Outros compostos acridínicos mostram efeitos

semelhantes, por exemplo, o os derivados acridínicos de 9- (2- (1-ariletilideno) hidrazinil, induziu efeito antioxidante em células HeLa (HAIDER et al., 2019).

Considerando todos os dados apresentados, pode-se inferir que AMTAC-19 apresenta efeito antitumoral *in vitro* na linhagem de carcinoma colorretal HCT-116, com mecanismos de ação envolvendo alterações no ciclo celular, indução de apoptose e efeito antioxidante. Sendo assim, esse trabalho caracteriza um novo composto espiro-acridínico com potencial antitumoral promissor, o que subsidia a realização de estudos não-clínicos e clínicos adicionais, com o objetivo de contribuir com a descoberta de novos candidatos a fármacos para o tratamento do câncer.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

Com base nos estudos *in vitro* realizados, foi possível concluir que:

- Os compostos acridínicos testados induziram citotoxicidade em diferentes linhagens de células tumorais e não tumorais, sendo o AMTAC-23 o composto menos citotóxico, e o AMTAC-19 o composto mais citotóxico;
- AMTAC-19 induziu o mais potente efeito antitumoral *in vitro* em células de carcinoma colorretal HCT-116, após 72 horas de tratamento;
- O mecanismo de ação antitumoral de AMTAC-19 envolve a interferência no ciclo celular (parada em S e G2/M), a indução de apoptose e efeito antioxidante.

Referências

REFERÊNCIAS

- ALIMBETOV, D. et al. Pharmacological Targeting of Cell Cycle, Apoptotic and Cell Adhesion Signaling Pathways Implicated in Chemoresistance of Cancer Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1690, 6 jun. 2018.
- ALMEIDA, S. M. V. DE et al. New spiro-acridines: DNA interaction, antiproliferative activity and inhibition of human DNA topoisomerases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 467–475, nov. 2016.
- ANSARIZADEH, F.; SINGH, M.; RICHARDS, D. Modelling of tumor cells regression in response to chemotherapeutic treatment. **Applied Mathematical Modelling**, v. 48, p. 96–112, ago. 2017.
- ARNOLD, M. et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. **Gut**, v. 66, n. 4, p. 683–691, abr. 2017.
- ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582–1614, dez. 2015.
- BARROS, F. W. A. et al. Synthesis and cytotoxic activity of new acridine-thiazolidine derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 11, p. 3533–3539, jun. 2012.
- BATISTA, T. M. Toxicidade e atividade antitumoral do derivado acridínico (E)-1'-{(4-flúorbenzilideno)-amino}-5'oxo-1,5'diidro-10H-espiro[acridina- 9,2'-pirrol]-4'carbonitrila (AMTAC-07). **Tese de Doutorado. Universidade Federal da Paraíba**, p. 127, 2019.
- BONELLI, M. et al. Multiple effects of CDK4/6 inhibition in cancer: From cell cycle arrest to immunomodulation. **Biochemical Pharmacology**, v. 170, n. September, p. 113676, dez. 2019.
- BOOTH, L. A.; ROBERTS, J. L.; DENT, P. The role of cell signaling in the crosstalk between autophagy and apoptosis in the regulation of tumor cell survival in response to sorafenib and neratinib. **Seminars in Cancer Biology**, n. January, p. 0–1, 2019.
- BOROWA-MAZGAJ, B. et al. The overexpression of CPR and P450 3A4 in pancreatic cancer cells changes the metabolic profile and increases the cytotoxicity and pro-apoptotic activity of acridine antitumor agent, C-1748. **Biochemical Pharmacology**, v. 142, p. 21–38, out. 2017.

BOTTERI, E. et al. Smoking and Colorectal Cancer. **JAMA**, v. 300, n. 23, p. 2765, 17 dez. 2008.

BOWARD, B.; WU, T.; DALTON, S. Concise Review: Control of Cell Fate Through Cell Cycle and Pluripotency Networks. **STEM CELLS**, v. 34, n. 6, p. 1427–1436, jun. 2016.

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, nov. 2018.

BURSTEIN, H. J. et al. Clinical Cancer Advances 2017: Annual Report on Progress Against Cancer From the American Society of Clinical Oncology. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 12, p. 1341–1367, 20 abr. 2017.

CAI, S. et al. Alcohol drinking and the risk of colorectal cancer death. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 23, n. 6, p. 532–539, nov. 2014.

CHAN, D. S. M. et al. Red and Processed Meat and Colorectal Cancer Incidence: Meta-Analysis of Prospective Studies. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. e20456, 6 jun. 2011.

CHATTERJEE, A.; RODGER, E. J.; ECCLES, M. R. Epigenetic drivers of tumourigenesis and cancer metastasis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 51, n. August, p. 149–159, ago. 2018.

CHEN, H. et al. Tubulin Inhibitor-Based Antibody-Drug Conjugates for Cancer Therapy. **Molecules**, v. 22, n. 8, p. 1281, 1 ago. 2017.

CHEN, R. et al. Design, synthesis, antimicrobial, and anticancer activities of acridine thiosemicarbazides derivatives. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 1–15, 2019.

CHENG, C.-W.; TSE, E. PIN1 in Cell Cycle Control and Cancer. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. NOV, p. 1–10, 26 nov. 2018.

CHIEN, J. T. et al. Antioxidant property of Taraxacum formosanum Kitam and its antitumor activity in non-small-cell lung cancer cells. **Phytomedicine**, v. 49, n. April, p. 1–10, out. 2018.

CHONG, Q.-Y. et al. A unique CDK4/6 inhibitor: Current and future therapeutic strategies of abemaciclib. **Pharmacological Research**, v. 156, p. 104686, jun. 2020.

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.

COTTU, P. et al. Letrozole and palbociclib versus chemotherapy as neoadjuvant therapy of high-risk luminal breast cancer. **Annals of Oncology**, v. 29, n. 12, p.

2334–2340, dez. 2018.

CUI, L. et al. Apoptosis induction by alantolactone in breast cancer MDA-MB-231 cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrion-dependent pathway.

Archives of Pharmacal Research, v. 41, n. 3, p. 299–313, 6 mar. 2018.

DANCSOK, A. R.; ASLEH-ABURAYA, K.; NIELSEN, T. O. Advances in sarcoma diagnostics and treatment. **Oncotarget**, v. 8, n. 4, p. 7068–7093, 24 jan. 2017.

DARLING, S. et al. Regulation of the cell cycle and centrosome biology by deubiquitylases. **Biochemical Society Transactions**, v. 45, n. 5, p. 1125–1136, 15 out. 2017.

DE ALMEIDA, S. et al. Synthesis, DNA Binding, and Antiproliferative Activity of Novel Acridine-Thiosemicarbazone Derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 12, p. 13023–13042, 9 jun. 2015.

DE ALMEIDA, S. M. V. et al. DNA binding and Topoisomerase inhibition: How can these mechanisms be explored to design more specific anticancer agents?

Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 96, n. October, p. 1538–1556, dez. 2017.

DE LA HOZ POLO, M. et al. Surgical considerations when reporting MRI studies of soft tissue sarcoma of the limbs. **Skeletal Radiology**, v. 46, n. 12, p. 1667–1678, 7 dez. 2017.

DE LIMA SERAFIM, V. et al. New thiophene-acridine compounds: Synthesis, antileishmanial activity, DNA binding, chemometric, and molecular docking studies.

Chemical Biology & Drug Design, v. 91, n. 6, p. 1141–1155, jun. 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, p. 804–819, 20 dez. 2017.

DEKKER, E. et al. Colorectal cancer. **The Lancet**, v. 394, n. 10207, p. 1467–1480, out. 2019.

DICKENS, E.; AHMED, S. Principles of cancer treatment by chemotherapy. **Surgery (Oxford)**, v. 36, n. 3, p. 134–138, mar. 2018.

DOELLO, K. The role of trophoblastic epigenetic reprogramming in benign tumor cells on malignant progression: A molecular hypothesis. **Medical Hypotheses**, v. 113, n. August 2017, p. 68–71, abr. 2018.

FAHRENHOLTZ, C. D. et al. Design and cellular studies of a carbon nanotube-based delivery system for a hybrid platinum-acridine anticancer agent. **Journal of**

Inorganic Biochemistry, v. 165, p. 170–180, dez. 2016.

FALAHATGAR, D. et al. Expression and Evaluation of HuscFv Antibody -PE40 Immunotoxin for Target Therapy of EGFR-Overexpressing Cancers. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 4, p. 241–247, 1 nov. 2018.

FANG, Y.-P. et al. Amsacrine analog-loaded solid lipid nanoparticle to resolve insolubility for injection delivery: characterization and pharmacokinetics. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 10, p. 1019, mar. 2016.

FARRAN, B.; MÜLLER, S.; MONTENEGRO, R. C. Gastric cancer management: Kinases as a target therapy. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 44, n. 6, p. 613–622, jun. 2017.

FELIP-LEÓN, C. et al. Synthesis, spectroscopic studies and biological evaluation of acridine derivatives: The role of aggregation on the photodynamic efficiency. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 28, n. 5, p. 869–874, mar. 2018.

FIOCCHETTI, M. et al. Neuroglobin: A Novel Player in the Oxidative Stress Response of Cancer Cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1–9, 1 jul. 2019.

FU, W. et al. A novel acridine derivative, LS-1-10 inhibits autophagic degradation and triggers apoptosis in colon cancer cells. **Cell Death & Disease**, v. 8, n. 10, p. e3086–e3086, 5 out. 2017.

GAJULAPALLI, V. N. R. et al. Oestrogen receptor negativity in breast cancer: a cause or consequence? **Bioscience Reports**, v. 36, n. 6, p. 1–14, 1 dez. 2016.

GALADARI, S. et al. Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 104, n. December 2016, p. 144–164, mar. 2017.

GAO, C. et al. Synthesis and biological evaluation of benzimidazole acridine derivatives as potential DNA-binding and apoptosis-inducing agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 8, p. 1800–1807, abr. 2015.

GAO, Y. et al. Cerium oxide nanoparticles in cancer. **OncoTargets and Therapy**, v. 7, p. 835, maio 2014.

GIACOMELLO, M. et al. The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 4, p. 204–224, 18 abr. 2020.

GILL, J. G.; PISKOUNOVA, E.; MORRISON, S. J. Cancer, Oxidative Stress, and Metastasis. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 81, n. 1, p. 163–175, 2016.

GILMORE, A.; KING, L. Emerging approaches to target mitochondrial apoptosis in cancer cells. **F1000Research**, v. 8, p. 1793, 24 out. 2019.

GOUVEIA, R. G. rawny 2017.pdf. **Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual da Paraíba**, p. 129, 2017.

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

GRANT, G. D.; COOK, J. G. The Temporal Regulation of S Phase Proteins During G1. In: **Physiology & Behavior**. [s.l: s.n.]. v. 176p. 335–369.

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

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

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, mar. 2011.

HINZ, B.; LAGARES, D. Evasion of apoptosis by myofibroblasts: a hallmark of fibrotic diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, 2 dez. 2019.

HISADA, Y.; MACKMAN, N. Tissue Factor and Cancer: Regulation, Tumor Growth, and Metastasis. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 45, n. 04, p. 385–395, 16 jun. 2019.

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, 11 abr. 2016.

INCA. **Causas e Prevenção Estatísticas de câncer**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>.

JAN, R.; CHAUDHRY, G.-S. Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 9, n. 2, p. 205–218, 1 jun. 2019.

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.

KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 43, n. 2–3, p. 155–176, 6 mar. 2016.

KHAN, R. A. Natural products chemistry: The emerging trends and prospective goals. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, n. 5, p. 739–753, jul. 2018.

KHWAJA, S. et al. Antiproliferative efficacy of curcumin mimics through microtubule destabilization. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 151, p. 51–61, maio 2018.

KIMIZ-GEBOLOGLU, I.; GULCE-IZ, S.; BIRAY-AVCI, C. Monoclonal antibodies in cancer immunotherapy. **Molecular Biology Reports**, v. 45, n. 6, p. 2935–2940, 11 dez. 2018.

KIZHEDATH, A.; WILKINSON, S.; GLASSEY, J. Applicability of Traditional In Vitro Toxicity Tests for Assessing Adverse Effects of Monoclonal Antibodies: A Case Study of Rituximab and Trastuzumab. **Antibodies**, v. 7, n. 3, p. 30, 17 ago. 2018.

KLAUNIG, J. E. Oxidative Stress and Cancer. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 40, p. 4771–4778, 15 mar. 2019.

KLIESER et al. The Crosstalk of miRNA and Oxidative Stress in the Liver: From Physiology to Pathology and Clinical Implications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 21, p. 5266, 23 out. 2019.

KOENE, R. J. et al. Shared Risk Factors in Cardiovascular Disease and Cancer. **Circulation**, v. 133, n. 11, p. 1104–1114, 15 mar. 2016.

KOGURE, K. et al. Neck and Occipital Pain Caused by Deep Cervical Intramuscular Lipoma: A Surgical Case. **Journal of Nippon Medical School**, v. 84, n. 2, p. 96–99, 2017.

KOVVURI, J. et al. Design, synthesis and biological evaluation of new β -carboline-bisindole compounds as DNA binding, photocleavage agents and topoisomerase I inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 1563–1577, jan. 2018.

KYRGIUO, M. et al. Adiposity and cancer at major anatomical sites: umbrella review of the literature. **BMJ**, v. 356, p. j477, 28 fev. 2017.

LI, X. et al. A CCL2/ROS autoregulation loop is critical for cancer-associated fibroblasts-enhanced tumor growth of oral squamous cell carcinoma. **Carcinogenesis**, v. 35, n. 6, p. 1362–1370, jun. 2014.

LIANG, F. et al. The crosstalk between STAT3 and p53/RAS signaling controls cancer cell metastasis and cisplatin resistance via the Slug/MAPK/PI3K/AKT-mediated regulation of EMT and autophagy. **Oncogenesis**, v. 8, n. 10, p. 59, 9 out. 2019.

LIGUORI, I. et al. Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical Interventions in Aging**, v. Volume 13, p. 757–772, abr. 2018.

LISBOA, T. et al. Toxicity and antitumor activity of a thiophene-acridine hybrid. **Molecules**, v. 25, n. 1, 2020.

LU, Z. et al. Activation of reactive oxygen species-mediated mitogen-activated protein kinases pathway regulates both extrinsic and intrinsic apoptosis induced by arctigenin in Hep G2. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 72, n. 1, p. 29–43, 15 jan. 2020.

MANASA, V.; KANNAN, S. Impact of microRNA dynamics on cancer hallmarks: An oral cancer scenario. **Tumor Biology**, v. 39, n. 3, p. 101042831769592, 28 mar. 2017.

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

MANHAS, J. et al. Characterization of cancer stem cells from different grades of human colorectal cancer. **Tumor Biology**, v. 37, n. 10, p. 14069–14081, 9 out. 2016.

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, jun. 2019.

MEDEMA, J. P. Cancer stem cells: The challenges ahead. **Nature Cell Biology**, v. 15, n. 4, p. 338–344, 2 abr. 2013.

MENEZES, T. M. et al. Spiro-acridine inhibiting tyrosinase enzyme: Kinetic, protein-ligand interaction and molecular docking studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 289–297, fev. 2019.

MOLONEY, J. N.; COTTER, T. G. ROS signalling in the biology of cancer. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 80, p. 50–64, ago. 2018.

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.

MUNAWAR, R. et al. Synthesis of 9-Aminoacridine Derivatives as Anti-Alzheimer

Agents. **American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias**, v. 31, n. 3, p. 263–269, 17 maio 2016.

MUZNY, D. M. et al. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. **Nature**, v. 487, n. 7407, p. 330–337, 18 jul. 2012.

NAGATA, S. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. **Annual Review of Immunology**, v. 36, n. 1, p. 489–517, 26 abr. 2018.

NAPOLI, M.; FLORES, E. R. The p53 family reaches the final frontier: the variegated regulation of the dark matter of the genome by the p53 family in cancer. **RNA Biology**, v. 00, n. 00, p. 1–12, 7 jan. 2020.

NASSAR, D.; BLANPAIN, C. Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 11, n. 1, p. 47–76, 23 maio 2016.

NUNHART, P. et al. Fluorinated 3,6,9-trisubstituted acridine derivatives as DNA interacting agents and topoisomerase inhibitors with A549 antiproliferative activity. **Bioorganic Chemistry**, v. 94, n. September 2019, p. 103393, 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **OMS: câncer mata 8,8 milhões de pessoas anualmente no mundo**. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/oms-cancer-mata-88-milhoes-de-pessoas-anualmente-no-mundo/>>.

PAJUELO-LOZANO, N. et al. XPA, XPC, and XPD Modulate Sensitivity in Gastric Cisplatin Resistance Cancer Cells. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. OCT, p. 1–11, 17 out. 2018.

PHAM, J. V. et al. A Review of the Microbial Production of Bioactive Natural Products and Biologics. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. JUN, p. 1–27, 20 jun. 2019.

PRASAD, S.; GUPTA, S. C.; TYAGI, A. K. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. **Cancer Letters**, v. 387, p. 95–105, fev. 2017.

QIN, S. et al. XIAP inhibits mature Smac-induced apoptosis by degrading it through ubiquitination in NSCLC. **International Journal of Oncology**, v. 49, n. 4, p. 1289–1296, out. 2016.

REN, X. et al. Mitochondria response to camptothecin and hydroxycamptothecine-induced apoptosis in *Spodoptera exigua* cells. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 140, p. 97–104, ago. 2017.

RENVOIZÉ, C. et al. Apoptosis: Identification of dying cells. **Cell Biology and Toxicology**, v. 14, n. 2, p. 111–120, 1998.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1458–1461, 2006.

ROBERTSON, D. S. The Development of Tumor Cell Characteristics. **Journal of Cellular Physiology**, v. 229, n. 6, p. 705–710, jun. 2014.

SÁEZ, V. et al. Oligostilbenoids in *Vitis vinifera* L. Pinot Noir grape cane extract: Isolation, characterization, in vitro antioxidant capacity and anti-proliferative effect on cancer cells. **Food Chemistry**, v. 265, n. May, p. 101–110, nov. 2018.

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, mar. 2016.

SALEM, O. M. et al. Synthesis, spectral characterization, DNA binding ability and anti-cancer screening of new acridine-based derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, v. 26, n. 10, p. 2309–2321, 12 out. 2017.

SAUDE, M. DA. **Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde (SIH/SUS)/Plataforma DATASUS-NET**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def>>.

SCHMIDT, A.; LIU, M. Recent Advances in the Chemistry of Acridines. In: **Advances in Heterocyclic Chemistry**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2015. v. 115p. 287–353.

SEVER, R.; BRUGGE, J. S. Signal Transduction in Cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 4, p. a006098–a006098, 1 abr. 2015.

SHANKAR, E.; GUPTA, K.; GUPTA, S. Dietary and Lifestyle Factors in Epigenetic Regulation of Cancer. In: **Epigenetics of Cancer Prevention**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 361–394.

SHARMA, A.; BOISE, L. H.; SHANMUGAM, M. Cancer Metabolism and the Evasion of Apoptotic Cell Death. **Cancers**, v. 11, n. 8, p. 1144, 9 ago. 2019.

SHENG, J. et al. Clinical Pharmacology Considerations for the Development of Immune Checkpoint Inhibitors. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 57, n. September, p. S26–S42, out. 2017.

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, ago. 2015.

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. 1–9, 2020.

SMITH, S.; PREWETT, S. Principles of chemotherapy and radiotherapy. **Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Medicine**, v. 27, n. 7, p. 206–212, 2017.

SOUSA, T. K. G. Potencial antitumoral e toxicidade do 5'-OXO-1'-FENIL-1',5'-DIIDRO-10H-ESPIRO[ACRIDINA-9,2'-PIRROL]-4'-CARBONITRILA (ACMD). **Tese de Doutorado. Universidade Federal da Paraíba**, p. 175, 2019.

STALLAERT, W. et al. Bistable switches as integrators and actuators during cell cycle progression. **FEBS Letters**, v. 593, n. 20, p. 2805–2816, 16 out. 2019.

SUN, S. et al. Benzoquinone induces ROS-dependent mitochondria-mediated apoptosis in HL-60 cells. **Toxicology and Industrial Health**, v. 34, n. 4, p. 270–281, 5 abr. 2018.

SUTIMAN, N. et al. EGFR Mutation Subtypes Influence Survival Outcomes following First-Line Gefitinib Therapy in Advanced Asian NSCLC Patients. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 12, n. 3, p. 529–538, mar. 2017.

TAN, B. L.; NORHAIZAN, M. E. Manilkara zapota (L.) P. Royen leaf water extract triggered apoptosis and activated caspase-dependent pathway in HT-29 human colorectal cancer cell line. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 110, n. June 2018, p. 748–757, 2019.

TAN, J.; LE, A. **The Heterogeneity of Cancer Metabolism**. Cham: Springer International Publishing, 2018. v. 1063

THARMALINGAM, S. et al. Reactive nitrogen species (RNS)-resistant microbes: adaptation and medical implications. **Biological Chemistry**, v. 398, n. 11, p. 1193–1208, 26 out. 2017.

TODORIC, J.; KARIN, M. The Fire within: Cell-Autonomous Mechanisms in Inflammation-Driven Cancer. **Cancer Cell**, v. 35, n. 5, p. 714–720, maio 2019.

TRENDOWSKI, M. Recent Advances in the Development of Antineoplastic Agents Derived from Natural Products. **Drugs**, v. 75, n. 17, p. 1993–2016, 26 nov. 2015.

VALDÉS, A. F.-C. Acridine and Acridinones: Old and New Structures with Antimalarial Activity. **The Open Medicinal Chemistry Journal**, v. 5, p. 11–20, 9 mar. 2011.

VENTOLA, C. L. Cancer Immunotherapy, Part 1: Current Strategies and Agents. **P & T : a peer-reviewed journal for formulary management**, v. 42, n. 6, p. 375–383, jun. 2017.

WAHDAN-ALASWAD, R.; LIU, B.; THOR, A. D. Targeted lapatinib anti-HER2/ErbB2 therapy resistance in breast cancer: opportunities to overcome a difficult problem.

Cancer Drug Resistance, n. May, 2020.

WAINWRIGHT, M. Acridine--a neglected antibacterial chromophore. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 1–13, 1 jan. 2001.

WANG, H. et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The Lancet**, v. 388, n. 10053, p. 1459–1544, out. 2016.

WANG, J. et al. Strategies targeting angiogenesis in advanced non-small cell lung cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 32, p. 53854–53872, 8 ago. 2017.

WHITAKER, R. H.; PLACZEK, W. J. Regulating the BCL2 Family to Improve Sensitivity to Microtubule Targeting Agents. **Cells**, v. 8, n. 4, p. 346, 12 abr. 2019.

WILKES, G. Targeted Therapy: Attacking Cancer with Molecular and Immunological Targeted Agents. **Asia-Pacific Journal of Oncology Nursing**, v. 5, n. 2, p. 137, 2018.

WILSON, B. E. et al. Estimates of global chemotherapy demands and corresponding physician workforce requirements for 2018 and 2040: a population-based study. **The Lancet Oncology**, v. 20, n. 6, p. 769–780, jun. 2019.

XIE, B. et al. Cyclin B1/CDK1-regulated mitochondrial bioenergetics in cell cycle progression and tumor resistance. **Cancer Letters**, v. 443, n. November 2018, p. 56–66, fev. 2019.

YANG, H. W. et al. Competing memories of mitogen and p53 signalling control cell-cycle entry. **Nature**, v. 549, n. 7672, p. 404–408, 6 set. 2017.

YASHIN, A. I.; STALLARD, E.; LAND, K. C. **Biodemography of Aging**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2016. v. 40

YASMIN, R. et al. Epigenetic Regulation of Inflammatory Cytokines and Associated Genes in Human Malignancies. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 1–8, 2015.

YU, Z. et al. Role of apoptosis repressor with caspase recruitment domain (arc) in cancer (Review). **Oncology Letters**, p. 5691–5698, 11 out. 2019.

YUAN, K. et al. Selective inhibition of CDK4/6: a safe and effective strategy for developing anticancer drugs. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, maio 2020.

ZACHARIA, L. C. Permitted Daily Exposure of the Androgen Receptor Antagonist Flutamide. **Toxicological Sciences**, v. 159, n. 2, p. 279–289, out. 2017.

ZAVERI, L.; DHAWAN, J. Cycling to Meet Fate: Connecting Pluripotency to the Cell Cycle. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 6, n. JUN, p. 1–19, 19 jun.

2018.

ZEFFERINO et al. Gap Junction Intercellular Communication in the Carcinogenesis Hallmarks: Is This a Phenomenon or Epiphenomenon? **Cells**, v. 8, n. 8, p. 896, 14 ago. 2019.

ZHANG, B. et al. Design, synthesis and biological research of novel N-phenylbenzamide-4-methylamine acridine derivatives as potential topoisomerase I/II and apoptosis-inducing agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 29, n. 23, p. 126714, dez. 2019.

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

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, n. May, p. 1–9, ago. 2018.

Anexos

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

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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: MARIANNA VIEIRA SOBRAL CASTELLO BRANCO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 22988519.0.0000.5188

Instituição Proponente: Centro De Ciências da Saúde

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.715.689

Apresentação do Projeto:

Bem apresentado

Objetivo da Pesquisa:

Bem definido

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Realizada

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Viável e de impacto

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentados

Recomendações:

vide conclusões

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pesquisa pode ser iniciada

Considerações Finais a critério do CEP:

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

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

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



Continuação do Parecer: 3.715.689

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

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

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

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JOAO PESSOA, 20 de Novembro de 2019

Assinado por:

Eliane Marques Duarte de Sousa
(Coordenador(a))

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

Página 02 de 02