

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

SÂMIA SOUSA DUARTE

Toxicidade e potencial antitumoral do derivado espiro-acridínico (E)-1'-(4-clorobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-06)

JOÃO PESSOA - PB
2021

SÂMIA SOUSA DUARTE

Toxicidade e potencial antitumoral do derivado espiro-acridínico (E)-1'-(4-clorobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-06)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como pré-requisito para obtenção do título de **doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**.

Área de concentração: **Farmacologia**

ORIENTADORA:

Profª. Drª. Marianna Vieira Sobral

JOÃO PESSOA – PB

2021

Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

D812t Duarte, Sâmia Sousa.

Toxicidade e potencial antitumoral do derivado
espiro-acridínico (E)-1'-((4-clorobenzilideno)amino)-5'-o
xo-1',5'-diodro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carb
onitrila (AMTAC-06) / Sâmia Sousa Duarte. - João
Pessoa, 2021.
214 f.

Orientação: Marianna Vieira Sobral.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Espiro-acridínico. 2. Atividade antitumoral. 3.
Toxicidade. 4. Carcinoma Colorretal. 5. Peixe-zebra. 6.
Carcinoma ascítico de Ehrlich. I. Sobral, Marianna
Vieira. II. Título.

UFPB/BC

CDU 547.9 (043)

SÂMIA SOUSA DUARTE

Toxicidade e potencial antitumoral do derivado espiro-acridínico (E)-1'-(4-clorobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-06)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como pré-requisito para obtenção do título de doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, área de concentração Farmacologia.

Data e local da defesa: aprovada em 05 de fevereiro de 2021, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

COMISSÃO EXAMINADORA

Marianna Vieira Sobral

Profª. Drª. Marianna Vieira Sobral

(Orientador/Presidente) - Universidade Federal da Paraíba

Márcia Regina Piuvezam

Profª. Drª. Márcia Regina Piuvezam

(Examinador interno) - Universidade Federal da Paraíba

Hemerson Iury Ferreira Magalhães

Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães

(Examinador interno) - Universidade Federal da Paraíba

Glaucia Veríssimo Faheina Martins

Profª. Drª. Glaucia Veríssimo Faheina Martins

(Examinador externo) - Universidade Federal de Campina Grande

Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori

Profª. Drª. Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori

(Examinador externo) – Universidade Federal da Paraíba

Aos meus pais, **Teresa Cristina e Haroldo Guedes** (*in memoriam*), por me permitirem viver cercada de tanto amor e sempre acreditarem que o estudo seria um dos bens mais valiosos que poderiam deixar para seus filhos antes de partir.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais **Haroldo Guedes** (*in memoriam*) e **Teresa Cristina** (*in memoriam*), por serem exemplos de dedicação à educação e criação dos seus filhos. Papai e mamãe sempre acreditaram na importância dos estudos e por isso minha tese é dedicada a eles, que foram responsáveis pela minha base pessoal e profissional. Ambos infelizmente foram embora muito jovens, vítimas do câncer, mas sei que provavelmente estariam muito felizes em ver o encerramento deste ciclo.

Ao meu pai **Haroldo** por ter sido um homem íntegro, batalhador e perseverante em fazer o seu melhor para cuidar da família. Lembro-me com muito carinho da sua amorosa figura paterna na minha infância e agradeço por tudo, pois sei que lá do céu olhas por mim. A minha mãe **Teresa**, por ser uma mulher doce e amável. Agradeço especialmente pelos seus cuidados maternos que me permitiram ter a tranquilidade necessária para me dedicar aos estudos em tempo integral. Mesmo quando enfrentamos todos os altos e baixos do período em que ela estava doente, sempre se preocupava com meu bem estar. Ela vivia nossos sonhos, e por isso um deles era me ver terminar o doutorado, motivo pelo qual eu não desisti dessa caminhada quando ela partiu. Como prometido mamãe, eu consegui chegar tão longe!

A **Samara Duarte** e **Rafael Duarte**, irmãos carinhosos que sempre me apoiaram. Todos os esforços que vocês mostraram para conquistar seus objetivos serviram como exemplo para mim durante esta caminhada. Mesmo distantes fisicamente, vocês estão no meu coração. Gratidão pela nossa família!

A minha querida avó **Francisca Rolim**, por acreditar em mim, incentivando meus estudos, rezando pela minha perseverança e conquistas ou com gestos amáveis e palavras que me davam força. Esta conquista também é sua, Francisquinha.

Ao meu avô **Pedro Vieira** (*in memoriam*). Suas lindas gargalhadas ficarão guardadas em minhas lembranças para sempre.

A minha tia **Angela Glória Rolim**, que sempre foi como uma segunda mãe, me guiando e mostrando os melhores caminhos a seguir. Sou grata por sua amizade e por me amparar quando mais precisei, tal como uma mãe faz

com seu filho. Agradeço imensamente pelo amor que tens por mim, tenha certeza que é recíproco.

As minhas tias **Valderice Lacerda** e **Elizabethe Rolim**, mulheres fortes, batalhadoras, que são grandes exemplos. Agradeço por estarem presentes na minha vida, se preocupando comigo e vibrando a cada “degrau” percorrido. Amo vocês!

Ao meu marido **Nathan Luan da Costa Santos**, que caminha ao meu lado há mais de 12 anos, participando de todo meu amadurecimento construído ao longo da graduação, mestrado e doutorado. Passamos por tantas coisas neste tempo. Você enfrentou ao meu lado momentos de alegria, tristezas e batalhas. Sonhar em construir nossa família me impulsionou a dar o meu melhor nessa trajetória. Quando eu menos acreditava em mim você se mostrava companheiro, dizendo que eu era capaz de realizar isto e muito mais. Crescemos juntos e desde o início você apoiou minha evolução pessoal e profissional, mesmo que em diversos momentos isso significasse abdicar do nosso tempo juntos para que eu me dedicasse aos estudos. Mesmo diante de tantos estresses e ausências em casa, principalmente neste fim de doutorado, agradeço pela reafirmação do nosso “sim”, e a Deus, por se fazer presente em nossas vidas, mostrando que tem planos para nossa família. Tenho fé que as sementes plantadas darão frutos e seremos recompensados para viver tudo que um dia sonhamos juntos. Amo você.

A **família do meu marido**, que me acolhe diariamente e se faz presente em vários momentos importantes da minha vida desde que nos conhecemos. Em especial a meus sogros Ricardo e Thyana, tia Aline, vovó Mariinha e minha cunhada Thaynan, por todo carinho e torcida com as minhas conquistas. Agradeço por ter vocês ao meu lado, pois são muito especiais para mim.

Aos **familiares** não mencionados, mas que se alegram também com o encerramento desta importante etapa.

A minha orientadora **Marianna Vieira Sobral**, por ter me acolhido no Laboratório de Oncofarmacologia (OncoFar) mesmo com o doutorado em andamento. Agradeço pelos desafios desta fase, e por ter acreditado no meu potencial para vencer todos os obstáculos, confiando no meu trabalho. Obrigada pelo tempo dedicado à minha orientação, por nossas reuniões, discussão de artigos, troca de conhecimentos, assim como pelos valiosos

conselhos e incentivos pessoais. Você sempre teve fé que conseguiríamos concluir esta pesquisa! Sou muito grata por toda a confiança em mim depositada.

Aos membros da Banca Examinadora, **Glaucia Veríssimo, Márcia Piuvezam, Mirian Salvadori e Hemerson Magalhães** por aceitarem avaliar e contribuir com este trabalho. Tenho certeza que as sugestões aqui inseridas serão muito valiosas.

Aos professores **Ricardo Moura, Mirella da Silva, Davi Farias, Juan Gonçalves, Sandra Mascarenhas e Karina Medeiros** pelas colaborações que prestaram a este estudo, contribuindo para o aperfeiçoamento dos resultados obtidos.

Agradeço em especial a professora **Mirella da Silva**, por tudo que representa na minha vida acadêmica. Considero Mirella como minha primeira “mãe científica”, a quem eu tenho respeito e grande admiração pela pessoa íntegra e profissional exemplar que é. Responsável por grande parte do que sou hoje como pesquisadora, pois me ensinou a pensar de forma crítica, assim como foi para bancada quando necessário para transmitir seus conhecimentos na pesquisa e ensino. Não posso esquecer de agradecer também pelos inúmeros conselhos pessoais que você sempre me dava. Foi um apoio quando tive que desenvolver meu mestrado em meio à adversidades pessoais, me incentivando a não desistir e permitindo ter um tempo quando necessitava. Gratidão por acreditar tanto em mim. Que orgulho eu tenho hoje por ter me tornado um pouquinho da profissional que você é.

Aos meus colegas de trabalho e amigos do OncoFar: **Rafael Ferreira, Camyla Andrade, Ana Luiza Lopes, Valgrícia Martins, Rawny Gouveia, Renata Abrantes, Ramon Marques, Karinne Gadelha, Adeildo Júnior, Paulo Bruno e Moisés Wanderley**. Em especial a **Rafael Ferreira**, que se tornou um ombro amigo em tantos momentos difíceis, se alegrando com minhas conquistas e me ajudando diretamente a vencer algumas dificuldades dos experimentos *in vivo*. Rafa, você tem um coração gigante, muito obrigada por tanto!

A **Thaís Honorato Lisboa e Daiana Frade Silva**, minhas biólogas, companheiras de doutorado, pesquisa e que se tornaram grandes amigas durante esta trajetória. Entre alegrias e tristezas, vocês foram minha rede de

apoio em diversos momentos, e juntas conseguimos implantar com muito esforço tantas metodologias que fizeram parte dos nossos trabalhos. Fico alegre em ver que conseguimos concluir mais essa etapa em nossas vidas. A companhia diária de vocês sem dúvida foi um alicerce nessa caminhada, representando uma amizade que quero levar para minha vida. Sou grata por tudo, amo vocês!

Meus sinceros agradecimentos a **Ana Paula Gomes**, técnica do OncoFar, que se dedica com tanto carinho ao nosso laboratório. Ana é o exemplo de profissional comprometida com seu trabalho, porém, ao mesmo tempo consegue ser o reflexo de Deus em tudo que faz pelo próximo, possuindo um coração imenso, com tamanha humanidade. Ana, você é luz por onde passa!

A **Fátima de Lourdes Azevedo**, por todo apoio prestado durante os experimentos utilizando o citômetro de fluxo. Você foi indispensável para a conclusão deste estudo. Obrigada pelo seu carinho comigo todas as vezes que estivemos juntas e precisei de algo. Você é uma pessoa maravilhosa.

Ao funcionário **S. Josué** pelo cuidado em prestar os serviços em nosso laboratório com muita disposição e alegria, se preocupando com o nosso bem estar. O senhor demonstra diariamente muito amor pelo seu trabalho. Obrigada por tornar os nossos dias mais leves.

Aos **funcionários do Instituto de Pesquisa em fármacos e medicamentos** (IpeFarm), em especial às secretárias da Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PGPNSB), **Caroline Mangueira** e **Nilmar de Medeiros**, por serem prestativas e me ajudarem sempre que necessário nos assuntos burocráticos do doutorado. Vocês são profissionais excelentes!

Aos funcionários do Biotério Prof. Dr. Thomas George do IPeFarM, **Crispim Duarte** e **Roberta Parentoni**, pelo auxílio técnico e fornecimento dos camundongos.

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

A **Universidade Federal da Paraíba**, instituição na qual desenvolvi minha carreira acadêmica desde a graduação.

A todos que não foram aqui mencionados, porém contribuíram de alguma forma para realização deste sonho.

“O futuro não é um lugar onde estamos indo, mas um lugar que estamos criando. O caminho para ele não é encontrado, mas construído e o ato de fazê-lo muda tanto o realizador quanto o destino. Se tu choras por ter perdido o sol, as lágrimas te impedirão de ver as estrelas”.

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

O câncer compreende um conjunto de doenças caracterizadas pelo crescimento celular descontrolado e potencial metastático. Os tratamentos quimioterápicos atuais apresentam limitações, principalmente devido à toxicidade e ao desenvolvimento de resistência tumoral. Considerando que os compostos acridínicos são relatados como promissores agentes anticâncer, este trabalho teve como objetivo investigar a atividade antitumoral e a toxicidade do novo composto espiro-acridínico sintético (E)-1'-((4-clorobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-06), selecionado após triagem farmacológica. A atividade antitumoral *in vitro* e citotoxicidade foram avaliados pelo ensaio do MTT, utilizando células tumorais (HCT-116, HeLa, MCF-7, PC-3, MDA-MB-231, SK-MEL-28, HL-60) e não tumorais (L929, HaCat, PBMC). AMTAC-06 induziu maior citotoxicidade em células de carcinoma colorretal, HCT-116 (Cl₅₀, ou concentração inibitória média, de 12,62 µM, em 72 horas), e reduziu a viabilidade das células não tumorais (HaCaT_{Cl50}: 17,87 µM; L929_{Cl50}: 26,15 µM; PBMC_{Cl50}: 7,89 µM). Todavia, o AMTAC-06 foi menos citotóxico em comparação à droga padrão doxorrubicina (HCT-116_{Cl50}: 2,57 µM; HaCaT_{Cl50}: 0,28 µM; PBMC_{Cl50}: 0,05 µM). Para elucidar seus mecanismos de ação *in vitro*, foram avaliados os efeitos no ciclo celular, apoptose e na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), em células HCT-116 (15 e 30 µM de AMTAC-06, após 48 horas). AMTAC-06 induziu aumento na fração sub-G1 e parada do ciclo celular na fase S (p<0,05). Características morfológicas de apoptose, como formação de *blebs* na membrana, corpos apoptóticos, condensação da cromatina e fragmentação nuclear, foram observadas por microscopia confocal. Em paralelo, ocorreu aumento na quantidade de células marcadas com anexina V (p<0,05), caracterizando apoptose. Ainda, houve redução na produção de EROs (p<0,05), o que sugere efeito antioxidante. *In vivo*, a toxicidade do AMTAC-06 foi investigada em camundongos Swiss (*Mus Musculus*) e em peixe-zebra (*Danio rerio*), e a atividade antitumoral foi estudada usando o modelo de Carcinoma Ascítico de Ehrlich (CAE). AMTAC-06 não induziu toxicidade em embriões/larvas de peixe-zebra (CL₅₀, ou concentração letal média, superior a 126,2 µM) e em camundongos (DL₅₀, ou dose letal média, maior que 5000 mg/kg, i.p.). A genotoxicidade foi avaliada pelo teste do micronúcleo em sangue periférico de camundongos, sendo observado que AMTAC-06 (2000 mg/kg, i.p.) não apresentou genotoxicidade. Em modelo de CAE, AMTAC-06 (12,5 mg/kg, i.p.) reduziu a viabilidade e o total de células tumorais peritoneais (p<0,05), bem como a microdensidade dos vasos peritumorais (p<0,05), indicando efeito antiangiogênico. Ainda, houve aumento nos níveis das citocinas TNF-α e IL-1β, bem como redução de INF-γ no fluido peritoneal, caracterizando uma ação imunomoduladora associada à atividade antitumoral. A análise de parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos nos animais transplantados com Ehrlich e tratados com AMTAC-06 (12,5 mg/kg, i.p.) não evidenciou toxicidade. Em conclusão, o novo derivado espiro-acridínico AMTAC-06 apresenta atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*, com baixa toxicidade, o que indica seu potencial como um agente anticâncer.

Palavras-chave: Espiro-acridínico. Atividade antitumoral. Toxicidade. Carcinoma Colorretal. Peixe-zebra. Carcinoma ascítico de Ehrlich.

ABSTRACT

Cancer comprise an ensemble of diseases characterized by uncontrolled cell growth and metastatic potential. Current chemotherapy treatments have limitations, mainly due to toxicity and the development of tumor resistance. Considering that acridine compounds are reported as promising anticancer agents, this study aimed to investigate the antitumor activity and toxicity of the new synthetic spiro-acridine compound (E)-1'-((4-chlorobenzylidene)amino)-5'-oxo-1',5'-dihydro-10H-spiro[acridine-9,2'-pyrrole]-4'-carbonitrile (AMTAC-06), selected after pharmacological screening. *In vitro* antitumor activity and cytotoxicity was evaluated by the MTT assay, using tumor cells (HCT-116, HeLa, MCF-7, PC-3, MDA-MB-231, SK-MEL-28, HL-60) and non-tumor cells (L929, HaCat, PBMC). AMTAC-06 induced higher cytotoxicity in colorectal carcinoma cells, HCT-116 (IC_{50} , or half-maximal inhibitory concentration, of 12.62 μ M, in 72 hours), and reduced the viability of non-tumor cells (HaCaT IC_{50} : 17.87 μ M; L929 IC_{50} : 26.15 μ M; PBMC IC_{50} : 7.89 μ M). However, AMTAC-06 was less cytotoxic compared to the standard drug doxorubicin (HCT-116 IC_{50} : 2.57 μ M; HaCaT IC_{50} : 0.28 μ M; PBMC IC_{50} : 0.05 μ M). In order to elucidate its mechanisms of action *in vitro*, the effects on cell cycle, apoptosis and on the production of reactive oxygen species (ROS) in HCT-116 cells (15 and 30 μ M AMTAC-06, after 48 hours) were evaluated. AMTAC-06 induced an increase in the sub-G1 fraction and cell cycle arrest in the S phase ($p < 0.05$). Morphological characteristics of apoptosis, such as membrane blebbing formation, apoptotic bodies, chromatin condensation and nuclear fragmentation, were observed by confocal microscopy. Simultaneously, there was an increase in the number of staining cells with annexin V ($p < 0.05$), characterizing apoptosis. There was also a reduction in the production of ROS ($p < 0.05$), which suggests an antioxidant effect. *In vivo*, AMTAC-06 toxicity was investigated in Swiss mice (*Mus Musculus*) and in zebrafish (*Danio rerio*), and the antitumor activity was studied using the Ehrlich Ascites Carcinoma (EAC) model. AMTAC-06 did not induce toxicity in zebrafish embryos/larvae (LC_{50} , or mean lethal concentration, higher than 126.2 μ M) or in mice (LD_{50} , or mean lethal dose, higher than 5000 mg/kg, i.p.). Genotoxicity was assessed by the micronucleus test on peripheral blood of mice, and it was observed that AMTAC-06 (2000 mg/kg, i.p.) did not show genotoxicity. In a EAC model, AMTAC-06 (12.5 mg/kg, i.p.) reduced the viability and the total peritoneal tumor cells ($p < 0.05$), as well as the microdensity of the peritumoral vessels ($p < 0.05$), indicating antiangiogenic effect. In addition, there was an increase in the levels of cytokines TNF- α and IL-1 β , as well as a reduction in INF- γ in the peritoneal fluid, characterizing an immunomodulatory action associated with antitumor activity. The analysis of biochemical, hematological and histological parameters in animals transplanted with Ehrlich and treated with AMTAC-06 (12.5 mg/kg, i.p.) did not show toxicity. In conclusion, the new spiro-acridine derivative AMTAC-06 has antitumor activity *in vitro* and *in vivo*, with low toxicity, which indicates its potential as an anticancer agent.

Keywords: Spiro-acridine. Antitumor activity. Toxicity. Colorectal carcinoma. Zebrafish. Ehrlich ascites carcinoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Etapas da carcinogênese.....	36
Figura 2 – Características biológicas do câncer.....	38
Figura 3 – Regulação do ciclo celular em mamíferos pelos complexos ciclinas/CDKs.....	40
Figura 4 – Vias extrínseca e intrínseca da apoptose.....	48
Figura 5 – Angiogênese em condições normais e no câncer.....	50
Figura 6 – Interações entre células tumorais e seu microambiente.....	54
Figura 7 – Imunoedição tumoral.....	56
Figura 8 – Estrutura química da acridina.....	78
Figura 9 – Estrutura química dos novos derivados espiro-acridínicos sintéticos.....	81
Figura 10 – Efeito do tratamento (48 horas) com AMTAC-06* (15 μ M) e DXR** (2,5 μ M) em células HCT-116 duplamente marcadas com laranja de acridina e iodeto de propídeo.....	113-114
Figura 11 - Dotplots representativos de células HCT-116 duplamente marcadas com Anexina V- FITC e iodeto de propídeo, após tratamento (48 horas) com AMTAC-06* (15 e 30 μ M) e DXR** (2,5 μ M).....	115
Figura 12 – Embriões e larvas de peixe-zebra (<i>Danio rerio</i>) expostos ao meio E3 (controle negativo), AMTAC-06* (126,2 μ M) e ao solvente (DMSO** 0,5%), durante 96 horas.....	119
Figura 13 – Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-06* (12,5 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg)** na microdensidade dos vasos peritumorais de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.....	125

Figura 14 – Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-06* (12,5 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) na histologia do fígado dos camundongos experimentais.....	134
Figura 15 – Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-06* (12,5 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) na histologia dos rins dos camundongos experimentais.....	137
Figura 16 – Mecanismo de ação proposto para o composto AMTAC-06.....	154

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Efeito do tratamento (48 horas) com o AMTAC-06* (15 e 30 µM) e a DXR** (2,5 µM) na progressão do ciclo celular em células HCT-116.....	111
Gráfico 2 – Efeito do tratamento (48 horas) com AMTAC-06* (15 e 30 µM) e DXR** (2,5 µM) em células HCT-116 duplamente marcadas com Anexina V-FITC e iodeto de propídeo.....	116
Gráfico 3 – Efeito do tratamento (48 horas) com o composto AMTAC-06 na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células HCT-116 marcadas com H₂DCFDA.....	117
Gráfico 4 – Efeitos do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-06* (3,12; 6,5; 12,5 e 25 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) em camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.....	122
Gráfico 5 – Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-06* (12,5 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) na distribuição de células de carcinoma ascítico de Ehrlich nas diferentes fases do ciclo celular.....	124
Gráfico 6 – Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-06* (12,5 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) nos níveis de citocinas do lavado peritoneal de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.....	127
Gráfico 7 – Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-06* (12,5 mg/kg) na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.....	128

LISTA DE FLUXOGRAMA

Fluxograma 1 – Representação esquemática dos métodos utilizados no estudo da toxicidade e atividade antitumoral dos novos compostos espiro-acridínicos. *Ensaios realizados com o composto que apresentou melhor atividade antitumoral *in vitro*.....92

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Tratamento dos camundongos em modelo de Carcinoma Ascítico de Ehrlich (CAE).....101

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Características que diferenciam tumores benignos e malignos.....	33
Quadro 2 – Linhagens de células tumorais e não tumorais utilizadas no estudo.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito citotóxico dos compostos espiro-acridínicos (AMTACs) no crescimento das linhagens celulares tumorais, após 72h de exposição.....	108
Tabela 2 – Efeito do tratamento com AMTAC-06* e doxorrubicina (DXR**) na viabilidade de células HCT-116 e em células não tumorais (HaCaT, L929 e PBMC).....	109
Tabela 3 – Efeito da exposição dos embriões/larvas de peixe-zebra (<i>Danio rerio</i>) ao AMTAC-06* (7,88-126,2 μ M) e DMSO** (0,5%), após 96 horas.....	118
Tabela 4 – Efeitos da administração de dose única (i.p.) do AMTAC-06* (2000 mg/kg, i.p.) em camundongos.....	120
Tabela 5 – Efeito da administração de dose única (i.p.) de AMTAC-06* (2000 mg/kg) e ciclofosfamida (50 mg/kg) no número de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos após 48 horas do tratamento.....	121
Tabela 6 – Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-06* (12,5 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) no consumo de água e de ração, e evolução ponderal de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.....	129
Tabela 7 – Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-06* (12,5 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) nos parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.....	130
Tabela 8 – Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-06* (12,5 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) nos parâmetros hematológicos (eritrograma) do sangue periférico de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.....	131
Tabela 9 – Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-06* (12,5 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) nos parâmetros hematológicos (leucograma)	

do sangue periférico de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.....132

Tabela 10 – Índices dos órgãos de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich após tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-06* (12,5 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg).....133

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

5-FU	5-fluorouracila
AKT	Proteína quinase serina/treonina específica
ALT	Alanina Aminotransferase
AMTAC-06	(E)-1'-(4-clorobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-diidro-10H- espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APAF1	Fator de ativação de protease associada à apoptose 1
APCs	Células apresentadoras de抗ígenos
AST	Aspartato Aminotransferase
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i> (proteína)
ATP	Adenosina Trifosfato
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3-related</i> (proteína)
BAD	<i>Bcl-2 antagonist of cell death</i>
BAK	<i>Bcl-2 antagonist killer 1</i>
BAX	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B cell Lymphoma 2</i>
Bcl-xL	<i>Bcl-2 related gene long isoform</i>
bFGF	Fator de crescimento de fibroblastos básico
BID	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BIM	<i>Bcl-2 interacting mediator of cell death</i>
BM	<i>Blebs de membrana</i>
CA	Corpos apoptóticos
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CAE	Carcinoma Ascítico de Ehrlich
CAFs	Fibroblastos associados ao câncer
CAT	Catalase
CC	Condensação da cromatina
CCEN	Centro de Ciências Exatas e da Natureza
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CDKs	Quinase dependente de Ciclina

CDKIs	Inibidores de quinases dependentes de Ciclina
CHK1	<i>Checkpoint kinase 1</i>
CHK2	<i>Checkpoint kinase 2</i>
CHCM	Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média
CI₅₀	Concentração que produz 50% de inibição no crescimento celular
CL₅₀	Concentração que causa 50% de letalidade nos animais experimentais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
CTRL	Controle
DBM	Departamento de Biologia Molecular
DCs	Células dendríticas
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
DD	<i>Death domains</i> (domínios de morte)
DIABLO	<i>Direct IAP binding protein with low isoelectric point</i>
DISC	Complexo de sinalização indutor de morte
DL₅₀	Dose que causa 50% de letalidade nos animais experimentais
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DXR	Doxorrubicina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
EMT	Transição epitelial-mesenquimal
e.p.m.	Erro padrão da média
ERK	Quinase reguladora de sinal extracelular
EROs	Espécies reativas de oxigênio
F-12K	<i>Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium</i>

FADD	Proteína associada a FAS com domínio de morte
FDA	<i>Food and Drug administration</i>
FET	Teste de toxicidade aguda em embriões de peixe
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FN	Fragmentação nuclear
GHS	<i>Globally Harmonized Classification System</i>
GPx	Glutatona peroxidase
GSH	Glutatona (forma reduzida)
H₂DCFDA	2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HaCaT	Linhagem celular não tumoral de queratinócito humano
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HCT-116	Linhagem celular de carcinoma colorretal humano
HE	Hematoxilina-eosina
HER-2	Receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
HeLa	Linhagem celular de adenocarcinoma de colo do útero
HL-60	Linhagem celular de leucemia promielocítica aguda
Hpf	Horas pós fertilização
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC	Inibição do crescimento
IDO	<i>Indoleamine-2,3-dioxygenase</i>
INF	Interferon
INF α	Interferon alfa
INF β	Interferon beta
INF γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IL-1β	Interleucina 1 beta
ILC	<i>Innate lymphoid cells</i>
i.m.	Via intramuscular
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
i.p.	Via intraperitoneal
IP	Iodeto de propídeo
IPeFarM	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos

IS	Índice de seletividade
ITQ	Inibidores da tirosina quinase
L929	Linhagem celular não tumoral de fibrobrasto murino
LA	Laranja de acridina
LabRisco	Laboratório de Avaliação de Risco de Novas Tecnologias
LSVM	Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas
LTh	Linfócito T auxiliar
M1	Macrófagos do tipo 1
M2	Macrófagos do tipo 2
m-AMSA	Amsacrina
mAb	Anticorpos monoclonais
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MEC	Matriz extracelular
MCF-7	Linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano
Mcl-1	<i>Myeloid cell leukemia 1</i>
MDA-MB-231	Linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano
MDSCs	Células supressoras derivadas de origem mieloide
M.I.F.	Média da intensidade de fluorescência
MMPs	Metaloproteinases da matriz
MPT	Poro de transição de permeabilidade mitocondrial
µS	MicroSiemens (unidade relativo a condutividade elétrica)
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
ND	Não determinado
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NKs	Células <i>Natural killer</i>
NOXA	Proteínas homóloga a Bcl-2 (em latim significa “dano”)
NR	Não realizado
Nrf2	Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2
O₂⁻	Ânions superóxido
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
OH⁻	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
OncoFar	Laboratório de Oncofarmacologia
p53	Proteína tumoral citoplasmática de 53 kD

PBMC	Células mononucleares do sangue periférico humano
PBS	Tampão fostato salino
PBST	PBS contendo tween 20 a 0,05%
PC-3	Linhagem celular de carcinoma de próstata humano
PDGF	Fator de crescimento endotelial derivado de plaquetas
PDL-1	<i>Programmed cell death-ligand 1</i>
PIGF	Fator de crescimento placentário
PMME	Permeabilização da membrana mitocondrial externa
PPgPNSB	Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
pRb	Proteína do retinoblastoma
Prx	Peroxirredoxina
pSTAT6	<i>Signal transducer and activator of transcription 6</i>
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
Rb	Retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease (enzima)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SK-MEL-28	Linhagem celular de melanoma humano
SMAC	Second mitochondria derived activator of caspases
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
TAMs	Macrófagos associados ao tumor
TG	Tricrômico de Gomori
TGF	Fator de crescimento transformador
TKIs	Inibidores de tirosina quinase
TLRs	Receptores do tipo <i>Toll-like</i>
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF-R1	Receptor 1 do fator de necrose tumoral
TNF-R2	Receptor 2 do fator de necrose tumoral

Tp53	Gene da proteína tumoral citoplasmática de 53 kD
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral
Treg	Células T reguladoras
Trx	Tiorredoxina
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UniPOM	Produção de Organismos Não Convencionais
UPA	Unidade de Produção Animal
VCM	Volume corporcular médio
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VEGF-A	Fator de crescimento do endotélio vascular tipo A
VEGFR	Receptor do fator de crescimento do endotélio vascular
XIAP	Proteína inibidora da apoptose ligada ao cromossomo X

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	30
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	33
2.1	Aspectos gerais do câncer	33
2.2	Ciclo celular	39
2.3	Apoptose	44
2.4	Angiogênese	49
2.5	Microambiente tumoral	53
2.6	Estresse oxidativo e câncer	66
2.7	Farmacoterapia do câncer	69
2.8	Modelos experimentais para a avaliação de novas drogas com potencial antitumoral	73
2.9	Derivados acridínicos	77
3	OBJETIVOS	83
3.1	Objetivo geral	83
3.2	Objetivos específicos	83
4	MATERIAL E MÉTODOS	86
4.1	Locais da pesquisa	86
4.2	Material	86
4.2.1	Amostras teste	86
4.2.2	Linhagens celulares e cultivo	87
4.2.3	Obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)	89
4.2.4	Embriões de peixe-zebra (<i>Danio rerio</i>)	90
4.2.5	Camundongos e condições experimentais	91

4.3	Métodos	92
4.3.1	Estudos <i>in vitro</i>	93
4.3.1.1	Avaliação da citotoxicidade em células tumorais e não tumorais	93
4.3.1.2	Investigação do efeito antitumoral <i>in vitro</i>	94
4.3.1.2.1	Avaliação do ciclo celular	94
4.3.1.2.2	Avaliação do mecanismo de morte celular	95
4.3.1.2.2.1	Análise morfológica por microscopia confocal	95
4.3.1.2.2.2	Dupla marcação com Anexina V-FITC e iodeto de propídeo	96
4.3.1.2.3	Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)	97
4.3.2	Estudos <i>in vivo</i>	98
4.3.2.1	Ensaio toxicológico	98
4.3.2.1.1	Avaliação da toxicidade aguda em embriões e larvas de peixe-zebra (<i>Danio rerio</i>)	98
4.3.2.1.2	Avaliação da toxicidade não clínica aguda em camundongos	99
4.3.2.1.3	Avaliação da genotoxicidade	99
4.3.2.2	Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich (CAE)	100
4.3.2.2.1	Volume do tumor, massa tumoral, viabilidade e total celular	101
4.3.2.2.2	Investigação do efeito antitumoral <i>in vivo</i>	102
4.3.2.2.2.1	Análise do ciclo celular	102
4.3.2.2.2.2	Avaliação do efeito antiangiogênico	102
4.3.2.2.2.3	Quantificação de citocinas no lavado peritoneal	103
4.3.2.2.2.4	Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)	104
4.3.2.3	Avaliação da toxicidade em animais transplantados com células de carcinoma ascítico de Ehrlich	104
4.3.2.3.1	Avaliação ponderal e do consumo de água e de ração	104
4.3.2.3.2	Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos	105

4.3.2.3.3	Avaliação dos índices dos órgãos	105
4.3.2.3.4	Análises histológicas	106
4.4	Análise estatística	106
5	RESULTADOS	108
5.1	Estudos <i>in vitro</i>	108
5.1.1	Avaliação da citotoxicidade em células tumorais e não tumorais	108
5.1.2	Investigação do efeito antitumoral <i>in vitro</i>	110
5.1.2.1	Avaliação do ciclo celular	110
5.1.2.2	Avaliação do mecanismo de morte celular	112
5.1.2.2.1	Análise morfológica por microscopia confocal	112
5.1.2.2.2	Dupla marcação com Anexina V-FITC e iodeto de propídeo	114
5.1.2.3	Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)	116
5.2	Estudos <i>in vivo</i>	117
5.2.1	Ensaios toxicológicos	117
5.2.1.1	Avaliação da toxicidade aguda em embriões e larvas de peixe-zebra (<i>Danio rerio</i>)	118
5.2.1.2	Avaliação da toxicidade não clínica aguda em camundongos	119
5.2.1.3	Avaliação da genotoxicidade	120
5.2.2	Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich (CAE)	121
5.2.2.1	Volume do tumor, massa tumoral, viabilidade e total celular	121
5.2.3	Investigação do efeito antitumoral <i>in vivo</i>	123
5.2.3.1	Análise do ciclo celular	123
5.2.3.2	Avaliação do efeito antiangiogênico	124
5.2.3.3	Quantificação de citocinas no lavado peritoneal	126
5.2.3.4	Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)	128

5.2.4	Avaliação da toxicidade em animais transplantados com células de carcinoma ascítico de Ehrlich	128
5.2.4.1	Avaliação ponderal e do consumo de água e de ração	128
5.2.4.2	Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos	129
5.2.4.3	Avaliação dos índices dos órgãos	132
5.2.4.4	Análises histológicas	133
6	DISCUSSÃO	140
7	CONCLUSÃO	156
	REFERÊNCIAS	158
	ANEXOS	198
	APÊNDICE	205

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um termo genérico utilizado para definir um conjunto de doenças complexas, que guardam algumas características comuns, mas, ao mesmo tempo, extremamente diferentes em termos de sua origem, progressão, agressividade, prognóstico e tratamento (HANAHAN; WEINBERG, 2011). A formação de uma célula maligna é um processo multifatorial, envolvendo fatores externos e internos que podem atuar em conjunto para favorecer o crescimento tumoral (BLACKADAR, 2016). Nessa perspectiva, o câncer representa um problema de saúde pública em nível global, sendo uma das principais causas de morte no mundo (BRAY et al., 2018).

O tratamento padrão para o câncer de forma geral envolve as modalidades de cirurgia, radioterapia, quimioterapia, imunoterapia e terapia alvo. Embora algumas vezes as terapias utilizadas no tratamento do câncer sejam eficientes, existem efeitos secundários que são debilitantes para os indivíduos em tratamento e levam a uma redução significativa da sua qualidade de vida (FERNANDO; JONES, 2015; SMITH; PREWETT, 2017). Sendo assim, é fundamental investigar novas moléculas mais eficazes e seguras, que atuem com maior seletividade em alvos moleculares específicos das células tumorais, apresentando baixa toxicidade sistêmica para os indivíduos.

As acridinas são compostos aromáticos formados por dois anéis de benzeno fundidos a um anel de piridina no centro (KUMAR; KAUR; KUMARI, 2012; SCHMIDT; LIU, 2015), o qual pode ser alvo para diferentes modificações químicas, produzindo novas estruturas com diversas atividades biológicas (GENSICKA-KOWALEWSKA; CHOLEWIŃSKI; DZIERZBICKA, 2017). Estes agentes atuam principalmente se ligando ao DNA e inibindo as enzimas topoisomerase (DE ALMEIDA et al., 2016; GOUVEIA et al., 2018; LAFAYETTE et al., 2013).

Algumas acridinas entraram em ensaios clínicos e foram aprovadas, destacando-se a Amsacrina (m-AMSA), um dos primeiros derivados acridínicos reconhecido como agente antitumoral (BARROS et al., 2012; HORNEDO; VAN ECHO, 1985). No entanto, fatores como os efeitos colaterais, o desenvolvimento de resistência e a baixa biodisponibilidade, tem limitado a

efetividade terapêutica de derivados acridínicos (BARROS et al., 2013; LANG et al., 2013; ZHANG et al., 2014). Esses fatores vêm impulsionando os químicos a modificar estruturalmente a acridina, com o objetivo de produzir diferentes derivados que exibam atividade antitumoral significante e maior seletividade (GENSICKA-KOWALEWSKA; CHOLEWIŃSKI; DZIERZBICKA, 2017).

Recentemente, uma nova série de compostos, chamada espiro-acridílico, foi obtida por reações de condensação seguidas de ciclização espontânea, resultando em anéis de cinco ou seis membros ligados diretamente ao carbono C-9 da acridina, demonstrando capacidade de interagir com o DNA e inibir as enzimas topoisomerase, moléculas cruciais no processo de replicação celular (DE ALMEIDA et al., 2016; GOUVEIA et al., 2018). No entanto, estes novos derivados não apresentam dados na literatura relacionados à sua atividade farmacológica e toxicológica.

Nessa perspectiva, o presente estudo teve como objetivo investigar a toxicidade e o potencial antitumoral *in vitro* e *in vivo* do novo derivado espiro-acridílico sintético (E)-1'-((4-clorobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-diidro10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-06), avaliando seus possíveis mecanismos de ação.

Fundamentação teórica

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Aspectos gerais do câncer

Os tecidos de células normais possuem a capacidade de controlar a produção e liberação de sinais que estão envolvidos no crescimento celular, mantendo uma homeostase entre processos essenciais como a divisão e morte celular. Células cancerígenas, entretanto, desenvolvem estratégias para se evadir dos mecanismos de controle natural da proliferação celular, levando à formação de tumores, que crescem de maneira autônoma, alterando a arquitetura e função normal dos tecidos (HANAHAN; WEINBERG, 2011; SU et al., 2015).

Os tumores podem ser classificados em benignos ou malignos (KUMAR et al., 2015). Alguns dos principais critérios que permitem diferenciar estes dois tipos estão sumarizados no quadro 1.

Quadro 1 - Características que diferenciam tumores benignos e malignos

Características	Tumores Benignos	Tumores Malignos
Encapsulação	Presença frequente	Geralmente ausente
Morfologia	Estruturalmente semelhante ao tecido de origem	Arquitetura desorganizada e diferente do tecido de origem
Mitoses	Raras e típicas	Frequentes e atípicas
Diferenciação	Bem diferenciados	Pouco diferenciados
Taxa de crescimento	Lento	Rápido
Forma de crescimento	Expansão (encapsulamento)	Penetração e destruição do tecido adjacente
Metástase	Não forma metástase	Metastização comum

Fonte: Modificado de Saito et al., 2015

Em geral, os tumores benignos (ou neoplasias benignas) assemelham-se ao seu tecido de origem, apresentando um crescimento de forma

organizada, expansivo e geralmente lento, sendo formado por uma cápsula de tecido fibroso que envolve toda massa tumoral. Estes tumores não possuem potencial invasivo, ou seja, não se propagam entre os tecidos vizinhos, crescendo de maneira localizada (TALMADGE; FIDLER, 2010).

Em contraste, os tumores malignos (ou neoplasias malignas) manifestam um maior grau de autonomia e agressividade, apresentando o crescimento mais rápido, bem como anormalidades morfológicas em relação ao tecido de origem (TALMADGE; FIDLER, 2010). Em contraste com os tumores benignos, eles possuem margens pouco delimitadas e são capazes de invadirem outros órgãos por meio da corrente sanguínea e linfática, em um processo denominado de metástase, que pode culminar com o óbito do indivíduo (ELLENBROEK; VAN RHEENEN, 2014; KRAKHMAL et al., 2015). Os tumores malignos também são conhecidos como “câncer”, que é um termo genérico utilizado para referir-se a um conjunto de mais de 100 doenças causadas pelo crescimento descontrolado de células (SAITO et al., 2015).

Os cânceres são diferenciados de acordo com seus tecidos que lhes deram origem, podendo ser classificados principalmente em: (1) *carcinomas*: surgem das células epiteliais que formam os epitélios de revestimento externo e interno dos órgãos. São chamados de *adenocarcinomas* quando o epitélio é de origem glandular; (2) *sarcomas*: surgem de células que compõem o tecido conjuntivo, como por exemplo, a cartilagem, ossos e músculos; (3) *leucemias*: surgem nos diversos tecidos que constituem o sangue (tecidos hematopoiéticos), nas linhagens eritrocitária e/ou leucocitária; (4) *linfomas*: são tumores da linhagem linfoide que formam agregados sólidos, frequentemente nos gânglios linfáticos (KUMAR et al., 2015; SAITO et al., 2015).

Em termos epidemiológicos, o câncer representa um problema de saúde pública em nível global, sendo uma das principais causas de morte no mundo. A Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC, do inglês *International Agency for Research on Cancer*), pertencente à Organização Mundial da Saúde (OMS), em sua estimativa mais recente, publicada em 2018, apontou uma carga global de 18,1 milhões de novos casos de câncer e 9,6 milhões de mortes no mundo, no ano de 2018, sendo os cânceres de pulmão, mama e colorretal considerados os três principais em termos de incidência (BRAY et al., 2018).

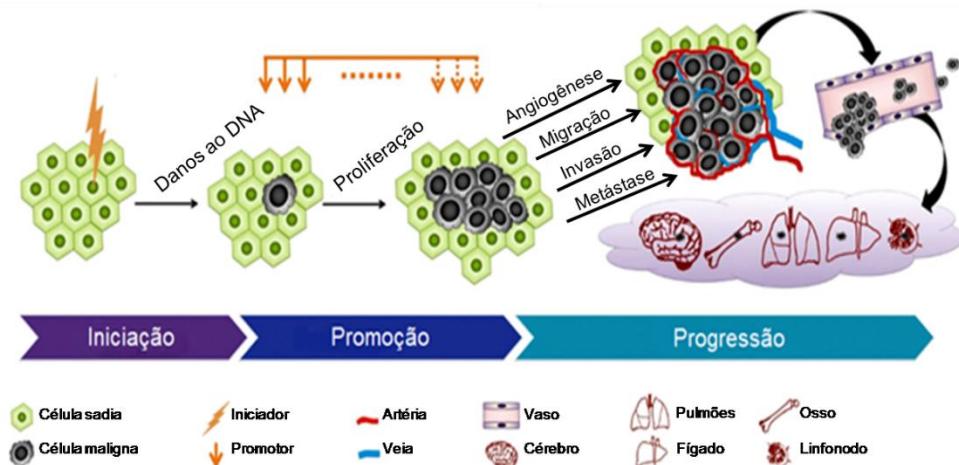
No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), estima para cada ano do triênio 2020-2022 o surgimento de 625 mil novos casos de câncer, considerando que o câncer de pele não melanoma será o mais incidente (177 mil), seguido pelos cânceres de mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil) (INCA, 2020). Estes valores tendem a aumentar futuramente caso não sejam aplicadas medidas preventivas, bem como terapias eficazes para o tratamento dos diversos tipos de cânceres, já que muitas drogas atuais apresentam alta toxicidade não seletiva (SMITH; PREWETT, 2017) e emergente desenvolvimento de resistência (BUKOWSKI; KCIUK; KONTEK, 2020).

A transformação de uma célula normal em uma célula cancerígena é um processo multifatorial, envolvendo fatores externos e internos que podem agir isoladamente ou em conjunto para favorecer o desenvolvimento tumoral (BLACKADAR, 2016). Os fatores internos compreendem entre 10-30% da incidência de câncer (WU et al., 2016) e, geralmente, estão relacionados a condições geneticamente predeterminadas do organismo, envolvendo a ocorrência de mutações somáticas, influência de mudanças hormonais, bem como respostas imunológicas do indivíduo (WU et al., 2018).

Apesar do fator genético, são raros os casos de câncer que ocorrem exclusivamente devido a causas hereditárias, sendo a grande maioria das ocorrências (aproximadamente 70-90%) decorrentes de fatores externos (RILEY et al., 2012; WU et al., 2018). Estes compreendem mutações adquiridas devido à fatores ambientais, como por exemplo, determinados hábitos alimentares, envelhecimento da população, obesidade, exposição a componentes do tabaco, ingestão de bebidas alcoólicas, problemas auto-imunes, infecções crônicas, poluentes inalados e radiação ultra-violeta (DÜSMAN et al., 2012).

O processo de formação do câncer (Figura 1) é composto por eventos complexos, que ocorrem geralmente de forma progressiva e lenta, podendo levar vários anos para que uma célula adquira as capacidades características de malignidade, formando os tumores (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Este processo é chamado de carcinogênese ou oncogênese e é dividido em três estágios sucessivos (COMPTON, 2020; LIU et al., 2015; STODDART, 1983).

Figura 1 - Etapas da carcinogênese



Fonte: Adaptado de Liu et al., 2015.

Legenda: A carcinogênese é dividida em três estágios sucessivos. No primeiro estágio, chamado de iniciação, as células sofrem a ação de um agente carcinógeno (iniciador), que provoca mutações em seus genes. Na etapa seguinte (promoção), as células anteriormente alteradas são transformadas de maneira lenta e progressiva em células malignas, devido à exposição contínua a agentes promotores. No último estágio (progressão), o câncer encontra-se instalado, logo, as células se multiplicam de forma descontrolada e irreversível, podendo adquirir um potencial invasivo e metastático.

No primeiro estágio, chamado de iniciação, os genes de células normais são influenciados por mutações que podem ser adquiridas de maneira espontânea ou em decorrência da exposição a diversos agentes cancerígenos externos (WU et al., 2018). Uma vez que uma célula tenha sido afetada por um iniciador, ela é suscetível ao estágio seguinte (promoção), caracterizada pela expansão clonal da população celular anterior, já alterada, sob o estímulo de agentes oncopromotores. Finalmente, na última etapa (progressão), a célula passa por mudanças irreversíveis, culminando na multiplicação descontrolada e autônoma, estabelecendo o fenótipo agressivo do câncer (HYNDMAN, 2016; SIDDIQUI et al., 2015) (Figura 1).

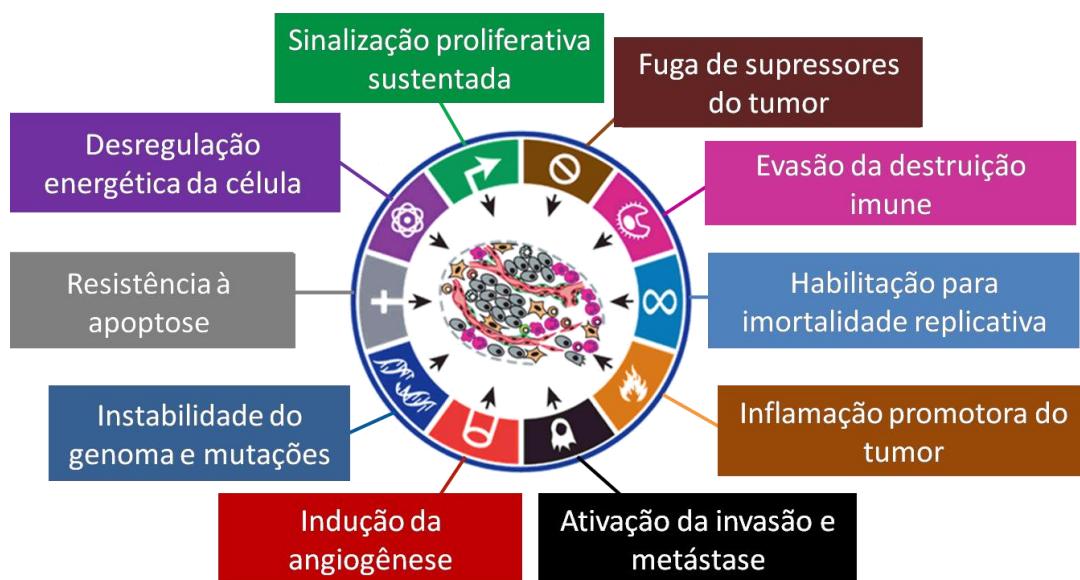
Diversos genes participam do processo de carcinogênese, neste sentido a expressão de oncogenes e genes supressores de tumor geralmente encontra-se alterada nos tumores (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Os oncogenes surgem a partir de mutações em proto-oncogenes, genes que codificam proteínas que controlam os processos de divisão, diferenciação e

morte celular em células fisiologicamente normais (GABAY, MEITAL, YULIN LI, 2009; GALIÈ, 2019; KHAN et al., 2019; KOH; SABÒ; GUCCIONE, 2016). Como consequência, os oncogenes contribuem para estimulação de vias relacionadas à sobrevivência e proliferação contínua das células neoplásicas (OGISHIMA et al., 2018; SHORTT; JOHNSTONE, 2012).

Em contrapartida, os genes supressores de tumor, como exemplo *Tp53* (MANTOVANI; COLLAVIN; DEL SAL, 2019) e *pRb* (do inglês *retinoblastoma protein*) (ENGEL; CRESS; SANTIAGO-CARDONA, 2014), controlam a proliferação celular exacerbada, permitindo que as células se dividam dentro de seus limites normais. Os mecanismos genéticos e epigenéticos envolvidos no câncer interagem muitas vezes através da ativação de oncogenes e do silenciamento de genes supressores de tumor para criar vias que beneficiem a aquisição de características promotoras da imortalização das células (BAXTER et al., 2014; WANG et al., 2019). Em um clássico trabalho, Hanahan e Weinberg (2000, com revisão em 2011) propuseram as principais características biológicas manifestadas pelas células tumorais durante o crescimento tumoral, entendidas como “marcas” comuns dos cânceres, que juntas fornecem uma maior compreensão da grande diversidade genotípica de doenças neoplásicas (Figura 2). São estas: (1) *sinalização proliferativa sustentada* – caracterizada pela capacidade da célula em proliferar-se continuamente, mediante estímulos específicos ou mesmo na ausência destes; (2) *fuga de supressores de tumor* – relacionado à regulação negativa ou perda de genes responsáveis por suprimir o crescimento tumoral; (3) *resistência à morte celular* – através da indução de mutações ou alterações em elementos críticos reguladores das vias de morte celular; (4) *sustentação da angiogênese* – processo que permite a aquisição de nutrientes e oxigênio, bem como a eliminação dos resíduos metabólicos das células tumorais em crescimento; (5) *invasão dos tecidos e capacidade de metástase* – envolve diversos eventos celulares que levam a propagação e colonização das células tumorais a partir de locais primários à órgãos distantes; (6) *reprogramação do metabolismo energético* – capacidade da célula tumoral em induzir ajustes específicos no metabolismo energético para suprir as necessidades relacionadas ao aumento do crescimento e divisão celular; (7) *inflamação crônica* – envolve a liberação de mediadores inflamatórios, que em comunicação com outras moléculas do

microambiente tumoral promovem a sobrevivência tumoral; (8) *evasão da destruição imune* – capacidade das células tumorais alterarem o microambiente para evadir-se dos mecanismos de vigilância imunológica, favorecendo o crescimento tumoral; (9) *instabilidade genômica* – caracterizada pelo aumento de alterações em diversos componentes da maquinaria de manutenção e reparo do DNA, levando à mutações que perpetuam o potencial replicativo das células tumorais; (10) *evasão dos mecanismos de morte por apoptose* – devido à mutações ou perda de reguladores pró-apoptóticos, e aumento na produção de sinalizações de sobrevivência e fatores antiapoptóticos; (11) *imortalidade replicativa* – capacidade das células tumorais proliferarem-se continuamente, sem evidência de senescência (HANAHAN; WEINBERG, 2011). A compreensão destas diferentes características que comandam o desenvolvimento do câncer torna-se essencial para o aprofundamento de estudos na busca de novos alvos terapêuticos.

Figura 2 - Características biológicas do câncer



Fonte: Adaptado de Hanahan; Weinberg, 2011.

2.2 Ciclo celular

A desregulação do ciclo celular é um processo diretamente relacionado com o desenvolvimento de células anormais com intenso potencial proliferativo. O ciclo celular consiste em uma sequência de eventos altamente coordenada que permite que as células cresçam e repliquem o seu genoma (FOSTER, 2008). Esta regulação envolve a participação de diversas moléculas que estão continuamente transmitindo e respondendo a sinais de crescimento, bem como monitorando a integridade genética das novas células filhas que serão produzidas (DURONIO; XIONG, 2013). O ciclo celular consiste em duas etapas principais: (1) a interfase (dividida nas fases G1, S e G2), período caracterizado pelo crescimento celular e duplicação do material genético, e (2) a mitose ou fase M, onde ocorre a divisão celular, com o objetivo de formar duas células filhas idênticas (TAN; DUNCAN; SLAWSON, 2017).

A fase G1 (do inglês *gap 1*) corresponde ao período em que ocorre o ínicio do crescimento celular, caracterizado pela transcrição de genes envolvidos com o controle do ciclo celular, bem como de proteínas necessárias para a duplicação celular, processo que ocorrerá somente na etapa seguinte, chamada de fase S (SATYANARAYANA; KALDIS, 2009). A transição entre essas fases requer um refinado controle do ciclo, mediado por proteínas específicas e um ponto de checagem ou ponto de restrição (do inglês *checkpoint*) ao final de G1, que verifica a integridade do material genético antes de replica-lo, prevenindo a progressão para a fase S caso a etapa anterior não tenha sido concluída de forma correta (VISCONTI; DELLA MONICA; GRIECO, 2016). Em contrapartida, caso tenha ocorrido algum erro, são recrutadas proteínas que realizarão o reparo necessário no DNA para que a célula possa progredir à próxima fase (BERTOLI; SKOTHEIM; BRUIN, 2015).

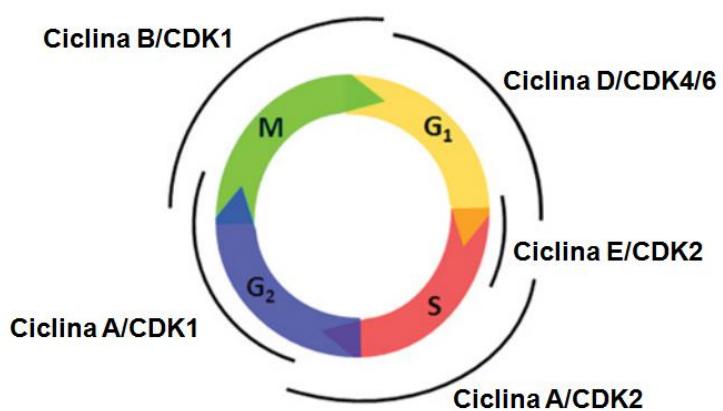
Na fase S um ponto de verificação da replicação está presente, com diversos componentes que são ativados para estabilizar estruturalmente e proteger a integridade das forquilhas de replicação (ERRICO; COSTANZO, 2012). Após a duplicação do material genético (fase S), se inicia a fase G2 (do inglês, *gap 2*), período em que o crescimento celular é finalizado e ocorre a síntese de proteínas necessárias para a entrada na fase M. Ao final de G2, a célula passa por um outro ponto de checagem (G2/M), que previne a transição

da célula para mitose, caso ela tenha sofrido algum dano ou seu material genético não tenha sido replicado completamente (DE GOOIJER et al., 2017; STARK; TAYLOR, 2004). Caso estejam íntegras, as células passam para a fase M, possibilitando que ocorra a condensação dos cromossomos e os processos posteriores que culminarão com a divisão celular (KASTAN; BARTEK, 2004).

O controle do ciclo celular é realizado principalmente por proteínas quinases chamadas de CDKs (quinases dependentes de ciclina, do inglês: *cyclin-dependent kinases*), que interagem e são ativadas por proteínas reguladoras específicas, as ciclinas (MALUMBRES, 2014). Por serem proteínas quinases do tipo serina/treonina, as CDKs, quando ativadas, podem regular a fosforilação de outros alvos específicos, culminando com a ativação ou repressão de proteínas que modulam as diferentes etapas de controle do ciclo celular (YANG et al., 2004).

Duas classes principais de ciclinas são encontradas na fase G1: ciclina D (que interage com CDK4 ou CDK6) e ciclina E (se associa com CDK2). Da mesma forma, outras ciclinas e CDKs específicas regulam os eventos das demais fases do ciclo celular (Figura 3) (SURYADINATA; SADOWSKI; SARCEVIC, 2010).

Figura 3 - Regulação do ciclo celular em mamíferos pelos complexos ciclinas/CDKs



Fonte: Adaptado de Suryadinata et al., 2010.

Legenda: O ciclo celular consiste de uma fase onde ocorre a síntese de DNA (S) e uma fase mitótica (M), separada por dois intervalos ou *gaps* (G1 e G2), necessários ao crescimento

celular. Em células de mamíferos, diferentes complexos ciclina/CDK regulam a progressão das células pelas diferentes fases do ciclo celular. Além disso, diversas moléculas presentes nos pontos de checagem (não mostrados na imagem) avaliam a integridade do DNA das células antes que elas possam prosseguir para a próxima etapa.

As atividades das CDKs são controladas por outras proteínas chamadas de CKIs (inibidores das quinases dependentes de ciclinas, do inglês *cyclin-dependent kinase inhibitor*) (LIM; KALDIS, 2013). Existem duas famílias distintas de CKIs: INK4 (que inclui $p15^{INK4b}$, $p16^{INK4a}$, $p18^{INK4c}$, $p19^{INK4d}$, inibidores específicos das CDK 4 e 6, dessa forma prevenindo a associação com as ciclinas D e consequentemente, a progressão do ciclo em G1) e a família CIP/KIP (inclui $p21^{Cip1}$, $p27^{Kip1}$, $p57^{Kip2}$, que podem interferir na atividade dos complexos quinases formados pelas ciclinas A, B, D, E, o que previne a progressão de todas as fases do ciclo celular) (LIM; KALDIS, 2013; QUEREDA et al., 2016).

Uma importante proteína supressora tumoral chamada de pRb (proteína do retinoblastoma) está envolvida na regulação do ciclo (GIACINTI; GIORDANO, 2006). Quando as células estão em um estado quiescente (sem proliferar), a proteína Rb é essencialmente não fosforilada e encontra-se ligada ao fator de transcrição E2F, inativando-o e impedindo que este ative a transcrição de genes envolvidos na fase S, evitando a progressão do ciclo (JOHNSON et al., 2016; THWAITES et al., 2019). Durante a fase G1, o complexo ciclina D-CDK4/6 fosforila a proteína Rb gradualmente, o que induz a dissociação de pRb, liberando o fator E2F para transcrever seus genes alvos (DICK; RUBIN, 2013; DYSON, 2016).

Quando células são danificadas, estes eventos descritos anteriormente são alterados. Sabe-se que a proteína p53 é um fator de transcrição que realiza um importante papel nestes casos, sendo considerada como “guardiã do genoma”, por ser capaz de detectar danos no DNA ou sinais alterados de oncogenes, induzindo uma parada do ciclo celular em G1 com o objetivo de reparar o material genético (TOUFEKTCHAN; TOLEDO, 2018). Neste contexto, os níveis de p53 se elevam, mediando a ativação transcripcional de p21, um dos inibidores de CDKs, o que impede a progressão do ciclo. Quando um dano é bastante profundo para ser reparado, as células danificadas serão eliminadas

através de mecanismos apoptóticos (WIMAN; ZHIVOTOVSKY, 2017). Portanto, o ponto de checagem em G1 responde a duas vias supressoras tumorais principais, governadas pelas proteínas p53 e pRb, que geralmente são alvos de mutações em muitos tipos de cânceres (JOHNSON et al., 2016; MANTOVANI; COLLAVIN; DEL SAL, 2019).

Além das proteínas já mencionadas anteriormente, o controle do ciclo celular é orquestrado por proteínas quinases de ponto de checagem, que são componentes-chave nas vias de sinalização que respondem a danos ao DNA (JAEHNIIG et al., 2013). A principal resposta desta via é mantida pelas proteínas quinases ATM/ATR, presentes no ponto de checagem em G1. A proteína ATM (do inglês *Ataxia telangiectasia mutated*) reconhece danos de quebra de fita dupla no DNA (ÁLVAREZ-QUILÓN et al., 2014), enquanto ATR (do inglês *Ataxia telangiectasia and Rad3-related*) reconhece danos de fita simples (FOKAS et al., 2014).

Dependendo do tipo de alteração no DNA, ATR fosforila e ativa a proteína quinase CHK1 (do inglês *checkpoint kinase 1*), da mesma forma, ATM pode ativar a CHK2 (do inglês *checkpoint kinase 2*) (RONCO et al., 2017). Em conjunto, estas proteínas fosforilam diferentes alvos que controlam o ciclo celular, contribuindo para sua interrupção (BARTEK; LUKAS, 2003). ATM e CHK2 fosforilam diretamente o fator de transcrição p53, que tem como alvo chave transcricional o inibidor de CDKs, p21 (SHERR; BARTEK, 2017; STRACKER et al., 2013). Depois de ativado, p21 silencia o complexo ciclina E-CDK2, culminando com a parada no ciclo celular em G1, enquanto outros genes alvos de p53 podem induzir apoptose ou reparar o DNA danificado (KRUISWIJK; LABUSCHAGNE; VOUSDEN, 2015; LEVINE; OREN, 2009). Em contrapartida, a Chk1 identifica danos que ocorrem durante a replicação do DNA, causando parada na fase S do ciclo celular, bem como atua no ponto de checagem da transição entre G2 e M, impedindo que células danificadas entrem em mitose (PATIL; PABLA; DONG, 2013).

Em células normais, se os estímulos para a proliferação celular forem retirados antes de atingir o ponto de checagem em G1, o ciclo celular é interrompido neste ponto, direcionando as células a retornar ao estado de G0, caracterizado pela ausência de atividade proliferativa, embora as células encontrem-se ainda metabolicamente ativas (RUMMAN; DHAWAN; KASSEM,

2015). A célula pode permanecer neste estado por longos períodos, sendo uma condição permanente (no caso de células que entrarão em senescência ou morte celular) ou transitória (células quiescentes), porém, este último caso é reversível e as células poderão iniciar um novo ciclo celular se forem apropriadamente estimuladas por mitógenos (OTTO; SICINSKI, 2017). No câncer, após o ciclo de divisão celular, as células tumorais não retornam ao estado G0, transitando da fase M para a fase G1 novamente, consolidando a capacidade de sustentar uma sinalização proliferativa (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Sabe-se que na maioria dos cânceres, proteínas que medeiam o controle entre as fases G1 e S são normalmente encontradas inativas (BERTOLI; SKOTHEIM; BRUIN, 2015; HERRERO et al., 2016). Além disso, as células cancerígenas exibem alterações genéticas que facilitam a passagem através de ambos os pontos de checagem (BOWER et al., 2017). Neste contexto, o ciclo celular representa um alvo promissor de agentes terapêuticos anticâncer (OTTO; SICINSKI, 2017; SHERR; BARTEK, 2017).

Os inibidores de CDKs têm obtido relevância na investigação clínica (WHITTAKER et al., 2017), entre eles os inibidores de CDK4/6, palbociclibe, ribociclibe e abemaciclibe, que já foram aprovados pelo FDA (do inglês *Food and Drug administration*) e ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), agências reguladoras dos Estados Unidos e Brasil, respectivamente, e tem apresentado bons resultados no tratamento de câncer de mama receptor hormonal positivo e HER2 negativo (receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano) (PETRELLI et al., 2019; POLK et al., 2016). O principal mecanismo de ação desses agentes é a inibição da fosforilação do supressor de tumor Rb, induzindo a parada do ciclo em G1 (EGGERSMANN et al., 2019; MILLS; KOLB; SAMPSON, 2018).

Proteínas quinases do ponto de checagem também têm sido alvos de ensaios clínicos, podendo-se citar o prexasertib, um inibidor da quinase 1 (CHK1) que está sendo avaliado contra vários tipos de câncer, incluindo carcinoma de células escamosas, câncer de cabeça e pescoço, câncer colorretal, câncer de pulmão de células não pequenas, leucemia mieloide aguda e tumores sólidos pediátricos (HEIDLER et al., 2019; MILLS; KOLB; SAMPSON, 2018). Resultados preliminares mostraram que a inativação da via

ATR/CHK1 sensibiliza as células cancerígenas a radioterapia e quimioterapia (MANIC et al., 2015). Atualmente esses agentes estão sendo amplamente explorados em combinação entre si ou com agentes citotóxicos convencionais na terapia do câncer.

2.3 Apoptose

O balanço entre os processos de proliferação, parada do crescimento e apoptose regulam a homeostase celular. Entretanto, alterações no equilíbrio entre os eventos de crescimento e morte celular, podem resultar no surgimento de neoplasias (FOSTER, 2008). Neste contexto, a apoptose é um tipo de morte celular programada que auxilia na manutenção de processos fisiológicos normais, tais como a diferenciação e o desenvolvimento embrionário, controlando o número de células atípicas, não-funcionais, com danos irreparáveis ou que são perigosas para o próprio organismo (GALIMBERTI; ROTHLIN; GHOSH, 2019; SU et al., 2015).

Patologicamente, este processo desempenha um importante papel na carcinogênese, participando do controle de células que extraviam seus tecidos e bloqueando assim a disseminação metastática (ICHIM; TAIT, 2016; SU et al., 2015). Entretanto, é relatado na literatura que vários tipos de cânceres apresentam resistência à apoptose (FULDA, 2015; OUYANG et al., 2012; RATHORE et al., 2017; SHARMA; BOISE; SHANMUGAM, 2019; SU et al., 2015; WONG, 2011), logo, o entendimento dos mecanismos envolvidos nestas vias de sinalização celular é fundamental na investigação de novos alvos terapêuticos para o tratamento do câncer (CARNEIRO; EL-DEIRY, 2020).

O termo “apoptose” foi relatado primeiramente por Kerr e colaboradores em 1972, os quais descreveram algumas das principais alterações morfológicas que ocorriam durante este processo, bem como a sua importância para a regulação do tamanho das populações celulares e o seu provável envolvimento na regressão de alguns tumores (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972). As células que morrem por apoptose apresentam características morfológicas bem marcantes, tais como a condensação da cromatina, a retração do volume celular, o colapso do citoesqueleto, a fragmentação do envelope nuclear, a formação de prolongamentos na membrana celular (*blebs*

de membrana) e de corpos apoptóticos, os quais são constituídos por fragmentos celulares envolvidos por membrana (MAJTNEROVÁ; ROUŠAR, 2018).

Além disso, também ocorrem determinadas mudanças bioquímicas, que incluem a clivagem do DNA em fragmentos internucleossomais padrões, ativação de proteínas específicas denominadas “caspases” e alterações na superfície da membrana, como por exemplo, a externalização da fosfatidilserina (SARASTE; PULKKI, 2000). Este fosfolipídeo normalmente encontra-se distribuído assimetricamente na monocamada interna da membrana celular e, é translocado para a camada externa da membrana, o qual funciona como um marcador para que células apoptóticas sejam reconhecidas e destruídas por fagócitos (SHLOMOVITZ; SPEIR; GERLIC, 2019). Neste contexto, a apoptose é uma “morte limpa”, em que não ocorre o extravasamento do conteúdo celular nos tecidos vizinhos e não há indução de uma resposta inflamatória prejudicial (D'ARCY, 2019). Um importante marcador utilizado experimentalmente na detecção da fosfatidilserina extracelular é a Anexina V, uma proteína que se liga especificamente a este fosfolipídeo na presença de Ca^{2+} e, quando conjugada a moléculas fluorescentes permite identificar este evento (MAJTNEROVÁ; ROUŠAR, 2018).

A maquinaria intracelular para a indução da apoptose é dependente de uma família de proteases denominadas caspases, as quais possuem uma cisteína no seu sítio ativo e, clivam suas proteínas-alvo em resíduos de ácido aspártico (JULIEN; WELLS, 2017). As caspases são sintetizadas na forma de precursores inativos (pró-caspases), sendo ativadas através da clivagem proteolítica por outras caspases já ativas, resultando em uma cascata proteolítica amplificada, que é irreversível e leva à rápida morte celular. Algumas procaspases iniciadoras (-2, -8, -9, -10) operam no início da cascata proteolítica e ativam procaspases executoras (-3, -6, -7), as quais atuam em outras proteínas-alvo para executar o programa de morte celular (PISTRITTO et al., 2016; PROKHOROVA et al., 2018). A caspase-3 é uma das principais mediadoras do processo apoptótico, pois é capaz de inativar proteínas cruciais para a manutenção da integridade do citoesqueleto, do reparo do DNA e controle do ciclo celular (CHOUDHARY; AL-HARBI; ALMASAN, 2014).

As duas vias de sinalização melhor compreendidas que podem ativar as cascatas de caspases, levando à apoptose, são chamadas de via extrínseca e via intrínseca (CARNEIRO; EL-DEIRY, 2020; ICHIM; TAIT, 2016) (Figura 4). A via extrínseca, ou via do receptor de morte, é iniciada quando determinados ligantes ligam-se à receptores de morte na superfície extracelular, ativando-os e disparando a apoptose. Estes receptores são proteínas da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral (TNF, do inglês *tumor necrosis factor*), que inclui o receptor para o próprio TNF (TNF-R1), o receptor de morte Fas (CD95 e APO1) e os receptores para o ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (TRAIL, do inglês *TNF-related apoptosis inducing ligand*) (TUMMERS; GREEN, 2017).

Os receptores possuem um domínio extracelular de ligação aos seus respectivos ligantes e um domínio intracelular, chamado de domínio de morte (DD, do inglês *death domains*), o qual é altamente conservado entre seus membros. Ambos, o receptor e o ligante, são homotímeros estruturalmente relacionados (OYANG et al., 2012; VERBRUGGE; JOHNSTONE; SMYTH, 2010). Quando ativados, os domínios intracelulares dos receptores de morte recrutam proteínas que apresentam domínios de morte, responsáveis pelo recrutamento de pró-caspases iniciadoras (-8, -10 ou ambas), que formarão o complexo de sinalização indutor de morte (DISC, do inglês *death-inducing signaling complex*) (D'ARCY, 2019). Este complexo ativa caspases iniciadoras, que por sua vez ativam caspases executoras (principalmente -3 e -7), as quais podem induzir a morte celular diretamente (via extrínseca) ou realizar uma amplificação do sinal apoptótico via mitocondrial, através da clivagem e ativação de proteínas relacionadas ao disparo da via intrínseca (FULDA, 2015; VERBRUGGE; JOHNSTONE; SMYTH, 2010) (Figura 4).

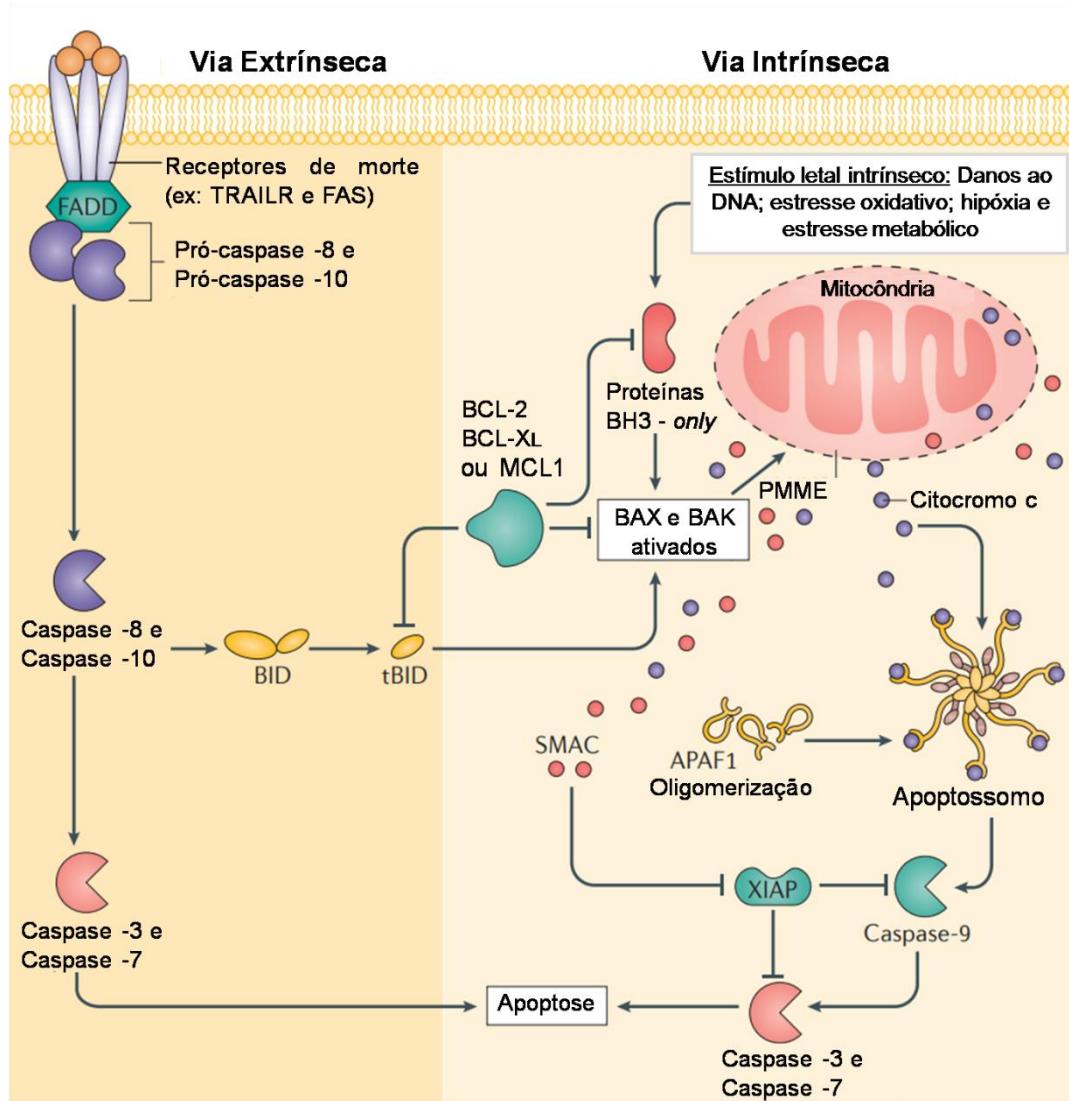
A ativação da apoptose também pode ocorrer a partir de estímulos celulares internos, em resposta a uma injúria e estresse, como por exemplo, a fragmentação do DNA, radiação, privação de fatores de crescimento e oxigênio, infecções virais e estresse oxidativo (ELMORE, 2007; ICHIM; TAIT, 2016). Todos estes estímulos acabam resultando na abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPT, do inglês *mitochondrial permeability transition*), levando à perda do potencial transmembrânico mitocondrial e liberação de moléculas pró-apoptóticas a partir do espaço

intermembrana para o citosol (BURKE, 2017; LOPEZ; TAIT, 2015). Tais proteínas (como por exemplo, o citocromo c) ativam a via mitocondrial dependente de caspases (ou via intrínseca da apoptose). O citocromo c liga-se à uma proteína adaptadora de ativação de pró-caspases, chamada de Apaf1 (do inglês *apoptotic protease activating factor 1*), provocando a oligomerização de Apaf1 em um complexo proteico, chamado de apoptossomo (CHAI; SHI, 2014; SHAKERI; KHEIROLLAHI; DAVOODI, 2017). A proteína Apaf1 no apoptossomo ativa a pró-caspase iniciadora -9 e posteriormente pró-caspases executoras (-3, -7), induzindo a apoptose (D' ARCY, 2019) (Figura 4). Além do citocromo c, as proteínas apoptóticas SMAC/DIABLO podem regular a ativação da apoptose pela via intrínseca, por meio do bloqueio da atividade de proteínas inibidoras da apoptose ligadas ao cromossomo X (XIAPs) (TAIT; GREEN, 2010).

A via intrínseca é regulada por uma classe de proteínas intracelulares da família Bcl-2, a qual é bastante conservada evolutivamente (Figura 4). Algumas proteínas Bcl-2 são pró-apoptóticas (como Bax, Bak, Bad, Bid, Bim, Noxa e PUMA) e promovem a liberação do citocromo c e outros fatores pró-apoptóticos para o citosol, estimulando a apoptose, enquanto, outras proteínas antiapoptóticas (como Bcl-xL, Bcl-2 e Mcl-1) bloqueiam esta liberação, inibindo a apoptose. O balanço entre estes dois grupos de proteínas, inclusive a interação entre eles, determina a morte ou vida das células pela via intrínseca (DELBRIDGE et al., 2016; RADHA; RAGHAVAN, 2017).

A indução da apoptose é um dos principais mecanismos de morte induzidos pela radioterapia (FABBRIZI et al., 2018) e por diversos quimioterápicos já utilizados na clínica (WANG et al., 2018). Em geral, os fármacos regulam a apoptose por provocar danos no DNA ou inibir determinados alvos críticos deste processo, tais como as proteínas antiapoptóticas da família Bcl-2 e as caspases (CARNEIRO; EL-DEIRY, 2020; GOLDAR et al., 2015; KACZANOWSKI, 2016).

Figura 4 - Vias extrínseca e intrínseca da apoptose



Fonte: Adaptado de Ichim; Tait, 2016

Legenda: A via apoptótica extrínseca é ativada por meio da ligação dos receptores de morte (tais como TRAILR e FAS) à seus ligantes cognatos, o que culmina com o recrutamento de proteínas adaptadoras (por exemplo, FADD), ativação das caspases iniciadoras (-8 e -10) e consequente clivagem/ativação das caspases efetoras (-3 e -7), levando à apoptose.

A via intrínseca (ou mitocondrial) pode ser ativada por meio de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 ou através de determinados estímulos celulares internos, resultando na permeabilização da membrana mitocondrial externa (PMME). Nesta via, proteínas do espaço intermembrana mitocondrial (tais como o citocromo c) são liberadas no citosol, interagindo com a proteína adaptadora APAF1, e desencadeando a formação do apoptossomo, um complexo que recruta e ativa a caspase- 9. Por fim, as caspases executoras (caspase -3 e -7) são ativadas, induzindo a apoptose.

2.4 Angiogênese

Devido à alta taxa proliferativa que ocorre durante a formação de células neoplásicas, é necessário que os tumores desenvolvam uma rede vascular diferenciada para suprir as novas demandas de crescimento. A angiogênese consiste na formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, e é um processo que ocorre transitoriamente em condições fisiológicas normais, como por exemplo, durante o desenvolvimento embrionário e no reparo tecidual (VIALLARD; LARRIVÉE, 2017). Entretanto, exerce um papel significativo em alguns processos patológicos, como por exemplo, na carcinogênese (ZUAZO-GAZTELU; CASANOVAS, 2018), pois fornece nutrientes e oxigênio ao tumor, além de permitir a eliminação de metabólitos, oferecendo suporte para manter cronicamente a alta atividade proliferativa das novas células neoplásicas que são geradas (JIMÉNEZ-VALERIO; CASANOVAS, 2017; RAJABI; MOUSA, 2017).

Este suporte é parcialmente garantido por difusão e pelos vasos sanguíneos, que também servem como portas de entrada e saída para migração de células do sistema imunológico, além de facilitar a disseminação de células metastáticas para outros órgãos e tecidos (BIELENBERG; ZETTER, 2015; STOCKMANN et al., 2014). Na ausência desta neovasculatura, os tumores não conseguem suprir suas demandas funcionais e sofrem morte celular (HOLMGREN; O'REILLY; FOLKMAN, 1995; PARANGI et al., 1996).

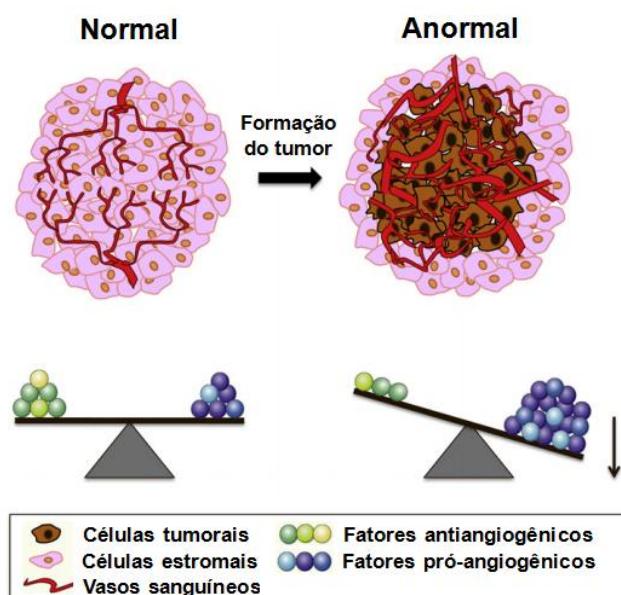
A formação de novos vasos é um processo altamente coordenado e regulado, que envolve eventos como a migração e proliferação de células endoteliais, formação de tubos vasculares e anastomose (fusão de dois vasos) de tubos recém-formados (RAJABI; MOUSA, 2017). Inicialmente, células endoteliais são ativadas em resposta a um estímulo pró-angiogênico, enquanto proteases degradam a matriz extracelular perivascular e a membrana basal, para permitir a posterior migração das células endoteliais até o local do estímulo angiogênico (MANDER; FINNIE, 2018). Os pericitos, células que estabilizam a parede dos vasos sanguíneos, se desprendem, enquanto células endoteliais especializadas migram para a área perivascular e proliferam, direcionando o alongamento do novo broto vascular em formação. Ao final do processo, uma nova membrana basal é sintetizada, a cobertura de pericitos

bem como as junções endoteliais é restaurada, e os vasos sanguíneos maturam para constituir estruturas tubulares através do qual o sangue fluirá. A circulação do sangue é então estabelecida pela união de dois novos vasos adjacentes, que formam alças fechadas na área recentemente vascularizada (JOHNSON; WILGUS, 2014; MANDER; FINNIE, 2018).

Os vasos sanguíneos que são produzidos pela angiogênese em condições neoplásicas são estruturalmente e funcionalmente distintos de vasos presentes em tecidos normais: a neovasculatura do tumor é marcada por brotamento capilar precoce, aumento das ramificações e permeabilidade dos vasos, membrana basal com espessura irregular, fluxo sanguíneo irregular, micro-hemorragias, vasos distorcidos e tortuosos, bem como alteração dos níveis proliferativos de células endoteliais e apoptose (BALUK; HASHIZUME; MCDONALD, 2005; FURUYA et al., 2005; NAGY et al., 2010).

Em condições normais, a vasculatura encontra-se em um estado relativamente inativo (quiescente) e a formação de novos vasos sanguíneos ocorre apenas em condições específicas, homeostase mantida através de um balanço regulado pela sinalização de moléculas pró e antiangiogênicas (LUGANO; RAMACHANDRAN; DIMBERG, 2019) (Figura 5).

Figura 5 - Angiogênese em condições normais e no câncer



Fonte: Adaptado de Giuliano; Pagès, 2013.

Legenda: Nos tecidos normais, a ação dos fatores pró-angiogênicos é contrabalançada pela ação de fatores antiangiogênicos. No câncer, este equilíbrio é desregulado, principalmente devido ao aumento de fatores pró-angiogênicos, levando ao desenvolvimento de uma vasculatura muito anormal.

No câncer, a ativação da angiogênese ocorre de maneira contínua por meio de um evento chamado “*switch angiogênico*” (BERGERS; BENJAMIN, 2003), que marca a transição de uma fase avascular para uma fase vascular no desenvolvimento tumoral, em decorrência do desequilíbrio entre fatores pró-angiogênicos (ativadores da angiogênese) e antiangiogênicos (inibidores da angiogênese) produzidos pelas células tumorais e do seu próprio microambiente (GIULIANO; PAGÈS, 2013; MOUSA; DAVIS, 2017) (Figura 5).

Os inibidores da angiogênese fornecem sinais que podem interromper a formação de novos vasos sanguíneos ou promover a remoção de vasos pré-existentes. Este grupo inclui moléculas endógenas como a trombospondina-1, angiostatina, endostatina, alguns interferons (INF α / β / γ), interleucinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12), inibidores de metaloproteinases e o ácido retinóico (MORSE et al., 2019; RAJABI; MOUSA, 2017). Em contrapartida, diversas são as moléculas que atuam como ativadores angiogênicos, podendo-se citar: o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF); a proteína angiogenina; fator de crescimento transformador (TGF) – α e TGF- β ; fator de necrose tumoral (TNF) – α ; fator de crescimento endotelial derivado de plaquetas (PDGF); fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), fator de crescimento placentário (PIGF); interleucina-8 (IL-8); fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e fator de crescimento epidérmico (EGF); quimiocinas; óxido nítrico e metaloproteinases da matriz (MMPs) (MOUSA; DAVIS, 2017; YEHYA et al., 2017).

O VEGF e seus receptores (VEGFR) constituem um dos ativadores angiogênicos mais bem caracterizados nos tecidos neoplásicos, que normalmente é superexpresso em diferentes células cancerígenas, induzido pelas condições de hipóxia presentes no microambiente tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011; MAJ; PAPIERNIK; WIETRZYK, 2016). O VEGF se liga a receptores transmembrana do tipo tirosina quinases (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3) (OLSSON et al., 2006), expressos na superfície de células

endoteliais, e atua mediando principalmente o aumento da sobrevivência, proliferação e migração de células endoteliais (CLAESSON-WELSH; WELSH, 2013). Após a ativação da angiogênese, o VEGF provoca a dilatação dos vasos sanguíneos, afrouxamento das junções aderentes presentes nos tecidos interendoteliais e aumento da permeabilidade vascular, favorecendo a transição celular em um potencial invasivo e metastático (HICKLIN; ELLIS, 2005; LUGANO; RAMACHANDRAN; DIMBERG, 2019).

Considerando a importância que a angiogênese exerce no crescimento e capacidade invasiva tumoral, a investigação de proteínas ou mediadores envolvidos na promoção da angiogênese tem sido explorada como uma ferramenta terapêutica promissora para o tratamento do câncer (AL-ABD et al., 2017; LUGANO; RAMACHANDRAN; DIMBERG, 2019; LUPO et al., 2017; ZHAO; ADJEI, 2015).

De maneira geral, as estratégias utilizadas para projetar agentes antiangiogênicos têm como alvo: (1) a inibição da ação de fatores endógenos que estimulam a formação de novos vasos sanguíneos; (2) identificação e exploração de inibidores naturais da angiogênese; (3) inibição de moléculas que facilitem a invasão de tecidos circundantes pelos vasos sanguíneos tumorais e (4) interferência na capacidade proliferativa de células endoteliais (MOUSA; DAVIS, 2017).

Neste contexto, existem quatro principais categorias de drogas antiangiogênicas que já foram aprovadas na prática clínica: (1) anticorpos monoclonais (mAb) que se ligam a fatores pró-angiogênicos específicos, tais como o VEGF (por exemplo, o bevacizumab) (2) ou a seus receptores (por exemplo, ramucirumab); (3) *Decoy receptors* (por exemplo, afilibercept ou “VEGF-trap”), que são formas solúveis de receptores de fatores pró-angiogênicos que competem com o receptor natural, resultando na supressão da sinalização angiogênica; e os (4) inibidores da tirosina quinase (ITQ) (por exemplo, sunitinibe e sorafenibe), que bloqueiam a atividade enzimática tirosina quinase ligada ao domínio intracelular de uma ampla variedade de receptores que estimulam a produção de VEGF e outros fatores pró-angiogênicos (AL-ABD et al., 2017; MAJ; PAPIERNIK; WIETRZYK, 2016; VASUDEV; REYNOLDS, 2014). As proteínas tirosina quinases são componentes chaves de várias vias de transdução de sinais que transmitem

informações ao núcleo, influenciando na transcrição de genes importantes e, sua ativação anormal já foi demonstrada em alguns tumores, tornando-os alvos moleculares promissores na terapia anticâncer (MANDER; FINNIE, 2018).

Estudos envolvendo a terapia antiangiogênica buscam atuar especificamente na vasculatura tumoral, com uma maior seletividade e de forma menos tóxica para os indivíduos (MANDER; FINNIE, 2018). Contudo, a resposta à terapia antiangiogênica é variável, porque os mecanismos angiogênicos diferem entre os tipos de tumor e mesmo em diferentes locais dentro do mesmo tumor (LUGANO; RAMACHANDRAN; DIMBERG, 2019; MAJ; PAPIERNIK; WIETRZYK, 2016). Tais limitações incentivam o uso de diferentes terapias antiangiogênicas que atuem em alvos distintos da neovascularização do tumor ou, a terapia combinada, que agrega a terapia medicamentosa antiangiogênica com outras modalidades de tratamentos direcionados às células tumorais (como a quimioterapia, radioterapia ou imunoterapia), para otimizar os resultados terapêuticos obtidos (MOUSA; DAVIS, 2017).

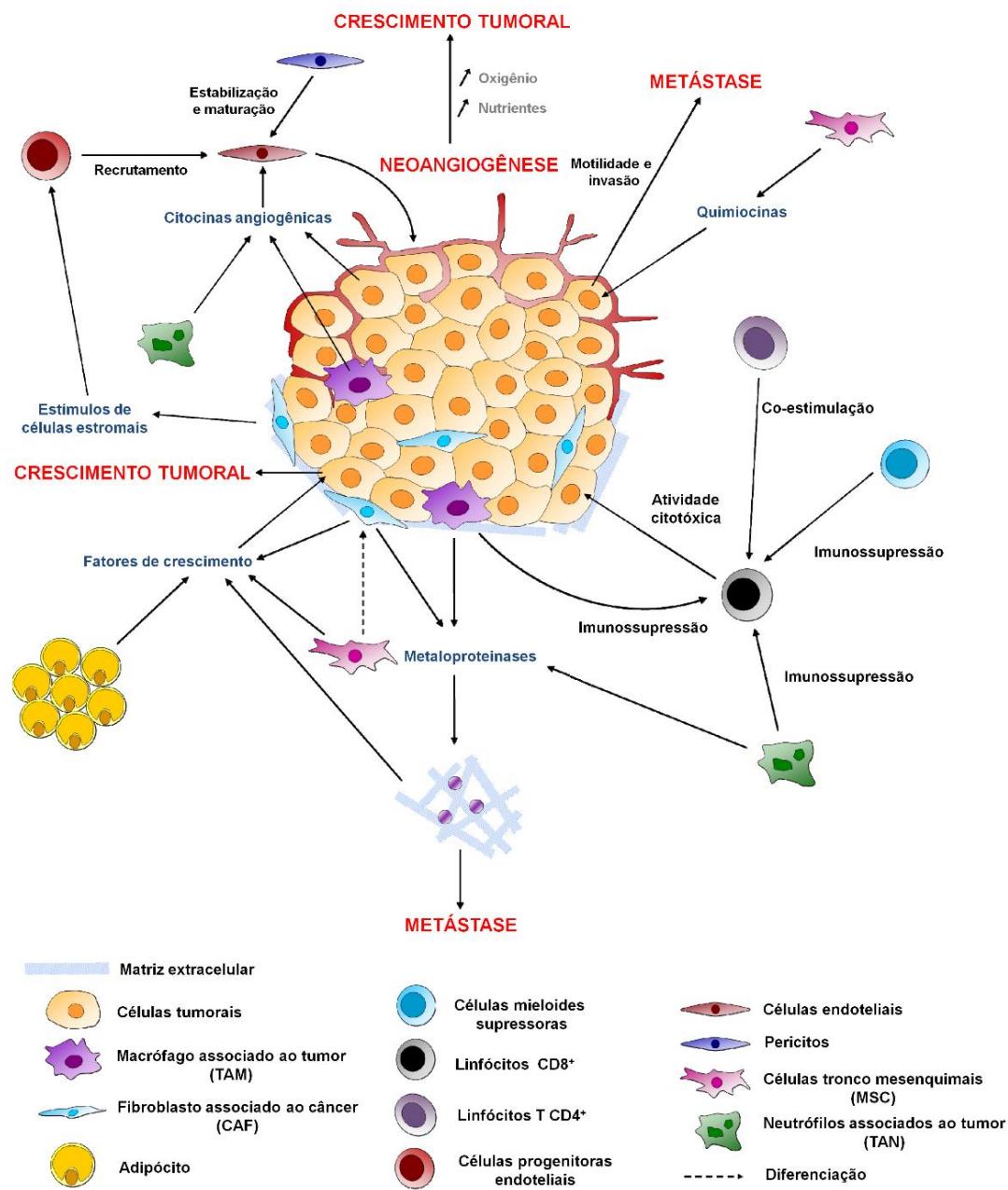
2.5 Microambiente tumoral

Além de uma população heterogênea de células cancerígenas, a massa tumoral é formada também por uma variedade de elementos não celulares, bem como células não malignas que compõem o estroma e constituem coletivamente o chamado microambiente tumoral (BELLI et al., 2018). A interação das células cancerígenas com o seu microambiente influencia profundamente no curso da progressão tumoral, das respostas aos tratamentos e aquisição de resistência (CASTELLS et al., 2012), o que tem incentivado novas pesquisas nesta área, tendo como alvos os diversos componentes do microambiente tumoral (HEIDEGGER; PIRCHER; PICHLER, 2019; LOCATELLI et al., 2019; ROMA-RODRIGUES et al., 2019).

Os elementos essenciais de um estroma tumoral incluem os fibroblastos associados ao câncer (CAFs), células endoteliais, pericitos, células mesenquimais, redes vasculares sanguíneas e linfáticas, células adiposas, células neuroendócrinas, células imunes e inflamatórias e a matriz extracelular (MEC), que, juntamente com as células neoplásicas, estabelecem uma

comunicação contínua para estimular os eventos que levam ao crescimento e a disseminação tumoral (BELLI et al., 2018; WANG et al., 2017) (Figura 6).

Figura 6 - Interações entre células tumorais e seu microambiente



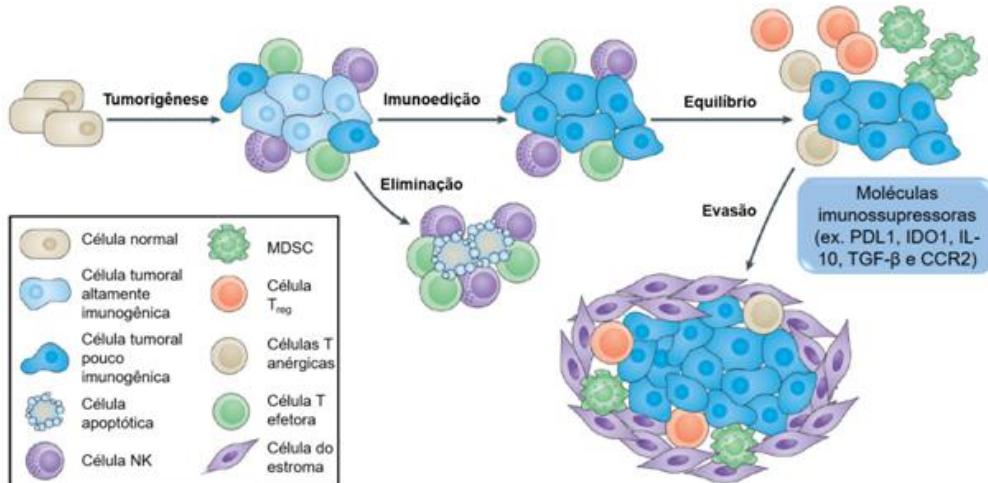
Fonte: Adaptado de Castells et al., 2012

Legenda: A interação das células tumorais com os diversos elementos que compõem o estroma influencia diretamente em eventos que culminam com a formação de novos vasos (angiogênese), aquisição de fenótipos imunossupressores associados ao tumor, além da secreção de fatores de crescimento ou enzimas específicas que estimulam o crescimento tumoral e a metástase.

As células imunes podem atuar ativamente na erradicação dos tumores, por meio de mecanismos diretos ou indiretos que monitoram seu surgimento, antes de originarem tumores clinicamente detectáveis (ABBOTT; USTOYEV, 2019; BURNET, 1957; GONZALEZ; HAGERLING; WERB, 2018; PANDYA et al., 2016). Porém, as células tumorais desenvolvem diferentes estratégias para escapar dos mecanismos de vigilância imunológica (VINAY et al., 2015) e, quando a relação funcional das células imunes é alterada, pode ocorrer a inibição das respostas imunes antitumorais, levando à transdução de sinais que atuam na promoção de um microambiente favorável à sobrevivência e ao crescimento tumoral (SPRANGER; GAJEWSKI, 2018). A maneira pela qual as células tumorais modificam as células imunes a seu favor é ressaltada atualmente pela teoria da imunoedição tumoral, a qual explica o papel dual do sistema imunológico, como supressor e promotor tumoral. Este processo é dividido em três fases contínuas e progressivas: (1) eliminação; (2) equilíbrio; (3) evasão (DUNN et al., 2002; DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004; O'DONNELL; TENG; SMYTH, 2019) (Figura 7).

Na fase de eliminação, diferentes componentes da imunidade inata e adaptativa trabalham em conjunto para eliminar tumores no ínicio do seu desenvolvimento. Este processo pode ser concluído com sucesso, porém, algumas células residuais menos suscetíveis podem escapar deste controle imunológico e permanecer em dormência proliferativa por vários anos, devido a um forte controle exercido principalmente por componentes imunológicos do sistema adaptativo. Este período corresponde à segunda fase (equilíbrio) e é caracterizada pela edição tumoral de uma população celular mais suscetível e, surgimento de variantes menos imunogênicas (ou seja, que provocam uma menor resposta imunológica), devido à alta instabilidade genética tumoral. Estas variantes não são reconhecidas com a mesma eficiência pelo sistema imune, podendo tornar-se resistentes aos mecanismos antitumorais ou induzir o surgimento de um ambiente fortemente imunossupressor, propiciando que o tumor escape do controle imunológico e entre na fase de evasão, consolidando o aparecimento de tumores clinicamente detectáveis (DUNN et al., 2002; DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004; TENG; KERSHAW; SMYTH, 2013; YARCHOAN et al., 2017) (Figura 7).

Figura 7 - Imunoedição tumoral



Fonte: Adaptado de Yarchoan et al., 2017

Legenda: Durante a tumorigênese, as células adquirem alterações genéticas resultando na apresentação de抗ígenos, que são reconhecidos pelas células da imunidade inata e adaptativa, as quais em conjunto trabalham para eliminar as células tumorais altamente imunogênicas. As células neoplásicas que sobrevivem a esta fase inicial (eliminação) entram em um período de dormência proliferativa (equilíbrio), no qual variantes menos imunogênicas e mais resistentes aos mecanismos antitumorais sobrevivem e estabelecem um microambiente imunossupressor. Consequentemente, as células tumorais evadem o controle do sistema imune (fase de evasão), formando um tumor clinicamente detectável.

Este estado imunossupressor pode ser adquirido pela (1) expressão tumoral de moléculas imunossupressoras e sinais antifagocitose, (2) secreção de alguns fatores imunossupressores (como por exemplo, citocinas), (3) modulação tumoral do metabolismo ou pelo (4) recrutamento de células inflamatórias do estroma, como macrófagos associados ao tumor (TAMs, do inglês *tumor-associated macrophages*), células T reguladoras (Tregs), células supressoras derivadas de origem mieloide (MDSCs, do inglês *myeloid-derived suppressor cells*), células B, células dendríticas (DCs, do inglês *dendritic cells*), entre outras, que passam a induzir ativamente a tolerância imunológica, compondo o microambiente tumoral. Neste, a inflamação produzida suprime a resposta imune antitumoral e as células do infiltrado inflamatório interagem de tal maneira que induzem o desenvolvimento de importantes características relacionadas à progressão do câncer, envolvendo não só a evasão dos

mecanismos de vigilância imunológica, mas o crescimento, resistência, angiogênese, invasão e metástase tumorais (YARCHOAN et al., 2017).

Neste contexto, diversos mensageiros moleculares participam ativamente na sinalização e modulação de respostas durante a tumorigênese. Entre eles podem ser citadas as citocinas, glicoproteínas que regulam várias respostas biológicas em praticamente todas as reações imunes (DEMBIC, 2015). Quando liberadas, elas podem atuar localmente de maneira autócrina ou, de forma parácrina, agindo em células vizinhas localizadas a curtas distâncias (CONLON; MILJKOVIC; WALDMANN, 2019). Estas moléculas podem ativar uma resposta antitumoral ou induzir a transformação celular e malignidade, dependendo de fatores como o próprio microambiente tumoral, do balanço entre citocinas com propriedades pró e anti-inflamatórias, suas concentrações ou expressão de receptores específicos (AGGARWAL et al., 2006).

As citocinas são secretadas por diferentes células do sistema imune inato e adaptativo (YAO et al., 2016). Algumas delas serão discutidas com mais detalhes posteriormente, porém, é fundamental descrever inicialmente o papel do sistema imune inato nas respostas às células tumorais. Os diversos componentes celulares do sistema imunológico inato agem como uma barreira inicial de defesa contra as células neoplásicas (ROTHLIN; GHOSH, 2020). As células NK (do inglês *Natural Killer*), por exemplo, atuam como importantes efetores antitumorais nas respostas iniciais (WU et al., 2020), reconhecendo e eliminando as células transformadas por meio de diferentes mecanismos citotóxicos, tais como: I) a liberação do conteúdo dos seus grânulos citoplasmáticos (particularmente perforina e granzima B) na superfície da célula tumoral (KRZEWSKI; COLIGAN, 2012; OSIŃSKA; POPKO; DEMKOW, 2014; PRAGER et al., 2019); II) a ativação de mecanismos que induzem a apoptose das células alvo, via expressão de ligantes de morte, como FasL e TRAIL (HU et al., 2019; SCREPANTI et al., 2005; ZHU; HUANG; SHI, 2016); III) a secreção de diversas citocinas, principalmente IFN- γ , que ativa as funções efetoras das NKs (MÜLLER; AIGNER; STOIBER, 2017; WU et al., 2020); IV) a interação com outros componentes da imunidade inata, principalmente com as células dendríticas (DCs), que são cruciais para amplificar as respostas

mediadas por células NK (CALMEIRO et al., 2020; FERLAZZO; MORANDI, 2014).

Nesse contexto, as DCs são células especializadas na apresentação de抗ígenos, que expressam receptores *Toll-like* (TLRs, do inglês *Toll-Like Receptors*) e moléculas co-estimuladoras necessárias para a ativação de vários efetores da imunidade antitumoral, incluindo células T, realizando uma ponte entre o sistema imunológico inato e adaptativo (VEGLIA; GABRILOVICH, 2017; WCULEK et al., 2020). Em contrapartida, é relatado na literatura que, em diferentes tipos de cânceres, o recrutamento de determinadas subpopulações de DCs para o local do tumor representa um pior prognóstico da doença (LOMBARDI; KHAIBOULLINA; RIZVANOV, 2015; SAADEH; KURBAN; ABBAS, 2016), pois a sua interação com as células tumorais e o microambiente parece influenciar no surgimento de um fenótipo pró-tumoral, de maneira à contribuir para a tolerância imunológica, expansão e metástase tumoral (FUCIKOVA et al., 2019; WCULEK et al., 2020).

Outros componenentes cruciais desse sistema são os macrófagos e neutrófilos. Os macrófagos também exercem papel na apresentação de抗ígenos e, exibem uma população heterogênea, com um papel duplo na modulação da tumorigênese e das respostas antitumorais (TAMURA et al., 2018). Os macrófagos são diferenciados a partir de precursores mieloides imaturos ou monócitos circulantes, os quais são atraídos da circulação para o local do tumor por quimiocinas derivadas do tumor (NIELSEN; SCHMID, 2017; ROTHLIN; GHOSH, 2020). Estímulos distintos desencadeados por citocinas do microambiente tumoral induzem a diferenciação destes monócitos imaturos em dois tipos de macrófagos: os macrófagos do tipo 1 ou “M1”, que participam das respostas antitumorais; e os macrófagos do tipo 2 ou “M2”, que apresentam potencial invasivo e pró-tumoral (LEWIS; POLLARD, 2006; NAJAFI et al., 2019; OSTUNI et al., 2015).

Os neutrófilos são os principais mediadores das respostas inflamatórias e apresentam um papel fundamental na iniciação de cascatas de resposta imune contra tumores (GRANOT, 2019; JAILLON et al., 2020), induzindo a destruição do tumor por meio da liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs), citocinas inflamatórias ou do conteúdo de seus grânulos (LECOT et al., 2019; WU et al., 2019). Por outro lado, de forma similar aos macrófagos, os

neutrófilos também apresentam uma polarização do fenótipo, estabelecendo uma população pró-tumoral, que contribui para o crescimento, angiogênese e metástase das células tumorais (GALDIERO et al., 2018; URIBE-QUEROL; ROSALES, 2015).

O sistema imune adaptativo é representado majoritariamente pelos linfócitos B e T, os quais expressam um grande repertório de receptores, permitindo o reconhecimento específico de diferentes抗ígenos (GONZALEZ; HAGERLING; WERB, 2018). As citocinas secretadas por estas células são estruturalmente semelhantes, porém existem em amplas famílias e podem ser classificadas, por exemplo, de acordo com sua origem celular (YAO et al., 2016). Nesse contexto, os linfócitos T auxiliares CD4⁺ (Th, do inglês *T helper*) produzem três subtipos de células, relacionadas aos perfils Th1, Th2 e Th17, os quais secretam um repertório de citocinas distintas (LOMBARDI, 2017).

No perfil Th1 são produzidas citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas (IL) IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-12, além do TNF- α (Fator de Necrose Tumoral, do inglês *tumor necrosis factor*) e INF- γ (Interferon γ), responsáveis por ativar determinadas células efetoras de defesa, principalmente macrofágos e linfócitos citotóxicos CD8⁺ (CTL, do inglês *cytotoxic lymphocytes*), que atuam através da fagocitose e do sistema complemento, sendo este perfil geralmente responsável por erradicar as células tumorais (FRIDMAN et al., 2012; GONZALEZ; HAGERLING; WERB, 2018). Por outro lado, as citocinas de perfil Th2 incluem as interleucinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, que medeiam a resposta humoral anti-inflamatória e a supressão imunológica através da inibição da produção de citocinas Th1, geralmente promovendo o crescimento neoplásico, embora, a depender dos estímulos do microambiente, atue também como antitumoral (KUMAR, 2017).

As células do perfil Th17 produzem as citocinas IL-17, IL-21, IL-22 e IL-26. A IL-17 é considerada a principal representante deste perfil e consiste em uma família de seis membros (IL-17 A-F) estruturalmente relacionados (QIAN et al., 2017; SHABGAH; FATTAH; SHAHNEH, 2014). Embora seu papel ainda não esteja totalmente elucidado, sabe-se que IL-17 apresenta um papel dual na carcinogênese, podendo ter um efeito pró-tumoral ou antitumoral, dependendo do tipo de câncer (ASADZADEH et al., 2017; KUEN; KIM; CHUNG, 2020). Evidências sugerem que o papel pró-tumoral de IL-17 está relacionado à

indução da produção de moléculas que atuam na: (1) supressão das respostas imunes (CHANG, 2019; KUEN; KIM; CHUNG, 2020); (2) inibição da apoptose das células tumorais (QIAN et al., 2017; SUI et al., 2019); (3) aumento da angiogênese (DU et al., 2012; HAYATA et al., 2013; HUANG et al., 2016; PAN et al., 2015) e (4) promoção da invasão e metástase (COFFELT et al., 2015; GU et al., 2015; GUO et al., 2019; SUN et al., 2014). Por outro lado, relatos na literatura associam um aumento na sobrevida de pacientes que expressam altos níveis de IL-17 em determinados tipos de câncer (JAIN et al., 2012; LIU et al., 2014b; LU et al., 2013; PUNT et al., 2015). Uma das hipóteses para sua atividade antitumoral é de que IL-17 modula as funções efetoras de outras células do sistema imune, estimulando a ativação e recrutamento de linfócitos T citotóxicos, células NK, células dendríticas e neutrófilos para combater o tumor por meio de diferentes mecanismos (BILSKA et al., 2020; QIAN et al., 2017).

Dentre as citocinas anteriormente mencionadas, o fator de necrose tumoral (TNF- α) é uma das mais pleiotrópicas e está envolvida em processos relacionados à manutenção da homeostase imune, inflamação e defesa do hospedeiro (BALKWILL, 2006). Produzida principalmente por macrófagos ativados, linfócitos T e células natural killer (NK), esta citocina pode ser encontrada na forma solúvel ou ligada à membrana. TNF- α possui dois receptores: TNF- α receptor-1 (TNF-R1 ou p55), expresso ubliquamente, e TNF- α receptor-2 (TNF-R2 ou p75), expresso principalmente nas células imunológicas (AGGARWAL, 2003).

A nível celular, TNF- α exerce seus efeitos através de seus receptores e, dependendo do microambiente, pode ativar diferentes vias de sinalização que regulam a sobrevivência, proliferação ou morte celular (WANG; LIN, 2008). Como uma das principais citocinas pró-inflamatórias, o TNF é capaz de atuar como promotor tumoral endógeno, exarcebando a inflamação associada ao tumor e produzindo múltiplos efeitos, entre eles: 1) a modulação de células imunes do microambiente tumoral em direção a um fenótipo endotelial pró-angiogênico e pró-vasculogênico (LI et al., 2009); 2) a indução da expressão de fatores angiogênicos (SASI et al., 2012); 3) a ativação e/ou diferenciação de células imunossuppressoras, como por exemplo, células supressoras derivadas mieloides (MDSCs) (CHARLES et al., 2009; ZHAO et al., 2012) ou células T

reguladoras (TORREY et al., 2017), responsáveis pela progressão tumoral; e 4) a promoção da invasividade e metástase, através da ativação da via de sinalização NF- κ B, envolvida na transcrição de genes antiapoptóticos, bem como relacionados à inflamação, sobrevivência e proliferação tumoral (TANG et al., 2017) ou, desencadeando a transição epitelial-mesenquimal (EMT) (LIAO et al., 2019).

Por outro lado, diversos estudos têm relatado uma potente atividade antitumoral do TNF- α (JIANG et al., 2014; JOSEPHS et al., 2018; RAO; LEE; GE, 2015; ROBERTS et al., 2011). A nível molecular, os mecanismos envolvidos com seu papel antitumoral relacionam-se com: 1) a indução de morte celular necrótica (CARSWELL et al., 1975); 2) a destruição do estroma tumoral através do recrutamento/ ativação de linfócitos T citotóxicos, macrófagos (NAKAGAWA et al., 2007) ou células dendríticas no infiltrado inflamatório tumoral, desencadeando uma resposta imune eficaz, levando à rejeição tumoral (LARMONIER et al., 2007); 3) a apoptose celular por ligação a receptores de superfície de células tumorais (DONDOSSOLA et al., 2016); 4) o bloqueio da diferenciação de células imunes para fenótipos imunossupressores (KRATOCHVILL et al., 2015); 5) a modulação de células endoteliais, induzindo o colapso da microvasculatura tumoral e ruptura da neoangiogênese (HOVING et al., 2006); e 6) inibição da angiogênese tumoral (ZHAO et al., 2007). Ainda não está claro como os efeitos pró ou anti-tumorais do TNF são regulados, embora diferenças de órgãos, agentes carcinógenos, tipo e estágio do tumor parecem influenciar em sua resposta (HAM et al., 2016; MONTFORT et al., 2019; WANG; LIN, 2008).

Novas abordagens para o uso desta citocina na terapêutica vêm sendo relatadas na literatura e tem demonstrado que além de TNF- α exercer seu efeito antiproliferativo diretamente, pode atuar também como um agente facilitador à regressão tumoral, quando usado em combinação com drogas já utilizadas na oncologia clínica, devido à sua capacidade de aumentar a penetração de alguns quimioterápicos no tecido tumoral e simultaneamente reduzir a toxicidade sistêmica (CURNIS; SACCHI; CORTI, 2002; JIANG et al., 2014; ROBERTS et al., 2011; SACCHI et al., 2006). Terapias explorando o uso combinado de TNF- α com outras citocinas, tais como INF- γ , também tem sido eficazes no tratamento antitumoral (SHEN et al., 2016, 2018).

Citocinas como a interleucina-1 (IL-1) também são mediadores de muitas interações das células tumorais com seu microambiente. A família IL-1 é constituída por subtipos com atividades pró-inflamatórias (IL-1 α e IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ), bem como anti-inflamatórias (IL-37, IL-38) (BAKER; HOUSTON; BRINT, 2019). Dentre estes membros, IL-1 α e IL-1 β são de grande relevância e apresentam homologia em vários resíduos de aminoácidos, compartilhando diversas atividades biológicas devido à ligação com o mesmo receptor (IL-1R1) (OELMANN et al., 2015). Em particular, a IL-1 β tem sido extensivamente investigada na carcinogênese (BAKER; HOUSTON; BRINT, 2019; BENT et al., 2018). Esta citocina é produzida por macrófagos, monócitos e células dendríticas do microambiente tumoral, embora as células neoplásicas também possam modular seus níveis (TAN et al., 2018).

A IL-1 β possui um papel pleiotrópico e controverso no câncer (BENT et al., 2018). A literatura reporta o envolvimento desta citocina na progressão de vários tipos de tumores sólidos, incluindo câncer de mama, cólon, pulmão e melanoma (ELARAJ et al., 2006). IL-1 β promove o desenvolvimento tumoral através da indução da ativação de diversos fatores angiogênicos a partir das células tumorais e do próprio estroma (NAKAO et al., 2005; SAIJO et al., 2002), incluindo o fator de crescimento VEGF (CARMI et al., 2013), conduzindo à vias que culminam com a invasidade e metástase (GUO et al., 2016; WEICHAND et al., 2017). Contudo, sabe-se que esta citocina está envolvida em praticamente todas as fases do processo maligno (BAKER; HOUSTON; BRINT, 2019; BENT et al., 2018), atuando também através da produção de outras citocinas (como IL-6 e TNF- α) e fatores de crescimento, que exacerbam sua resposta pró-tumoral (OH et al., 2016; VOIGT et al., 2017).

Em contrapartida, IL-1 β é capaz de induzir um perfil de resposta duplo do tipo Th1 e Th17 e, assim, produzir efeitos antitumorigênicos (BAKER; HOUSTON; BRINT, 2019). De maneira geral, o mecanismo antitumoral de IL-1 β parece estar relacionado com o recrutamento de células efetoras imunes, induzindo uma resposta eficaz que auxilia na eliminação de células tumorais (BENT et al., 2018). Um estudo relatou que a injeção exógena de IL-1 β resultou na modulação da atividade de células T e regressão tumoral em camundongos imunocompetentes transplantados com sarcoma murino (NORTH et al., 1988). Haabeth e colaboradores observaram que a IL-1 β modula o microambiente

tumoral direcionando respostas voltadas ao perfil Th1, impedindo a progressão tumoral em células de mieloma e linfoma (HAABETH et al., 2011, 2016). Recentemente, foi relatado que esta citocina parece estar envolvida também no bloqueio da iniciação e colonização metastática de determinados tumores (CASTAÑO et al., 2019).

A IL-4 é uma importante citocina do perfil Th2, produzida principalmente por mastócitos, basófilos, eosinófilos e células T ativadas, desempenhando papel fundamental na regulação da sobrevivência e proliferação de linfócitos (SETRERRAHMANE; XU, 2017). No que se refere ao câncer, muitos estudos na literatura relatam a superexpressão desta citocina, bem como de seu receptor (IL-4R), em diferentes tipos de tumores humanos, incluindo glioma, ovário, pulmão, mama, pâncreas, cólon e bexiga (JOSHI et al., 2014; PROKOPCHUK et al., 2005; TODARO et al., 2008).

IL-4 pode atuar de maneira autócrina ou parácrina, induzindo a polarização de macrófagos associados ao tumor (TAM, do inglês *tumor-associated macrophages*) para um fenótipo M2, altamente invasivo e pró-tumoral (CHENG et al., 2019; ORECCHIONI et al., 2019). Os macrófagos polarizados induzem a atividade de algumas proteases, que afrouxam as junções intercelulares e degradam a matriz extracelular, resultando no crescimento, angiogênese, invasão e metástase tumoral (GOCHEVA et al., 2010; SETRERRAHMANE; XU, 2017). Ainda, a IL-4 ativa as vias intracelulares relacionadas à pSTAT6, ERK e AKT, levando à transcrição de genes relacionados ao escape da vigilância imunológica, diferenciação, crescimento celular, resistência à apoptose e invasão (CALVO et al., 2008; NAPPO et al., 2017; ZHANG et al., 2008). Por outro lado, esta citocina apresenta um papel dual na carcinogênese e, sua atividade antiproliferativa já foi reportada em alguns estudos que mostram seu envolvimento como inibidor da angiogênese (DEHNE et al., 2014) e da progressão tumoral (LEE et al., 2017a).

A IL-12, um membro-chave da família de citocinas IL-12, é conhecida como um potente indutor da imunidade antitumoral. Esta citocina é secretada inicialmente na sua forma pró-inflamatória, sendo produzida principalmente por células apresentadoras de抗ígenos (APCs), como células dendríticas, monócitos, macrófagos e células B, em resposta a infecções (MANETTI et al., 1993). Alguns mecanismos que levam às respostas celulares de IL-12 no

tecido tumoral já foram bem elucidados e envolvem uma ligação cruzada entre diversos componentes do sistema imunológico inato e adaptativo (TRINCHIERI, 2003; TUGUES et al., 2015). A IL-12 atua principalmente em células da linhagem linfóide, como células NK, células T (OTANI et al., 1999) e células linfóides inatas (ILCs, do inglês *innate lymphoid cells*) (EISENRING et al., 2010), as quais após estímulo modulam a secreção de outras citocinas, notadamente INF- α , um dos principais mediadores das ações antitumorais de IL-12 no câncer (TUGUES et al., 2015).

Além disso, a IL-12 atua nas células dendríticas, estimulando a apresentação de抗ígenos, bem como maximizando o crescimento e citotoxicidade das células NK e de linfócitos T CD8 $^{+}$ e T CD4 $^{+}$ (DEL VECCHIO et al., 2007; KERKAR et al., 2011, 2013), reduzindo o crescimento neoplásico. Neste contexto, a IL-12 polariza as respostas imunes celulares para um perfil antitumoral do tipo Th1, ao mesmo tempo em que bloqueia as respostas pró-tumorais do perfil Th2 (LASEK; ZAGOŽDŽON; JAKOBISIAK, 2014; MANETTI et al., 1993). Em contrapartida, o INF- α , secretado sob o estímulo de IL-12, está envolvido em diferentes respostas vasculares antitumorais, induzindo a regulação de moléculas de adesão, que facilitam o recrutamento de leucócitos para o microambiente tumoral, bem como a supressão da produção de fatores pró-angiogênicos, como o VEGF/VEGFR e de metaloproteinases da matriz, inibindo a neoangiogênese tumoral (GERBER et al., 2003; MITOLA et al., 2003; ZHU et al., 2013).

Em resumo, IL-12 atua diretamente ou por meio de diferentes mediadores imunológicos, que conferem suas propriedades antitumorais, o que tem incentivado estudos para o uso desta citocina na terapia tumoral em diferentes modelos animais, bem como sua combinação com outras abordagens imunoterapêuticas, incluindo a transferência de genes de outras citocinas e/ou quimiocinas, moléculas co-estimulatórias ou terapia celular adotiva (BERRAONDO et al., 2018).

Como mencionado anteriormente, o interferon gama (INF- γ) foi classicamente reconhecido como uma citocina com atividades antitumorais (TANNENBAUM; HAMILTON, 2000), que desempenha diversas funções biológicas, principalmente relacionadas à regulação das respostas imunes (inata e adaptativa) e defesa do hospedeiro, incluindo a defesa antiviral e

antibacteriana, além de modular o ciclo celular, apoptose e processos inflamatórios (CASTRO et al., 2018; SCHRODER et al., 2004). Esta citocina está envolvida no direcionamento das respostas imunes a um perfil Th1, através de mecanismos que promovem o desenvolvimento, recrutamento e ativação de células imunes que atuam na eliminação do tumor, incluindo: 1) a imunidade inata, particularmente através da ativação das funções efetoras de células NK; 2) a imunidade citotóxica específica, promovida por meio da inibição da diferenciação das células Th2/ Th17; 3) polarização de macrófagos para um fenótipo pró-inflamatório/ antitumoral do tipo M1; 4) ativação de células dendríticas e 5) regulação da diferenciação e das atividades citotóxicas das células T (CASTRO et al., 2018; JORGOVANOVIC et al., 2020; NI; LU, 2018; ROŽMAN; ŠVAJGER, 2018).

Os efeitos antitumorais de INF- γ são, entretanto, contrabalanceados pelos recentes relatos de seu papel pró-tumoral, descrito em diferentes estudos na literatura (NI; LU, 2018; ROŽMAN; ŠVAJGER, 2018; SONG et al., 2019). O IFN- γ parece contribuir para a evasão das células neoplásicas por estimular a tumorigênese, promovendo a expressão de moléculas tolerantes e induzindo programas de homeostase, que atuam na persistência tumoral (NI; LU, 2018). Evidências na literatura apontam que IFN- γ altera o microambiente imune, induzindo as células tumorais e estromais a expressarem moléculas inibitórias que atenuam a imunidade antitumoral (CASTRO et al., 2018; JORGOVANOVIC et al., 2020; NI; LU, 2018).

Um dos principais mecanismos de escape ocorre por meio da supressão do reconhecimento e das respostas efetoras mediadas por linfócitos T citotóxicos e células NK (CASTRO et al., 2018). Por exemplo, existem relatos de que IFN- γ estaria envolvido no acúmulo de MDSCs (CRIPPS et al., 2010) e na expressão de ligantes imunossupressores no tecido tumoral, tais como PDL-1 (do inglês, *programmed cell death-ligand 1*) (ABIKO et al., 2015; LANE et al., 2018; MANDAI et al., 2016) e IDO (do inglês, *indoleamine-2,3-dioxygenase*) (BANZOLA et al., 2018; FOLGIERO et al., 2015; SCHALPER et al., 2017), consequentemente suprimindo a ativação de linfócitos T citotóxicos ou inibindo sua migração até o tumor. Recentemente, foi demonstrado que IFN- γ também induz a apoptose em células T, comprometendo a imunidade antitumoral (PAI et al., 2019).

Além disso, IFN- γ promove a expressão de moléculas que favorecem a angiogênese (LU et al., 2014), invasividade e metástase tumoral (CHAPELA et al., 2015; LO et al., 2019; SINGH et al., 2020; SONG et al., 2019).

2.6 Estresse oxidativo e câncer

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são subprodutos do metabolismo celular aeróbico, contendo átomos de oxigênio, com um ou mais elétrons não-emparelhados, instáveis e altamente reativos, os quais incluem o radical hidroxila (OH^-), ânions superóxido (O_2^-), oxigênio singlet ($^1\text{O}_2$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (KATAKWAR et al., 2016; RAZA et al., 2017). Por muito tempo as EROs foram relacionadas à toxicidade e surgimento de enfermidades, como o câncer, porém, atualmente seu conceito vem sendo reformulado e sabe-se que estas moléculas também atuam como sinalizadores em diversos processos fisiológicos e biológicos que ocorrem em células com funções normais, incluindo a destruição de patógenos invasores, cicatrização de feridas, reparo tecidual e adaptação à hipóxia (HOLMSTRÖM; FINKEL, 2014; SCHIEBER; CHANDEL, 2014).

As EROs podem ser produzidas a partir de diferentes origens. As fontes endógenas potenciais incluem a ativação de processos inflamatórios (CHELOMBITKO, 2018) e diversos compartimentos intracelulares, entre os quais o retículo endoplasmático, peroxissomos e notadamente as mitocôndrias, que constituem um dos principais contribuintes do estresse oxidativo em mamíferos, gerando grande parte das EROs através da cadeia transportadora de elétrons (KATAKWAR et al., 2016; RANI; SINGH YADAV, 2015). Além disso, diversas enzimas catalisam reações químicas que produzem EROs, por exemplo, as peroxidases, NADPH oxidase, isoformas de NADPH oxidase, xantina oxidase, lipoxigenases, glicose oxidase, mieloperoxidases, óxido nítrico sintase e ciclooxigenases (KATAKWAR et al., 2016; KULKARNI; KUPPUSAMY; PARINANDI, 2007). Existem vários gatilhos externos que também contribuem para a produção destas moléculas e incluem poluentes atmosféricos, fumaça do tabaco, radiações ionizantes e não ionizantes, determinados alimentos e drogas, metais pesados, solventes orgânicos, pesticidas, bem como xenobióticos (BHATTACHARYYA et al., 2014).

Embora as reações de oxidação sejam essenciais para muitas funções fisiológicas, a produção desequilibrada de EROs pode ter consequências nocivas para a homeostase celular, causando danos em importantes estruturas celulares como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (GHOSH et al., 2018). Neste contexto, sistemas antioxidantes agem em conjunto para eliminar estas espécies, bloqueando sua geração ou aumentando as capacidades antioxidantes endógenas, tentando manter um equilíbrio redox (HE et al., 2017; SNEZHINA et al., 2019).

Os antioxidantes podem ser obtidos a partir de fontes endógenas ou exógenas e são agrupados em duas categorias: enzimáticos e não enzimáticos (GEORGE; ABRAHAMSE, 2020). Os primeiros incluem enzimas que catalizam a conversão de diferentes radicais livres à subprodutos menos reativos e tóxicos. Como exemplos de antioxidantes enzimáticos podemos citar a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a peroxirredoxina (Prx), a glutationa peroxidase (GPx) e a tiorredoxina (Trx) (HE et al., 2017; KATAKWAR et al., 2016). Os antioxidantes não enzimáticos incluem vitaminas lipossolúveis (vitamina A, vitamina E) e hidrossolúveis (vitamina C, vitaminas do complexo B), carotenóides (como o beta-caroteno), minerais (zinco, cobre, selênio, magnésio), metabólitos (glutationa - GSH, bilirrubina, melatonina, ácido úrico) e polifenóis (derivados de plantas que incluem flavonóides, fenóis, ligninas e taninos) (BHATTACHARYYA et al., 2014; GEORGE; ABRAHAMSE, 2020).

Quando os mecanismos antioxidantes não são capazes de restaurar os níveis adequados de EROs para manter um equilíbrio entre as reações de oxidação e redução, a célula entra em uma condição chamada de estresse oxidativo (PIZZINO et al., 2017). Se este estado celular persistir, os danos ocasionados podem levar a alterações em moléculas envolvidas nos mecanismos de sinalização, expressão de genes relacionados à sobrevivência, proliferação, transformação, mutagênese e morte celular (SOSA et al., 2013).

Sabe-se que EROs desempenham um papel vital em todas as fases carcinogênese, e os danos gerados às células dependem do tipo e reatividade dos radicais envolvidos (GALADARI et al., 2017). Na fase de iniciação, EROs induzem modificações oxidativas que causam mutações no DNA, dando ínicio ao processo de transformação maligna (AGGARWAL et al., 2019). Posteriormente, na etapa de promoção, EROs pode estimular a expansão

clonal da população celular mutada, modulando transitoriamente genes relacionados à proliferação ou morte celular, através da regulação da atividade de importantes fatores de transcrição (tais como o fator nuclear κB (NFκB) e Nrf2 (fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2), bem como de genes supressores tumorais (por exemplo, p53) ou oncogenes (por exemplo, KRAS), que controlam a oncogênese, crescimento e evasão da morte celular (MOLONEY; COTTER, 2018; MORGAN; LIU, 2011; PUAR et al., 2018; SON et al., 2011; ZHANG et al., 2016).

Ainda, estes radicais ativam mecanismos indutores da sobrevivência celular, notadamente a via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e PI3K/Akt/mTOR, alvos já conhecidos em muitos tipos de cânceres, resultando na inibição de proteínas pró-apoptóticas, bem como a regulação de genes antiapoptóticos (ZHANG et al., 2016). Como as EROs são um subproduto do metabolismo celular e de ambientes com hipóxia (ambas as condições amplificadas nas células cancerígenas para sustentar sua alta capacidade proliferativa), nesta fase (promoção) é observada uma elevação dos níveis destes intermediários reativos (YANG et al., 2018).

A perda de genes supressores de tumor, em decorrência das mutações desencadeadas na fase de iniciação, pode contribuir para diminuição da eliminação de EROs (SCHIEBER; CHANDEL, 2014). Consequentemente, os altos níveis de EROs favorecem a transição para última etapa da carcinogênese (progressão), contribuindo para a instabilidade genética, invasividade e potencial metastático das células tumorais (DONG; LIU, 2016). Neste contexto, é relatado que EROs regula positivamente a produção de metaloproteinases da matriz (SHINOHARA et al., 2010), bem como de VEGF (KHROMOVA et al., 2009), desencadeando a angiogênese e estimulando às células a invadirem outros tecidos locais, estabelecendo metástases (LIAO et al., 2019; XIA et al., 2007).

Em contrapartida, a literatura tem relatado que quando EROs alcançam níveis muito altos no microambiente tumoral, este pode assumir um papel antitumoral, atuando por mecanismos que estimulam a parada do ciclo celular, consequentemente impedindo o crescimento e a divisão das células cancerígenas, levando à senescência ou morte celular (RECZEK; CHANDEL, 2017). EROs promovem morte celular principalmente através da ativação das

vias mediadas por ASK1/JNK/P38 MAPK (DONG; LIU, 2016; RECZEK; CHANDEL, 2017). As proteínas quinases ASK1 (do inglês *Apoptosis signal-regulating kinase 1*) e P38 atuam como sensores às variações no ambiente redox, estimulando a ativação da apoptose nas células neoplásicas ao detectar níveis excessivos de EROs (DOLADO et al., 2007; HAN; SUN, 2007; RAZA et al., 2017). A sinalização P38/JNK MAPK induzida por EROs também pode levar à uma regulação negativa das proteínas ciclinas e estimulação de CDKs (inibidores das cinases dependentes de ciclina), resultando na parada do ciclo celular (THORNTON; RINCON, 2009).

Atualmente, a projeção de terapias utilizando agentes geradores de EROs em combinação com inibidores de sequestradores de EROs (isto é, inibidores de sistemas antioxidantes) tem ganhado atenção nos tratamentos anticâncer. Estas terapias visam diminuir a defesa antioxidant (geralmente bastante elevada em células cancerígenas) para induzir as células tumorais à morte celular (AGGARWAL et al., 2019; RAZA et al., 2017; RECZEK; CHANDEL, 2017). Por outro lado, o uso de terapias com moléculas antioxidantes, visando reduzir os níveis de EROs abaixo do limiar nos quais elas modulam positivamente o desenvolvimento tumoral, também representam estratégias promissoras (AMMAR et al., 2020; GEORGE; ABRAHAMSE, 2020; GOTHLAI et al., 2018; SINGH et al., 2018; THYAGARAJAN; SAHU, 2018).

Apesar disso, é fundamental que estudos adicionais sejam realizados neste campo de pesquisa, buscando identificar e direcionar vias moleculares usadas seletivamente pelas células cancerígenas, tentando manter o equilíbrio redox, diminuir a resistência aos quimioterápicos convencionais, bem como utilizar estas terapias combinadas a outros tratamentos (AGGARWAL et al., 2019).

2.7 Farmacoterapia do câncer

O tratamento padrão para o câncer inclui três modalidades terapêuticas principais: a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia. A escolha do tratamento mais adequado depende do tipo de câncer, localização e estágio evolutivo em que o mesmo se encontra, embora na maioria das vezes seja indicada a utilização de mais de uma modalidade simultaneamente (SCHIRRMACHER,

2019).

A cirurgia consiste na remoção do tumor contido em um local específico. Este procedimento é considerado promissor na fase inicial de determinados tipos de câncer, em pacientes de baixo risco, pois resulta em menos danos aos tecidos circundantes quando comparado a outras modalidades (ABBAS; REHMAN, 2018; MILLER et al., 2019). Em alguns casos é necessário realizar uma terapia adicional, neste contexto, a radioterapia é uma alternativa, e este tratamento utiliza altas doses de radiação com o objetivo de destruir as células tumorais ou reduzir o desenvolvimento de tumores localizados. Entretanto, a radioterapia causa efeitos adversos nos pacientes, já que ela também atinge as células normais, localizadas na periferia da massa tumoral alvo (ABBAS; REHMAN, 2018).

A quimioterapia convencional é a forma de tratamento mais utilizada atualmente e consiste na administração de drogas que interferem diretamente no DNA ou em moléculas chave do próprio metabolismo celular, as quais comandam os processos de proliferação e morte celular, agindo de forma sistêmica no organismo (FERNANDO; JONES, 2015).

Existem diferentes quimioterápicos utilizados na clínica, os quais podem ser classificados com base nos seus mecanismos de ação em: a) *agentes alquilantes*, como por exemplo, a ciclofosfamida e cisplatina, que se ligam ao DNA, promovendo sua alquilação, isto é, a adição de grupos alquila nas bases nitrogenadas, o que gera danos ao DNA e impede que a célula se prolifere; b) *antimetabólitos*, projetados tendo como base o uso de moléculas que mimetizam e substituem os metabólitos incorporados no DNA ou RNA, bloqueando bioquimicamente a síntese do DNA na fase S do ciclo celular. Como exemplos o 5-fluorouracil (5-FU), a mercaptopurina e o metotrexato estão incluídos; c) *antibióticos*, que atuam nas enzimas envolvidas na replicação do DNA, bloqueando a proliferação celular. Exemplos clássicos de antibióticos antitumorais são as antraciclinas (daunorrubicina, doxorrubicina, epirrubicina e idarrubicina); d) *inibidores das topoisomerases*, enzimas que estão envolvidas no desenrolamento do DNA durante a replicação e transcrição, como os derivados da camptotecina (topotecano e irinotecano, inibidores da topoisomerase I) e das epipodofilotoxinas (etoposido, inibidor da topoisomerase II); e) *inibidores mitóticos*, que geralmente são compostos

derivados de produtos naturais, como plantas, e atuam impedindo as células de se dividirem, modulando diferentes alvos em todas as fases do ciclo. A vinblastina, vincristina (inibe a polimerização dos microtúbulos) e paclitaxel (inibe a despolimerização dos microtúbulos) são representantes desta classe de quimioterápicos (HUANG et al., 2017b).

Embora por vezes seja uma terapia eficiente, o tratamento quimioterápico ainda apresenta diversas limitações, entre elas, os custos inerentes ao tratamento (WORKMAN et al., 2017) e o emergente desenvolvimento de resistência, que está intimamente relacionado com fatores como a diminuição da absorção ou da ativação do fármaco, o aumento do efluxo e metabolismo do fármaco, modificações das proteínas alvo e inibição da apoptose (ALFAROUK et al., 2015; FERNANDO; JONES, 2015). Além disso, apesar de ter como alvo principal a célula tumoral, os quimioterápicos atuam de forma não seletiva, afetando também as células saudáveis (SMITH; PREWETT, 2017), o que desencadeia diversos efeitos secundários debilitantes para os indivíduos, levando à uma redução significativa da qualidade de vida dos mesmos. A toxicidade varia de acordo com o farmáco específico, a dose, a via de administração ou fatores de predisposição do indivíduo, porém, os efeitos colaterais mais comuns incluem: náuseas, vômitos, alterações gastrointestinais, alopecia e mielossupressão (leucopenia, trombocitopenia e anemia) (NURGALI; JAGOE; ABALO, 2018; SMITH; PREWETT, 2017).

Ao longo dos anos, um maior entendimento dos diversos mecanismos envolvidos com a carcinogênese estimulou o surgimento de outras terapias anticâncer. Dentre estas novas estratégias encontra-se a terapia alvo. Iniciada nos anos 90, com a premissa de utilizar agentes dirigidos contra alvos tumorais específicos, esta modalidade de tratamento vem expandindo rapidamente nos últimos anos, principalmente após aprovação pela agência FDA (SEEBACHER et al., 2019).

A terapia alvo atua na destruição seletiva das células tumorais, reconhecendo fatores de crescimento, receptores ou outros transdutores de sinais alterados especificamente em células tumorais, apresentando simultaneamente baixa toxicidade para as células saudáveis, o que proporciona uma melhora significativa na eficácia do tratamento e sobrevida dos indivíduos com câncer (KE; SHEN, 2017). As terapias dirigidas para alvos

específicos tem como instrumentos os anticorpos monoclonais (mAb) e os inibidores de pequenas moléculas, destes, a utilização de mAb constitui a maioria das terapias alvo empregadas na clínica (SEEBACHER et al., 2019).

Atualmente, anticorpos quiméricos, humanizados e totalmente humanos são autorizados para o tratamento do câncer, podendo atuar em diferentes alvos (GRIMSLEY; SHAH; MCKIBBIN, 2013). Um exemplo é o bevacizumab (Avastin®, Genentech), um mAb humanizado que se liga especificamente à um importante fator pró-angiogênico, o VEGF-A (fator de crescimento do endotélio vascular tipo A), resultando na remodelação/regressão da vasculatura do tumor e bloqueio da neoangiogênese (ELLIS, 2006; WILLETT et al., 2004). Além disso, o bevacizumabe também parece induzir, secundariamente, efeitos apoptóticos em células tumorais (WANG et al., 2015). Após seu sucesso em ensaios clínicos, o bevacizumabe atualmente é aprovado para utilização no tratamento de câncer colorretal, glioblastoma, câncer de ovário, câncer renal, câncer de mama e câncer cervical (SEEBACHER et al., 2019).

Outro exemplo de mAb alvo dirigido é o cetuximabe (Erbitux®, Bristol-Myers Squibb/Merck KgaA), um anticorpo quimérico humano-murino que atua inibindo o EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico), um receptor tirosina quinase que é frequentemente mutado e/ou superexpresso em alguns tipos de tumores, favorecendo o controle de vias pró-tumorigênicas (MARTINELLI et al., 2009; PATEL et al., 2007; SIGISMUND; AVANZATO; LANZETTI, 2018). Este anticorpo atualmente é utilizado no tratamento de carcinomas em estágios metastáticos, incluindo o câncer colorretal, câncer de pulmão de células não pequenas e câncer de células escamosas da cabeça e pescoço (SEEBACHER et al., 2019).

Os inibidores de pequenas moléculas possuem a capacidade de atravessar a membrana plasmática e interagir com várias estruturas, independente da localização celular (HOELDER; CLARKE; WORKMAN, 2012). Neste contexto, a maioria destes agentes são inibidores de tirosina cinase (TKIs) (SEEBACHER et al., 2019), os quais foram projetados para interferir nas funções de proteínas do tipo tirosina quinases, importantes mediadores de múltiplas vias na carcinogênese (DU; LOVLY, 2018; MARCINKOWSKA; GOCEK, 2016). Um exemplo de TKIs é o lapatinibe (TykerbTM®, GlaxoSmithKline, NC, EUA), utilizado no tratamento do câncer de mama e que

age bloqueando simultaneamente o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e o receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER-2) (MEDINA; GOODIN, 2008; NELSON; DOLDER, 2006).

Outra modalidade de tratamento que também utiliza agentes dirigidos especificamente às células tumorais é a imunoterapia, a qual tem como proposta o emprego de moléculas que estimulam o sistema imunológico a reconhecer e combater de forma mais efetiva as células cancerígenas (JOSHI; DURDEN, 2019). Vários tipos de imunoterapias são utilizadas contra o câncer e incluem: 1) inibidores de “checkpoints” imunes; (2) terapia de transferência de células T ou terapia celular adotiva; (3) anticorpos monoclonais; (4) vacinas de tratamento; e (5) moduladores do sistema imunológico, como por exemplo, as citocinas (ZHANG; CHEN, 2018).

Por fim, a terapia hormonal utiliza agentes não-dirigidos, que atuam de forma sistêmica, suprimindo a produção de hormônios ou bloqueando a ligação destes com seus receptores, com a finalidade de privar as células tumorais dos estímulos necessários para sua replicação (EL SAYED et al., 2019). Este tratamento é utilizado em tumores que são hormoniossensíveis, como por exemplo, no câncer de mama, próstata, útero e ovário (NAMIKI; UENO; KITAGAWA, 2012; TREMONT; LU; COLE, 2017). Entre os agentes utilizados nesta modalidade terapêutica estão o tamoxifeno (CLEMONS; DANSON; HOWELL, 2002) e a flutamida (ZACHARIA, 2017), moduladores competitivos do receptor de estrogênio e de androgênio, respectivamente.

Embora promissoras para determinados tipos de cânceres, estas terapias personalizadas e mais dirigidas, particularmente a imunoterapia e terapia alvo, apresentam um custo elevado (MAILANKODY; PRASAD, 2015; PRASAD; DE JESÚS; MAILANKODY, 2017; SEIGER et al., 2020) e, portanto, não são acessíveis à grande parte da população.

2.8 Modelos experimentais para a avaliação de novas drogas com potencial antitumoral

O uso de modelos experimentais tem sido relevante para o estudo e a investigação dos mecanismos de ação de muitos compostos com atividade antitumoral. Neste contexto, tanto os ensaios *in vitro* quanto *in vivo* constituem

ferramentas importantes na triagem de novas substâncias com potencial farmacológico (KUMAR; BAJAJ; BODLA, 2016).

Os ensaios *in vitro* envolvem a utilização de células humanas tumorais mantidas em cultivo, sob condições ambientais e nutricionais controladas que permitem seu crescimento fora de um tecido/orgão do organismo (KITAEVA et al., 2020). As células empregadas nestes ensaios são provenientes principalmente de culturas primárias ou de linhagens celulares, sendo a escolha dependente do objetivo e natureza dos experimentos planejados. As culturas primárias são obtidas a partir da desagregação mecânica ou enzimática de órgãos ou tecidos, de origem humana ou animal, seguida pelo subcultivo em condições apropriadas. As culturas primárias preservam grande parte das características fenotípicas e genotípicas do tecido original *in vivo*, o que permite estudar as particularidades específicas de determinado tipo celular ou órgão. Todavia, as células provenientes desta forma de cultivo crescem por um tempo finito em cultura, uma vez que não suportam muitos repiques, sofrendo morte celular naturalmente por apoptose (ASTASHKINA; MANN; GRAINGER, 2012). Como exemplo pode-se citar a cultura primária de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), que é isolada a partir do sangue humano e utilizada na investigação dos efeitos citotóxicos de potenciais agentes anticâncer (CAMPOS et al., 2017; GAJEK et al., 2020; LISBOA et al., 2019; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ; TAVÁREZ; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, 2019; ŽIVKOVIĆ et al., 2016).

As células resultantes da cultura primária que apresentarem uma maior capacidade de proliferação e adaptação às novas condições do meio originam as linhagens celulares. Estas culturas ainda preservam algumas características dos tecidos originais e exibem um potencial de replicação indefinido, possibilitando a formação de bancos de células a partir de sua criopreservação, o que permite seu uso por longos períodos em comparação às culturas primárias (ASTASHKINA; MANN; GRAINGER, 2012; HYNDS; VLADIMIROU; JANES, 2018; KITAEVA et al., 2020). Várias organizações globais trabalham com o depósito e distribuição de linhagens celulares, fornecendo um painel diversificado de tumores sólidos e hematopoiéticos, além das principais informações necessárias para subcultura, o que contribui para que este seja

um modelo frequentemente utilizado nos estudos *in vitro* (HOLBECK et al., 2017; KITAEVA et al., 2020; NAKATSU et al., 2007; TAKIMOTO, 2003).

Atualmente, existem diferentes métodos para mensurar a viabilidade celular e a citotoxicidade *in vitro* de agentes com potencial antitumoral (LAGE et al., 2018). Geralmente, os ensaios antiproliferativos disponíveis são baseados em parâmetros que avaliam a atividade metabólica das células, enzimas celulares específicas, produção de ATP celular, síntese de DNA e permeabilidade da membrana celular a corantes vitais, fornecendo um indicativo da viabilidade celular, que permite inferir se as moléculas testadas possuem efeitos citotóxicos ou antiproliferativos em células cancerígenas (ADAN; KIRAZ; BARAN, 2016).

Neste contexto, muitos ensaios colorimétricos foram desenvolvidos para triagem de compostos ativos, geralmente tendo como princípio a conversão de substratos específicos na presença de enzimas intracelulares em células metabolicamente ativas, resultando em um produto colorido que é relativamente proporcional ao número de células viáveis (EDIRIWEERA; TENNEKOON; SAMARAKOON, 2019). O ensaio de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) é um exemplo deste tipo de ensaio colorimétrico, sendo usualmente empregado como passo inicial na identificação de moléculas com atividade antitumoral (CHENG et al., 2018; LISBOA et al., 2019; MOSMANN, 1983; NORDIN et al., 2019; ZHANG et al., 2018).

A citotoxicidade também pode ser avaliada por meio de técnicas de microscopia, empregando o uso de sondas fluorescentes que baseadas em diferentes princípios permitem investigar os efeitos do tratamento na morfologia e viabilidade celular (MÉRY et al., 2017; TAN; NORHAIZAN, 2019; ZHOU et al., 2018). Além destas abordagens, é importante mencionar a citometria de fluxo, uma ferramenta que utiliza sistemas de detectores para analisar células ou partículas em suspensão. A fluorescência emitida e os sinais luminosos detectados são transformados em dados e armazenados em um computador para posterior análise (FLORES-GONZALEZ; CANCINO-DÍAZ; CHAVEZ-GALAN, 2020; MCKINNON, 2018). Uma variedade de reagentes fluorescentes podem ser utilizados nos ensaios de citometria, permitindo a caracterização de múltiplos parâmetros, incluindo a morfologia (tamanho e granulosidade celular,

por exemplo), a quantificação celular, análise da expressão de alvos moleculares específicos, determinação do conteúdo de DNA ou RNA, estimativa da viabilidade celular, entre outras aplicações (ADAN et al., 2017).

Entretanto, a avaliação *in vitro* nem sempre é um modelo fisiologicamente adequado para ser utilizado isoladamente, devido à perda de algumas características genéticas que ocorrem ao longo dos ciclos de proliferação celular em cultura, levando ao surgimento de diferenças em relação às células encontradas nos seus tecidos *in vivo* (EMANUELE, 2014). O uso de modelos murinos para pesquisa em câncer é uma estratégia interessante para a busca e entendimento dos mecanismos de ação de compostos ativos, o que pode validar os estudos não clínicos e contribuir para o desenvolvimento de um futuro agente terapêutico (DAY; MERLINO; VAN DYKE, 2015; VAN DYKE; JACKS, 2002). Além disso, alguns modelos experimentais apresentam respostas à terapia e comportamentos biológicos similares aos humanos, o que permite estudar certos tipos de cânceres com os detalhes mais próximos da realidade, um dos motivos pelo qual estes modelos ainda têm sido bastante utilizados na pesquisa oncológica (FRAJACOMO et al., 2016; GARGIULO, 2018).

O carcinoma de Ehrlich é um adenocarcinoma mamário murino espontâneo, transplantável e amplamente utilizado na investigação dos efeitos antitumorais de diversas moléculas (ELKHAWAGA; GEBRIL; SALAH, 2019; FERREIRA et al., 2020; HASHEM et al., 2020; LISBOA et al., 2019; MANGUEIRA et al., 2017; OZASLAN et al., 2011; SANTOS et al., 2018). Este tumor apresenta células pouco diferenciadas, com uma alta capacidade de transplante, sem regressão, rápida proliferação e comportamento agressivo (FERNANDES et al., 2015; KABEER et al., 2019). Dependendo da via de inoculação, o tumor de Ehrlich pode se desenvolver sob duas formas: 1) ascítica, quando administrado por via intraperitoneal ou 2) sólida, quando inoculado por via subcutânea (GÜMÜŞHAN; MUSA, 2008; MANDAL et al., 2010). A forma ascítica é amplamente utilizada nas pesquisas (FERNANDES et al., 2015; IBRAHIM et al., 2018; MANGUEIRA et al., 2017; RAHMAN et al., 2017; FERREIRA et al., 2020) e oferece vantagens em comparação com a forma sólida, pois é possível obter uma suspensão homogênea de células tumorais (coletada a partir da cavidade peritoneal dos camundongos) que

permite a determinação de alguns parâmetros importantes, tais como o volume da ascite e a viabilidade das células tumorais (FERNANDES et al., 2015).

Recentemente, um pequeno peixe de água doce tropical, conhecido popularmente como peixe-zebra (*Danio rerio*), tem sido utilizado como um modelo animal alternativo em muitos campos de pesquisas, incluindo toxicologia, oncologia, biologia do desenvolvimento, genética, patologia, doenças neurodegenerativas e na farmacologia (BAMBINO; CHU, 2017; GEHRIG; PANDEY; WESTHOFF, 2018; NAKAYAMA; MAKINOSHIMA, 2020; SALEEM; KANNAN, 2018; SANTORO, 2014; VAZ; OUTEIRO; FERREIRA, 2018; ZHAO et al., 2019). Um conjunto de características promissoras favorece o seu uso na experimentação, entre elas pode-se mencionar: (1) a capacidade de gerar significativas quantidades de ovos, o que garante um efetivo fornecimento de animais para os ensaios; (2) são translúcidos e apresentam fertilização externa, permitindo que observações morfológicas sejam realizadas prontamente e 3) o baixo custo, fácil manuseio e manutenção, em comparação a outros modelos animais, como roedores (HILL et al., 2005; TEAME et al., 2019).

Além disso, a literatura relata um alto grau de conservação entre o genoma humano e o do peixe-zebra. A comparação dos genomas mostrou que 70% dos genes codificados pelo peixe-zebra são semelhantes a genes humanos, enquanto cerca de 82% dos genes alvos associados a doenças humanas estão conservados neste organismo (HOWE et al., 2013). Indícios de similaridade da fisiologia e de algumas vias metabólicas de drogas também constituem resultados promissores (MACRAE; PETERSON, 2015), já que neste contexto, a triagem de novas drogas com potencial terapêutico, bem como estudos toxicológicos nestes organismos, podem refletir as respostas farmacológicas em humanos (CABALLERO; CANDIRACCI, 2018; HILL et al., 2005; PARNG et al., 2002).

2.9 Derivados acridínicos

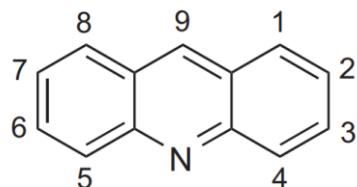
Diante da problemática envolvendo os dados epidemiológicos já mencionados, além da toxicidade e o emergente desenvolvimento de

resistência aos antineoplásicos atuais, a pesquisa por novas drogas com potencial antitumoral permanece constante.

Neste contexto estão inseridos os derivados da acridina, uma série de moléculas contendo um anel planar (LAFAYETTE et al., 2013), o qual pode ser alvo para diferentes modificações químicas, produzindo novas estruturas com diversas atividades biológicas relatadas na literatura, tais como antitumoral, anti-inflamatória, antimicrobiana, antiparasitária, antiviral e fungicida, devido à interação com diferentes alvos moleculares (DE ALMEIDA et al., 2015; GENSICKA-KOWALEWSKA; CHOLEWIŃSKI; DZIERZBICKA, 2017; KUKOWSKA, 2017).

As acridinas são compostos aromáticos policíclicos, formados por dois anéis de benzeno fundidos a um anel de piridina no centro (DE ALMEIDA et al., 2015; KUMAR; KAUR; KUMARI, 2012; SCHMIDT; LIU, 2015) (Figura 8). As atividades biológicas destes agentes são atribuídas à planaridade das suas estruturas aromáticas, que se intercalam no DNA, influenciando em funções celulares, tais como através da inibição de topoisomerase (BARROS et al., 2012; DE ALMEIDA et al., 2015; OLSZEWSKA et al., 2014).

Figura 8 - Estrutura química da acridina



Fonte: Adaptado de Schmidt; Liu, 2015.

As topoisomerases são enzimas que atuam na manutenção da topologia do DNA durante os processos de replicação e transcrição, sendo alvos de importantes drogas anticâncer atualmente utilizadas na clínica (HEVENER et al., 2018). A intercalação de compostos ao DNA (tais como os acridínicos) induz mudanças estruturais locais, incluindo o desenrolamento da dupla hélice e o alongamento da fita do DNA, o que consequentemente pode causar danos

ao DNA (SONDHI et al., 2010), induzir a parada do ciclo celular (OLSZEWSKA et al., 2014) ou morte celular por apoptose (LANG et al., 2013).

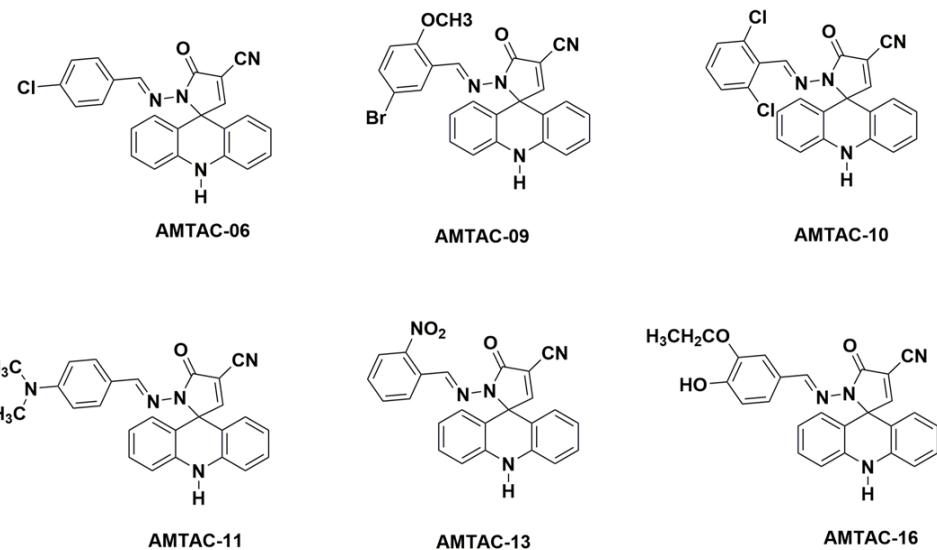
Algumas acridinas entraram em ensaios clínicos e foram aprovadas para uso clínico, destacando-se a Amsacrina (m-AMSA), um dos primeiros derivados acridínicos reconhecido como agente antitumoral, em 1976 (HORNEDO; VAN ECHO, 1985). Esta droga apresenta atividade contra leucemias e linfomas (KETRON et al., 2012), intercalando no DNA e inibindo as enzimas topoisomerase I e II (BARROS et al., 2012, 2013; SZAFRAN et al., 2018). No entanto, fatores como os efeitos colaterais, o desenvolvimento de resistência e a baixa biodisponibilidade, fazem com que a Amsacrina possua limitada efetividade terapêutica (BARROS et al., 2013; LANG et al., 2013; ZHANG et al., 2014). Esses fatores vêm impulsionando os químicos a modificar estruturalmente a acridina, como por exemplo, através da introdução de substituintes ou anéis heterocíclicos diferentes, com o objetivo de produzir diferentes derivados que exibam atividade antitumoral significante e maior seletividade tumoral (GENSICKA-KOWALEWSKA; CHOLEWIŃSKI; DZIERZBICKA, 2017).

Considerando a potencialidade destas moléculas, a equipe de pesquisa do Laboratório de Oncofarmacologia (OncoFar) do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil) tem realizado estudos com diferentes análogos desta classe, com o objetivo de investigar sua toxicidade e atividade antitumoral. Resultados preliminares demonstraram baixa toxicidade e potente atividade antitumoral *in vivo* em modelo de Carcinoma Ascítico de Ehrlich, dos derivados acridínicos ACS-AZ10 (N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)acrilohidrazida) (MANGUEIRA et al., 2017), ACS-03 (2-((6-Cloro-2-metoxiacridina-9-il)amino)-5,6,7,8-tetra-hidro-4H-ciclo-hepta[b]-tiofeno-3-carbonitrila) (LISBOA et al., 2019), AMTAC-07 ((*E*)-1'-{(4-flúorbenzilideno)-amino}-5'oxo-1,5'diidro-10*H*-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'carbonitrila) (BATISTA, 2019), ACMD (5'-oxo-1'-fenil-1',5'-diidro-10*H*-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila) (SOUSA, 2019) e AMTAC-17 ((*E*)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxi-benzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10*H*-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila) (SILVA et al., 2019).

Ainda, os compostos ACS-03 (LISBOA et al., 2019), AMTAC-07 (BATISTA, 2019), AMTAC-17 (SILVA, 2020) e ACMD (SOUSA, 2019) apresentaram também atividade antitumoral *in vitro* em diferentes linhagens de células tumorais humanas.

Recentemente, derivados chamados espiro-acridínicos foram obtidos por ciclização espontânea, produzindo um anel espiro de cinco ou seis membros ligado ao carbono C-9 da acridina (DE ALMEIDA et al., 2016). Estes autores avaliaram a capacidade destas moléculas em se intercalar ao DNA, demonstrando a sua atividade inibitória sob a enzima topoisomerase II a comparável ao padrão da Amsacrina, bem como atividade antiproliferativa frente linhagens de células tumorais humanas *in vitro*. Baseado nestes resultados, Gouveia e colaboradores (2018) deram continuidade a esta vertente e realizaram a síntese de espiro-acridínicos inéditos contendo diferentes substituintes no anel fenólico (Figura 9), os quais não apresentam relatos na literatura a respeito de sua atividade farmacológica ou toxicidade, denominados: (E)-1'-((4-clorobenzilideno) amino) - 5'- oxo 1',5'- diidro - 10H - espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila **(AMTAC-06)**; 1'-((5-bromo-2-metoxibenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5',9a,10-tetrahidro-4aH-espiro [acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila **(AMTAC-09)**; 1'-((2,6-diclorobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5',9a,10-tetrahidro-4aH-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila **(AMTAC-10)**; 1'-((4-(dimetilamino)benzilideno)amino)-5'-oxo-1',5',9a,10-tetrahidro-4aH-espiro [acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila **(AMTAC-11)**; 1'-((2-nitrobenzilideno)amino)-5'- oxo- 1', 5', 9a, 10 – tetrahidro - 4aH – espiro [acridina - 9, 2' - pirrol] -4' - carbonitrila **(AMTAC-13)**; 1'- ((3-etoxi-4-hidroxibenzilideno) amino) -5' – oxo - 1', 5', 9a, 10-tetrahidro-4aH-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila **(AMTAC-16)**.

Figura 9 - Estrutura química dos novos derivados espiro-acridínicos sintéticos



Fonte: MOURA, 2021.

Devido ao potencial terapêutico destas moléculas, e considerando a necessidade emergente na busca de novos candidatos à antineoplásicos, este trabalho se propôs a investigar a atividade antitumoral de novos compostos espiro-acridínicos, bem como avaliar os mecanismos de ação e toxicidade da molécula mais promissora.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a atividade antitumoral e a toxicidade do novo composto espiro-acridínico sintético (E)-1'-(4-clorobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-06), por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo*.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar triagem farmacológica para investigar a citotoxicidade dos novos compostos espiro-acridínicos sintéticos, em células tumorais humanas e não tumorais;
- Selecionar o composto espiro-acridínico mais promissor e a linhagem tumoral mais sensível ao tratamento *in vitro*;
- Investigar os efeitos *in vitro* do AMTAC-06 na regulação do ciclo celular, na indução de morte celular (apoptose ou necrose) e na produção de espécies reativas de oxigênio, em células tumorais HCT-116;
- Avaliar a toxicidade não clínica aguda do AMTAC-06 em embriões/larvas de peixe-zebra (*Danio rerio*) e em camundongos;
- Analisar a genotoxicidade do AMTAC-06 em sangue periférico de camundongos;
- Estudar o potencial antitumoral *in vivo* do AMTAC-06 em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich e investigar seus efeitos na regulação do ciclo celular, na angiogênese tumoral, no perfil de citocinas do microambiente tumoral e na produção de espécies reativas de oxigênio;

- Caracterizar o perfil de toxicidade do AMTAC-06 em camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich, após tratamento antitumoral.

Material e métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Locais da Pesquisa

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de Oncofarmacologia (OncoFar), no biotério Prof. Thomas George, ambos situados no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM), onde funciona o Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, vinculado ao Centro de Ciências da Saúde (PPgPNSB/CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Os ensaios de toxicidade aguda com peixe-zebra foram executados no Laboratório de Avaliação de Risco de Novas Tecnologias (LabRisco), localizado na mesma instituição, no Departamento de Biologia Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN), em colaboração com o Prof. Dr. Davi Felipe Farias.

4.2 Material

4.2.1 Amostras teste

As amostras teste utilizadas neste estudo (Figura 9) foram compostos espiro-acridínicos (AMTAC: 06, 09, 10, 11, 13 e 16) fornecidos pelo professor Dr. Ricardo Olimpio de Moura, coordenador do Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM), da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). As amostras foram sintetizadas de acordo com metodologias previamente descritas (GOUVEIA et al., 2018).

Para realização dos ensaios *in vitro* e com o peixe-zebra, os compostos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) puro e estéril, posteriormente diluídos no meio de cultura específico em cada caso, não ultrapassando a concentração final de 0,5% de DMSO. Para os ensaios *in vivo* com camundongos, as amostras foram dissolvidas em 12% (v/v) de Tween 80 em solução salina.

4.2.2 Linhagens celulares e cultivo

Para os ensaios de atividade antitumoral *in vitro* foram utilizadas diversas linhagens celulares tumorais (HCT-116, HL-60, HeLa, SK-MEL-28, MCF-7, MDA-MB-231, PC-3) e não tumorais (HaCaT e L929) (Quadro 2).

Quadro 2 - Linhagens de células tumorais e não tumorais utilizadas no estudo

Linhagens	Tipo histológico	Origem	Meio de cultura
HCT-116	Carcinoma colorretal	Humana	RPMI
HL-60	Leucemia promielocítica aguda	Humana	RPMI
HeLa	Adenocarcinoma de colo do útero	Humana	DMEM
SK-MEL-28	Melanoma	Humana	DMEM
MCF-7	Adenocarcinoma de mama	Humana	RPMI
MDA-MB-231	Adenocarcinoma de mama	Humana	DMEM
PC-3	Carcinoma de próstata	Humana	F-12K
HaCaT	Queratinócito (não tumoral)	Humana	DMEM
L929	Fibroblasto (não tumoral)	Murina	RPMI

Fonte: DUARTE, 2021.

As células de carcinoma colorretal (HCT-116) e leucemia promielocítica aguda (HL-60) foram fornecidas pelo Dr. Manoel de Moraes (Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil). HeLa, PC-3 e SK-MEL-28 foram adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brasil), enquanto as linhagens de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) foram fornecidas pela Dra. Danielly C. Ferraz da Costa (Universidade Estadual do Rio de Janeiro, RJ, Brasil). As células não tumorais L929 e HaCaT foram fornecidas pelo Dr. João Ernesto de Carvalho (Universidade de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil) e Dra. Jaciana Aguiar (Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil), respectivamente.

As linhagens celulares foram cultivadas (5×10^4 células/mL) em frascos de cultivo utilizando os meios F-12K (Banco de Células do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil), *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI-1640) e

Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), suplementadas com 10% de soro bovino fetal (SBF) inativado (GIBCO, Grand Island, NY, EUA), e 1% de solução de antibióticos (penicilina 10.000 U/mL e estreptomicina 10 mg/mL) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As células foram manipuladas em fluxo laminar, para garantir que não houvessem 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 (geralmente após 48 horas de cultivo) foi adicionado 2 mL de uma solução de tripsina-EDTA 0,25% (GIBCO, Grand Island, NY, EUA), por 5-10 minutos, para o descolamento da monocamada das células aderentes da parede do frasco. Posteriormente, a ação da tripsina foi bloqueada adicionando-se meio suplementado com 10% de SBF, na mesma proporção. As células foram centrifugadas a 500 x g por 5 minutos e ressuspensas em meio suplementado para a contagem em câmera de Neubauer. A viabilidade celular foi avaliada por meio da utilização do corante azul de Tripan (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

Para manter o estoque de células, foi realizada a criopreservação de parte da cultura. Após a estimativa da viabilidade celular, as células eram congeladas caso apresentassem uma viabilidade igual ou superior a 90%, sendo utilizadas para este procedimento preferencialmente culturas mantidas até a quinta passagem. Resumidamente, foi transferido 950 µL da suspensão celular (em meio contendo 10% de SBF) para tubos criogênicos e adicionado 5% de dimetilsufóxido ou DMSO (50 µL) por gotejamento, utilizado como criopreservante. As amostras foram homogeneizadas, levadas para o congelador (-20°C) por 20-30 minutos e posteriormente transferidas para o freezer -80°C. Finalmente, após 24 horas os criotubos eram estocados em tambor de nitrogênio líquido (-196°C).

Os ensaios de atividade antitumoral *in vivo* foram executados com a linhagem murina de Carcinoma de Ehrlich (forma ascítica), cedida pelo Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho, pertencente à Divisão de Farmacologia e Toxicologia, CPQBA, UNICAMP (Paulínia, SP, Brasil). As células foram mantidas nas cavidades peritoneais de camundongos Swiss (*Mus musculus*) na Unidade de Produção Animal (UPA/IPeFarM/UFPB), por meio de repiques semanais nos quais uma alíquota de células (500 µL, 2x10⁶ células/mL) era

transferida por meio de injeções intraperitoneais de um animal para outro, a cada 5 dias.

4.2.3 Obtenção das células mononucleares do 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 sadios. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde, CAAE: 22986519.0.0000.5188, parecer nº 3.935.975 (Anexo A).

As PBMCs são células sanguíneas do sistema imunológico caracterizadas por possuirem um núcleo redondo e, incluem linfócitos (70-90%, entre os quais células T, células B e células NK), monócitos (10-30%) e mais raramente células dendríticas (1-2%) (MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ; TAVÁREZ; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, 2019). Por representarem um alvo importante da toxicidade induzida pelos quimioterápicos, constituem uma população celular amplamente investigada em estudos que monitoram a citotoxicidade de novos compostos com potencial antitumoral (GAJEK et al., 2020; LISBOA et al., 2019; SILVEIRA, 2014; YUAN et al., 2016), sendo facilmente extraídas do sangue total e separadas de outros constituintes celulares principalmente por meio de técnicas de centrifugação em gradiente de densidade (HAMOT et al., 2015; HIGDON et al., 2016).

Para a obtenção destas células, alíquotas de 20 mL de sangue humano contendo o anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) foram homogeneizadas com 20 mL de PBS (tampão fosfato salino), em tubos estéreis. Posteriormente, a mistura obtida foi adicionada em tubos contendo o Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), uma solução estéril específica utilizada na separação do sangue por gradientes de densidade, que permite o isolamento das células mononucleares.

As amostras foram submetidas à centrifugação (400 x g, 20°C, 30 minutos). Em seguida, o plasma foi descartado, o anel contendo as células mononucleares foi cuidadosamente retirado com o auxílio de uma pipeta *pasteur* estéril e, transferido para um novo tubo do tipo falcon, realizando-se

duas centrifugações consecutivas (400 x g, 20°C, por 10 minutos) para lavagem das células com PBS (5-10 mL). Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi homogeneizado com meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal. A viabilidade celular foi avaliada e os experimentos realizados quando a viabilidade foi igual ou superior a 90%. Para isto, as células foram distribuídas em placas de 96 poços (1×10^6 células/mL) e a proliferação estimulada com 2% de fitohemaglutinina (eBioscience, Thermo Fisher, Rochester, NY), por 24 horas antes do tratamento com as amostras teste.

4.2.4 Embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*)

Os embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*) foram fornecidos pela Unidade de Produção de Organismos Não Convencionais (UniPOM), do Departamento de Biologia Molecular (DBM/CCEN/UFPB). Os embriões foram acondicionados no Laboratório de Avaliação de Risco de Novas Tecnologias (LabRisco/CCEN/UFPB), que compartilha estrutura experimental com a UniPOM, de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) até o momento dos experimentos.

Peixes adultos de uma linhagem do tipo selvagem foram mantidos a 26 ± 1 °C, sob um fotoperíodo 14:10 h (claro:escuro). A qualidade da água foi mantida por filtração com carvão ativado, condutividade a 750 ± 50 µS e oxigênio dissolvido acima de 95% de saturação. Os peixes foram alimentados diariamente com ração comercial (Tropical Gran Discus, Sarandi, Brasil) e náuplios de *Artemia* sp.

Para obter os embriões, uma armadilha de ovos foi colocada durante a noite em um tanque contendo espécimes masculinos e femininos (proporção de 1:1), no dia anterior ao teste. Uma hora após o início do ciclo de luz, os ovos foram coletados com auxílio de uma pipeta de pasteur e lavados com meio E3 (NaCl 5 mM, KCl 0,17 mM, CaCl₂ 0,33 mM e MgSO₄ 0,33 mM) para seleção subsequente de embriões usando um estereomicroscópio (50x ampliação). Ovos fertilizados viáveis foram selecionados para uso no Teste de Toxicidade Aguda em Embriões de Peixes (FET, do inglês *Fish Embryo Acute Toxicity Test*).

As larvas utilizadas nos experimentos (ou excedentes) foram acondicionadas com um pequeno volume de água, congeladas em freezer -20 °C de acordo com o item 8.14.13 da diretriz da prática de eutanásia do CONCEA. As larvas congeladas foram conduzidas para incineração pela empresa que possui convênio para descarte de resíduos químicos e biológicos da UFPB. Todos os procedimentos experimentais foram previamente analisados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal da Paraíba, certificado pelo número 5900310718/2018 (Anexo B).

4.2.5 Camundongos e condições experimentais

Para os testes experimentais *in vivo* conduzidos com o modelo de Carcinoma Ascítico de Ehrlich, foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), fêmeas, pesando entre 28 a 32 g, provenientes da Unidade de Produção Animal (UPA) do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM/UFPB). Os animais foram agrupados em gaiolas de polietileno, mantidos em condições de temperatura controlada (21 ± 1 °C), com livre acesso à ração (*pellets* de ração da marca Purina®) e água potável, disponível em garrafas graduadas de polietileno, colocadas nas grades metálicas das gaiolas em sua parte superior.

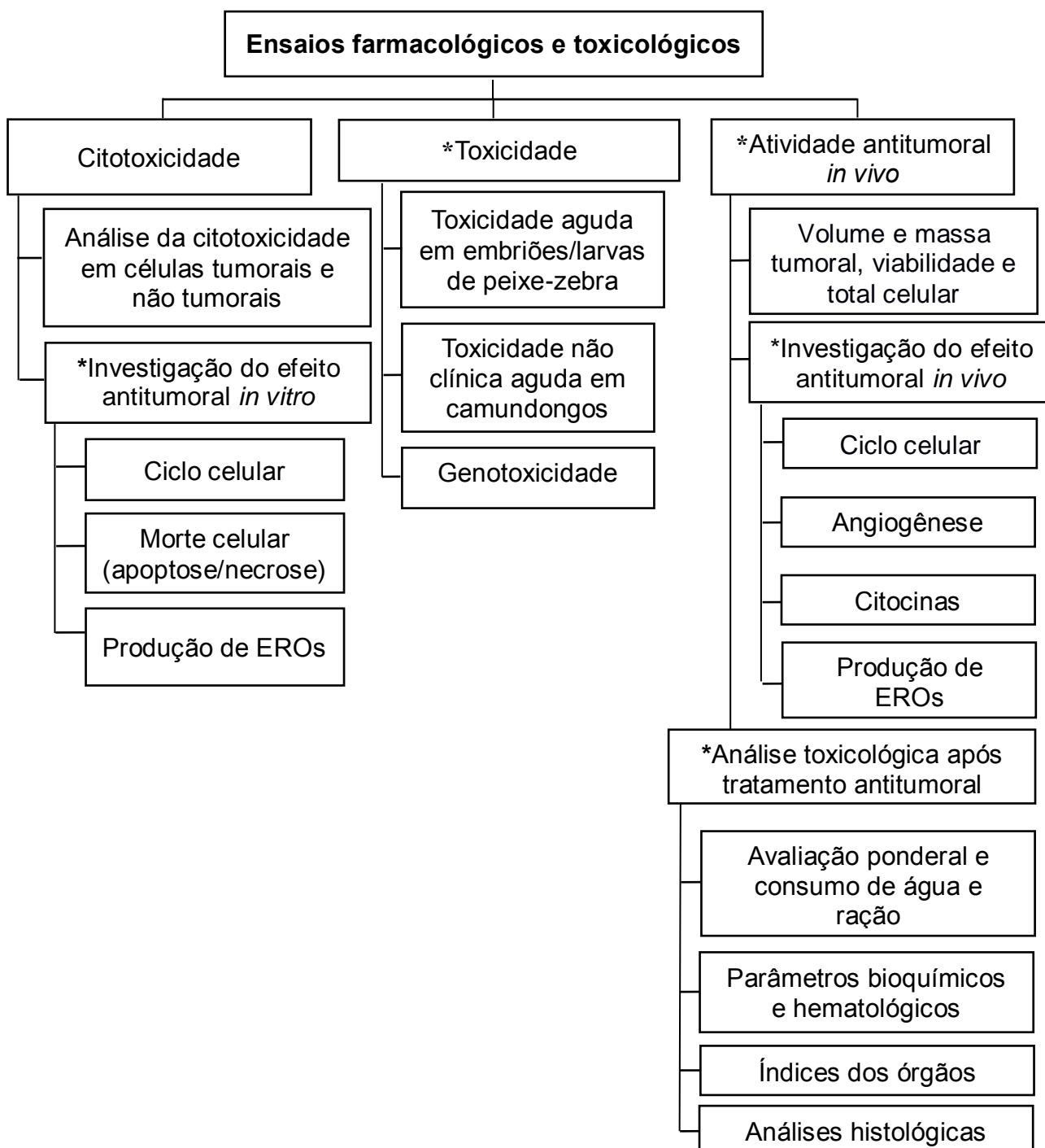
Todos os animais foram mantidos em um ciclo claro-escuro de 12:12 h e durante as manipulações experimentais todos os cuidados necessários foram considerados no sentido de diminuir a dor e o sofrimento dos mesmos. Antes da realização de qualquer protocolo experimental, os animais foram colocados no ambiente de trabalho por pelo menos 30 minutos de antecedência à execução do experimento.

Após todos os ensaios *in vivo*, os animais foram anestesiados com uma solução de xilazina (16 mg/kg – i.p., intraperitoneal) e cetamina (100 mg/kg – i.m., intramuscular) e, em seguida, eutanasiados por deslocamento cervical. Todos os procedimentos foram previamente analisados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal da Paraíba, certificado pelo número 9129090919 (ID 000786) (Anexo C).

4.3 Métodos

Os experimentos propostos seguiram o esquema representativo abaixo (Fluxograma 1).

Fluxograma 1 - Representação esquemática dos métodos utilizados no estudo da toxicidade e atividade antitumoral dos novos compostos espiro-acridínicos.
 *Ensaios realizados com o composto que apresentou melhor atividade antitumoral *in vitro*.



4.3.1 Estudos *in vitro*

4.3.1.1 Avaliação da citotoxicidade em células tumorais e não tumorais

A avaliação da atividade antitumoral *in vitro* foi realizada por meio do ensaio de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), 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 espectrofotometricamente e sua intensidade colorimétrica é diretamente proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983).

As células (100 µL) foram distribuídas em placas de 96 poços nas concentrações de 3×10^5 células/mL (culturas aderentes: HCT-116, HeLa, MCF-7, PC-3, MDA-MB-231, SK-MEL-28, L929 e HaCat), 5×10^5 células/mL (cultura em suspensão: HL-60) e 1×10^6 células/mL (PBMCs). No momento de plaqueamento das células (culturas em suspensão) ou após 24 horas desta etapa (culturas aderentes), as amostras teste (AMTAC: 06, 09, 10, 11, 13 e 16) foram dissolvidas em DMSO (obtenção de um estoque a 20 mM) e incubadas (100 µL) com a suspensão celular na concentração de 50 µM (para triagem farmacológica preliminar) ou em diferentes concentrações (3,12 – 200 µM), por 24, 48 e/ou 72 horas, conforme o caso, em estufa a 5% de CO₂, a 37 °C. Em todos os ensaios a concentração final de DMSO não foi superior a 0,5%.

A doxorrubicina foi utilizada como droga padrão, e testada em concentrações variando entre 0,31 e 20 µM. Prosseguindo os períodos de incubação, as placas foram centrifugadas (500 x g, 5 minutos, 25°C), o sobrenadante parcialmente removido (110 µL) e a solução de MTT (10 µL) foi adicionada (5 mg/mL em PBS) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As placas foram incubadas com o MTT por 3 horas, em seguida foi adicionado 100 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% e, os cristais de formazan produzidos

foram dissolvidos em um agitador de placas, *overnight*. A absorbância foi mensurada em um espectrofômetro (leitor de microplacas BioTekInstruments, Sinergy HT, Winooski, VT, EUA), no comprimento de onda de 570 nm.

Neste ensaio, inicialmente as células foram expostas a uma concentração limiar fixa de 50 μ M dos novos compostos espiro-acridínicos e incubadas por 72 horas. Esta triagem preliminar foi realizada para inferir quais amostras apresentariam melhor atividade antitumoral. Em seguida, o composto com melhor atividade antitumoral (AMTAC-06) e a linhagem tumoral mais sensível (HCT-116) ao tratamento, foram selecionados para a determinação da IC_{50} (concentração que produz 50% de inibição no crescimento celular) em diferentes tempos (24, 48 e 72 horas). Para a determinação da IC_{50} foram testadas diferentes concentrações do AMTAC-06 (3,12–200 μ M), em quadruplicata, sendo realizado o ensaio de MTT conforme metodologia descrita anteriormente.

O índice de seletividade foi estimado e obtido a partir da razão entre a IC_{50} da célula não tumoral pela IC_{50} da célula tumoral (DE LIMA SERAFIM et al., 2018; PILON et al., 2020).

4.3.1.2 Investigação do efeito antitumoral *in vitro*

4.3.1.2.1 Avaliação do ciclo celular

As células HCT-116 foram incubadas (2×10^5 células em 1 mL) em placas de 24 poços com o composto AMTAC-06 nas concentrações de 15 e 30 μ M (correspondente aos valores da IC_{50} e o dobro), por 48 horas. A doxorrubicina (2,5 μ M) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi utilizada como droga padrão. Após o tratamento, as células foram removidas das placas usando uma solução de tripsina/EDTA, coletadas por centrifugação (500 \times g, 5 minutos, 20°C) e ressuspensas em 1 mL de PBS. As amostras foram fixadas cuidadosamente em 4 mL de etanol 70% gelado, em vórtex, e congeladas (-20°C) até a análise. No momento da análise, as células fixadas foram recuperadas por centrifugação (400 \times g, 10 minutos, 4°C), realizando-se sucessivas lavagens com PBS em temperatura ambiente. Por fim, a suspensão celular (300 μ L) foi incubada (protegido da luz, a 37°C, por 30 minutos) com 3

μL de RNase (0,1 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), para eliminar traços de RNA, e 15 μL de iodeto de propídeo (IP; 0,05 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), para corar o DNA (SILVA et al., 2019).

As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FacsCanto II (BD FACSCantoTM II, Woburn, MA, EUA), adquirindo-se 10.000 eventos/amostra. O experimento foi realizado em triplicata e os dados foram analisados com o programa Flowing Software 2.5.1.

A proporção de células nas diferentes fases do ciclo celular (G1, S, G2, M), bem como células subdiploides (fração sub-G1) foi estimada, considerando que o marcador iodeto de propídeo se intercala ao DNA e, portanto, a intensidade de fluorescência do IP detectada pode ser relacionada com o conteúdo de DNA das células em cada fase do ciclo (JAYAT; RATINAUD, 1993). A fluorescência do IP aumenta de maneira proporcional à quantidade de DNA em cada fase, assim: I) células que não estão em divisão são encontradas na fase G0/G1 (Ploidia: 2n, diploide); II) células que iniciam o processo de duplicação do seu material genético estão na fase S (Ploidia: >2n); III) células com o DNA totalmente duplicado estão na fase G2/M (Ploidia: 4n). Além disso, ainda pode ocorrer a formação de uma população com quantidade de DNA inferior à G1 (<2n), chamado de sub-G1 (DARZYNKIEWICZ; BEDNER; SMOLEWSKI, 2001; PÁRAL et al., 2018).

4.3.1.2.2 Avaliação do mecanismo de morte celular

O tipo de morte celular (apoptose/necrose) induzido pelo AMTAC-06 foi investigado através de duas metodologias distintas e complementares: (1) Análise morfológica preliminar por microscopia confocal, utilizando os marcadores laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP); (2) Análise quantitativa por citometria de fluxo, utilizando a dupla marcação com Anexina V-FITC e iodeto de propídeo (IP).

4.3.1.2.2.1 Análise morfológica por microscopia confocal

As células HCT-116 foram incubadas (5×10^5 células em 1 mL) em placas de 24 poços com o AMTAC-06 na concentração de 15 μM (correspondente a

IC_{50}), por 48 horas. A doxorrubicina (2,5 μ M) foi utilizada como droga padrão. Após o tratamento, as células foram removidas das placas usando uma solução de tripsina/EDTA, coletadas por centrifugação (500 x g, 5 minutos, 20°C), ressuspensas em PBS e, por fim marcadas com 10 μ L de laranja de acridina (10 μ g/mL) e de iodeto de propídeo (10 μ g/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As células coradas foram observadas sob microscópio confocal de varredura a laser (Leica, Alemanha) para identificar as alterações morfológicas específicas de cada tipo de morte celular.

A laranja de acridina é um corante capaz de atravessar membranas intactas e se intercalar no DNA, emitindo uma fluorescência verde, permitindo diferenciar células viáveis ou em apoptose inicial. Em contrapartida, o IP atravessa membranas em que há perda da integridade celular, se intercalando no DNA e emitindo uma fluorescência vermelha que identifica células em apoptose tardia ou necrose (BESERRA SANTOS et al., 2020). Partindo deste pressuposto, neste estudo as células foram identificadas de acordo com os seguintes critérios: (a) células viáveis apresentam núcleo verde claro e estrutura intacta; (b) células apoptóticas iniciais exibem um núcleo verde brilhante, mostrando condensação da cromatina; (c) células apoptóticas tardias mostram áreas alaranjadas densas (verde/vermelho) de condensação da cromatina e *blebs* de membrana; (d) células mortas/necróticas possuem núcleo vermelho (RENOVIZÉ et al., 1998; TAN; NORHAIZAN, 2019).

4.3.1.2.2.2 Dupla marcação com Anexina V-FITC e iodeto de propídeo:

As células HCT-116 foram incubadas (2×10^5 células em 1 mL) em placas de 24 poços com o AMTAC-06 nas concentrações de 15 e 30 μ M, por 48 horas. A doxorrubicina (2,5 μ M) foi utilizada como droga padrão. Após o tratamento, as células foram removidas das placas usando uma solução de tripsina/EDTA, coletadas por centrifugação (500 x g, 5 minutos, 20 °C), lavadas em PBS, ressuspensas em um tampão de ligação (195 μ L) e, 5 μ L da Anexina V conjugada com fluoresceína (FITC) foi então adicionada, conforme instruções do fabricante (eBioscience, Thermo Fisher, Rochester, NY). As células foram incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos, lavadas e ressuspensas

novamente no tampão de ligação (190 µL). Em seguida, 10 µL do iodeto de propídeo (IP) (20 µg/mL) foi adicionado.

As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FacsCanto II (BD FACSCantoTM II, Woburn, MA, EUA), adquirindo-se 10.000 eventos/amostra. O experimento foi realizado em triplicata e os dados foram analisados com o programa Flowing Software 2.5.1.

A anexina V é uma proteína que se liga à fosfatidilserina, um fosfolipídeo que é translocado para a membrana extracelular durante a etapa inicial de ativação da apoptose. O IP, por outro lado, interage diretamente com o DNA de células que perderam a integridade da membrana, permitindo distinguir células em apoptose tardia ou necrose (RICCARDI; NICOLETTI, 2006; TAN; NORHAIZAN, 2019).

4.3.1.2.3 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs):

A produção de espécies reativas de oxigênio foi avaliada utilizando o fluoróforo 2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H_2DCFDA). 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 na presença de espécies reativas de oxigênio, sendo convertida em DCF (2',7'-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 (FERREIRA et al., 2020; SANTOS et al., 2018).

As células HCT-116 foram incubadas (2×10^5 células em 1 mL) em placas de 24 poços com o AMTAC-06 nas concentrações de 15 e 30 µM, por 48 horas. Após o tratamento, as células foram removidas das placas usando uma solução de tripsina/EDTA, coletadas por centrifugação (500 x g, 5 minutos, 20 °C) e ressuspensas em 1 mL de PBS. Em seguida, as células (300 µL) foram marcadas com 6 µL de H_2DCFDA (10 µM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) 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 e, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FacsCanto II (BD FACSCantoTM II, Woburn, MA, EUA), adquirindo-se 10.000 eventos/amostra. A quantificação das EROs foi estimada pela média da intensidade de fluorescência (M.I.F.) do DCF. O experimento foi realizado em triplicata e os dados foram analisados com o programa Flowing Software 2.5.1.

4.3.2 Estudos *in vivo*

4.3.2.1 Ensaios toxicológicos

4.3.2.1.1 Avaliação da toxicidade aguda em embriões e larvas de peixe-zebra (*Danio rerio*)

O teste de toxicidade aguda em embriões de peixes (FET) foi realizado com o AMTAC-06, de acordo com o protocolo nº 236 da OECD (OECD, 2013), com pequenas modificações. Embriões de peixe-zebra com até 3 hpf (horas após a fertilização) foram expostos a diferentes concentrações do AMTAC-06: 7,88; 15,77; 31,55; 63,1 e 126,2 μ M. A concentração máxima utilizada neste estudo foi adotada como um teste limite, pois é aproximadamente 10 vezes superior a Cl_{50} da linhagem tumoral humana com melhor resultado (HCT-116), obtido no ensaio do MTT.

Para cada concentração testada foi preparada uma placa de 96 poços contendo 20 ovos fertilizados (1 embrião por poço) expostos à amostra teste (AMTAC-06) e 4 embriões expostos apenas ao meio E3 (controles internos). Placas adicionais contendo embriões expostos ao meio E3 (controle negativo) e solvente (DMSO 0,5%) também foram analisadas ($n = 20$ embriões por grupo). Diariamente e até 96 horas após a exposição à substância teste, foram verificados os seguintes pontos de letalidade: (i) coagulação do ovo; (ii) ausência de formação do somito; (iii) não deslocamento da base da cauda; e (iv) falta de batimentos cardíacos. Na presença de qualquer um desses pontos

de letalidade o embrião/larva foi considerado morto (FERREIRA et al., 2020; DUARTE et al., 2020).

A exposição foi realizada em condição estática (i.e. sem renovação da substância teste ou de meio E3). As observações foram feitas utilizando um estereomicroscópio (Televal 31, Zeiss®), em um aumento de 50x, e fotografadas. O número de mortes foi utilizado para calcular a CL₅₀ (concentração letal média), que corresponde à concentração da substância em estudo que é letal para 50% dos indivíduos dentro do período de teste (LISBOA et al., 2019). Ao final do experimento, as larvas sobreviventes foram congeladas e conduzidas para incineração.

4.3.2.1.2 Avaliação da toxicidade não clínica aguda em camundongos

A avaliação da toxicidade não clínica aguda foi realizada com base nas diretrizes do “*Guideline for Testing of Chemicals*” nº 423/2001 da Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD), com algumas modificações (OECD, 2001) (Anexo D). Os camundongos foram divididos em grupos (n = 3 fêmeas/ grupo). Ao grupo controle foi administrado apenas o veículo sozinho (solução a 12% (v/v) de Tween 80 em solução salina), enquanto o grupo tratado recebeu uma dose única de AMTAC-06 (2000 mg/kg), por via intraperitoneal (i.p.).

Com o objetivo de identificar alterações comportamentais nos camundongos, sugestivas de toxicidade e atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) ou Sistema Nervoso Autônomo (SNA), após administração da substância foram realizadas observações cuidadosas nos intervalos de 0, 15, 30 e 60 min, após 4 horas e diariamente por 14 dias, utilizando o protocolo experimental descrito por Almeida e colaboradores (1999) (Anexo E) (DE ALMEIDA et al., 1999). A dose responsável pela morte de 50% dos animais experimentais (DL₅₀) foi estimada (MANGUEIRA et al., 2017).

4.3.2.1.3 Avaliação da genotoxicidade

Para avaliar a genotoxicidade, foi realizado o ensaio do micronúcleo, de acordo com as diretrizes do “*Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test*”, nº 474 da OECD (OECD, 1997). Para isto, três grupos de camundongos Swiss fêmeas ($n = 6$ animais/grupo) foram tratados por via intraperitoneal (i.p.): no primeiro grupo, os animais foram tratados com o AMTAC-06 (dose única de 2.000 mg/kg); o segundo grupo (controle positivo) recebeu a droga padrão ciclofosfamida (50 mg/kg); e no terceiro grupo (controle negativo), os animais foram injetados apenas com o veículo (Tween 80 a 12% em solução salina).

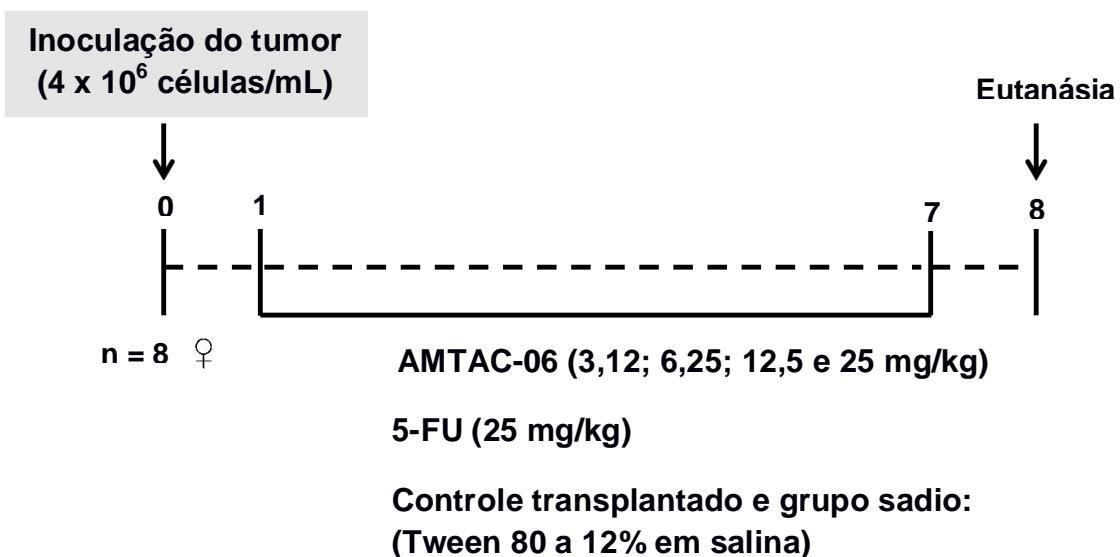
Após 48 horas, os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg i.m.) e cloridrato de xilazina (16 mg/kg i.p.) e amostras de sangue foram coletadas pelo plexo orbital com o auxílio de uma agulha heparinizada para confecção das extensões sanguíneas. Após secarem, as lâminas foram coradas com coloração panótica (Newprov, Paraná, Brasil) para posterior análise em microscópio óptico. Três esfregaços sanguíneos foram preparados para cada animal e, um mínimo de 2.000 eritrócitos contados para estimativa da frequência de eritrócitos micronucleados (FERREIRA et al., 2020).

4.3.2.2 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich (CAE)

Células de carcinoma ascítico de Ehrlich (CAE) com cinco dias de crescimento foram aspiradas da cavidade peritoneal de camundongos e implantadas por via intraperitoneal (0,5 mL – 4×10^6 células/mL) nos animais experimentais (DOLAI et al., 2012). Vinte e quatro horas após o implante, o AMTAC-06 foi solubilizado em Tween 80 (12%), os camundongos foram divididos em grupos ($n = 8$ fêmeas/ grupo) e tratados diariamente (via i.p.), por sete dias consecutivos: apenas com o veículo, Tween 80 a 12% em solução salina (grupo controle transplantado com o tumor); com a droga padrão 5-Fluorouracil (5-FU; 25 mg/kg) e com a amostra teste AMTAC-06 (3,12; 6,25; 12,5 e 25 mg/kg) (SANTOS et al., 2018) (Esquema 1). As doses do composto teste foram selecionadas a partir de uma triagem farmacológica realizada inicialmente com a dose de 25 mg/kg, e a partir dos dados obtidos as doses foram posteriormente reduzidas.

Para as análises toxicológicas realizadas neste modelo experimental foi utilizado um grupo adicional chamado de “grupo sadio”, no qual os animais não foram implantados com as células tumorais, porém foram submetidos às mesmas condições experimentais dos demais.

Esquema 1 - Tratamento dos camundongos em modelo de Carcinoma Ascítico de Ehrlich (CAE)



Fonte: DUARTE, 2021.

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

Para a avaliação do efeito antitumoral do AMTAC-06, um dia após a última administração do tratamento descrito no item 4.3.2.2 (página 100), os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100 mg/kg, i.m.) e cloridrato de xilazina (16 mg/kg, i.p.), e eutanasiados por deslocamento cervical (MOURA et al., 2018). O líquido ascítico foi coletado da cavidade peritoneal e o volume foi mensurado e expresso em mL. Uma alíquota foi retirada para a determinação da viabilidade celular pelo ensaio de exclusão do azul de tripan (MANGUEIRA et al., 2017). Para tanto, foram incubados volumes semelhantes de líquido ascítico e de uma solução de 0,4% do corante, seguido de análise das células em câmara de Neubauer. Este ensaio avalia a habilidade de

células viáveis, com membrana plasmática íntegra, excluírem o corante azul de tripan, permitindo assim, a quantificação dessas células (PICCININI et al., 2017).

A massa do tumor foi determinada pela diferença dos pesos dos camundongos antes e depois da retirada do líquido ascítico, e foi expressa em gramas (g). A quantidade total de células tumorais viáveis no peritônio dos animais foi expressa como total celular ($\times 10^7$ células), que foi obtido como o produto do volume do tumor (expresso em mL), pela viabilidade celular (expressa como a quantidade de células $\times 10^6$ /mL) (MANGUEIRA et al., 2017).

4.3.2.2.2 Investigação do efeito antitumoral *in vivo*

A dose de 12,5 mg/kg do AMTAC-06 apresentou melhor atividade antitumoral e foi selecionada para realização dos ensaios de investigação do efeito antitumoral *in vivo*. Para isto, os animais transplantados com células de CAE foram tratados por sete dias com o AMTAC-06, conforme descrito no item 4.3.2.2 (página 100). Um dia após a última administração os animais dos grupos controle transplantado, AMTAC-06 (12,5 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100 mg/kg, i.m.) e cloridrato de xilazina (16 mg/kg, i.p.) e, em seguida, eutanasiados por deslocamento cervical (MOURA et al., 2018), para investigação do efeito antitumoral *in vivo*, conforme descrito nos tópicos a seguir.

4.3.2.2.1 Análise do ciclo celular

Após a eutanásia (conforme descrito no item 4.3.2.2.2), as células do líquido ascítico (1×10^6 células) dos animais (grupos: controle; 12,5 mg/kg de AMTAC-06; 25 mg/kg de 5-FU) foram coletadas, fixadas cuidadosamente com etanol 70% gelado, em vórtex, e congeladas (-20°C) até a análise. As demais etapas foram realizadas conforme o item 4.3.1.2.1 (página 94).

4.3.2.2.2 Avaliação do efeito antiangiogênico

Após a eutanasia e retirada das células tumorais (conforme descrito no item 4.3.2.2.2) (página 102), o peritônio dos animais (grupos: controle; 12,5 mg/kg de AMTAC-06; 25 mg/kg de 5-FU) foi aberto e o revestimento interno da cavidade peritoneal foi examinado e fotografado para determinação da microdensidade vascular peritumoral. A microdensidade dos vasos foi calculada como a área ocupada pelos vasos sanguíneos, por campo, em regiões vascularizadas selecionadas, dividido pela área total, usando o programa AVSOFT® (AGRAWAL et al., 2011; FERREIRA et al., 2019).

4.3.2.2.3 Quantificação de citocinas no lavado peritoneal

A determinação dos níveis das citocinas IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-12 e TNF- α foi realizada utilizando o líquido ascítico coletado da cavidade peritoneal dos grupos controle e tratados (12,5 mg/kg de AMTAC-06 e 25 mg/kg de 5-FU), após a eutanásia. O líquido foi centrifugado (250 x g, 5 minutos, 4°C) e posteriormente o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C para dosagem das citocinas, por meio de ELISA, de acordo com o protocolo especificado no kit do fabricante (Bioscience, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA, EUA).

Brevemente, placas de 96 poços foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, anti-IFN- γ , anti-IL-1 β , anti-IL-4, anti-IL-12, e anti-TNF- α , solubilizadas em tampão fosfato e incubadas overnight, a 4°C. Após este período, as placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBST) e os sítios inespecíficos foram bloqueados com a solução de bloqueio (PBS contendo 10% de soro bovino fetal), por uma hora. Novamente, as placas foram lavadas em PBST e foram adicionadas tanto as amostras a serem analisadas, quanto diferentes concentrações das citocinas recombinantes para a obtenção da curva. As placas foram novamente incubadas overnight a 4 °C. Terminado o período de incubação, as placas foram lavadas e o complexo detector formado pelo anticorpo de detecção biotinilado foi adicionado às placas, que foram incubadas por uma hora.

Posteriormente, as placas foram novamente lavadas e então foi adicionado o complexo enzimático avidina-peroxidase (avidin-HRP). As placas foram incubadas por mais meia hora à temperatura ambiente. Após lavagens

adicionais, a reação foi revelada pela adição da solução substrato contendo tetrametilbenzidina (TMB) e, após 15 minutos, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1N. A absorbância foi medida a 450 nm em um leitor de placas ELISA (Synergy HT, BioTek®, EUA). As quantidades de citocinas foram calculadas a partir de curvas padrão e expressas em picogramas por mililitro (pg / mL) (SANTOS et al., 2018).

4.3.2.2.2.4 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Após a eutanásia dos animais (grupos: controle; 12,5 mg/kg de AMTAC-06; 25 mg/kg de 5-FU) conforme descrito no item 4.3.2.2.2 (página 102), o líquido peritoneal foi lavado com PBS e centrifugado (245 x g, 5 minutos, 4 °C). Após este processo, as células de CAE foram coletadas (2×10^6 células/mL), marcadas com DCFH-DA (10 μ M) e incubadas no escuro, durante 30 minutos, a 37°C. As demais etapas foram realizadas conforme o item 4.3.1.2.3 (página 97).

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

Para avaliar a toxicidade em células de carcinoma ascítico de Ehrlich, os animais dos grupos experimentais (controle; 12,5 mg/kg de AMTAC-06; 25 mg/kg de 5-FU) foram tratados e eutanasiados conforme descrito no item 4.3.2.2.2 (página 102). O grupo sadio (animais não transplantados com o tumor, porém submetidos às mesmas condições experimentais) foi incluído nas análises histológicas e dos parâmetros bioquímicos e hematológicos.

4.3.2.3.1 Avaliação ponderal e do consumo de água e de ração

Para a avaliação de possíveis efeitos tóxicos produzidos pelo tratamento com AMTAC-06, os animais dos grupos controle, AMTAC-06 (12,5 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg), descritos no item 4.3.2.2.2 (página 102), foram diariamente

pesados (g), do início ao final do tratamento e, avaliados em relação aos consumos de água (mL) e de ração (g).

4.3.2.3.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos

No dia seguinte á última administração (conforme descrito no item 4.3.2.2.2) (página 102), após jejum de quatro horas, os animais dos grupos controle transplantado, AMTAC-06 (12,5 mg/kg), 5-FU (25 mg/kg) e grupo sadio foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg i.m.) e cloridrato de xilazina (16 mg/kg i.p.). Posteriormente, amostras de sangue foram coletadas pelo plexo orbital com o auxílio de uma agulha heparinizada.

Para a análise dos parâmetros bioquímicos (ureia, creatinina, aspartato aminotransferase - AST e alanina aminotransferase - ALT) o sangue foi submetido à centrifugação por 10 minutos, a 3500 rpm, para obtenção do plasma. Já para as análises hematológicas foi utilizado sangue total heparinizado e realizada avaliação das séries vermelha e branca (eritrograma e leucograma).

Os parâmetros bioquímicos e hematológicos foram determinados utilizando-se kits específicos para o analisador hematológico celular automático Hematoclin 2.8 Vet (Bioclin/Midray) e BIO2000 (BIOPLUS), respectivamente. As extensões sanguíneas foram coradas com coloração panótica e analisadas em microscópio óptico, para realização da contagem diferencial de leucócitos (MOURA et al., 2016).

4.3.2.3.3 Avaliação dos índices dos órgãos

Após a coleta de sangue, conforme descrito no item 4.3.2.3.2 (página 105), os animais (grupos: controle; 12,5 mg/kg de AMTAC-06; 25 mg/kg de 5-FU) foram eutanasiados por deslocamento cervical, e os órgãos (timo, baço, fígado, rins e coração) foram removidos e pesados para o cálculo dos seus índices. O índice dos órgãos foi calculado seguindo a fórmula: Índice = peso do órgão (mg)/peso do animal (g).

4.3.2.3.4 Análises histológicas

Após a pesagem dos órgãos, descrita no item 4.3.2.3.3 (página 105), fígado e rins dos animais dos grupos controle transplantado, AMTAC-06 (12,5 mg/kg), 5-FU (25 mg/kg) e grupo sadio, foram seccionados, fixados em formalina tamponada (solução de formol a 10%). Após 24 horas foram resseccionados para processamento histológico, conforme os procedimentos descritos: desidratação com séries crescentes de álcool (70 a 100%), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina.

Com o auxílio de um micrótomo rotativo semiautomático, os fragmentos tissulares emblocados em parafina foram seccionados em espessura de 3,0 μm e subsequentemente submetidos à coloração hematoxilina/ eosina e tricrômico de Gomori. Em seguida foram examinados ao microscópio óptico (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). As análises histológicas foram realizadas com a colaboração da Profa. Dra. Karina Carla de Paula do Departamento de Morfologia, Centro de Biociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

4.4 Análise estatística

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

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Estudos *in vitro*

5.1.1 Avaliação da citotoxicidade em células tumorais e não tumorais

A citotoxicidade dos compostos espiro-acridínicos (AMTAC-06, AMTAC-09, AMTAC-10, AMTAC-11, AMTAC-13, AMTAC-16) foi inicialmente avaliada por meio de uma triagem realizada na concentração de 50 μ M em diferentes linhagens tumorais, obtendo-se os percentuais de inibição do crescimento expressos na Tabela 1.

Tabela 1 - Efeito citotóxico dos compostos espiro-acridínicos (AMTACs) no crescimento das linhagens celulares tumorais, após 72h de exposição.

Linhagem celular	IC (%)					
	06	09	10	11	13	16
HCT-116	93,8 \pm 0,7*	49,4 \pm 1,1*	62,2 \pm 0,1*	55,1 \pm 1,3*	51,8 \pm 0,9*	46,6 \pm 0,7*
HL-60	89,7 \pm 0,6*	61,1 \pm 1,5*	68,4 \pm 1,6*	68,9 \pm 0,4*	75,6 \pm 0,6*	83,2 \pm 0,6*
MCF-7	77,7 \pm 0,4*	19,0 \pm 1,2*	36,3 \pm 0,8*	19,4 \pm 0,8*	37,5 \pm 0,3*	39,3 \pm 0,7*
MDA-MB-231	71,2 \pm 0,9*	NR	NR	NR	NR	NR
SK-MEL-28	56,8 \pm 0,5*	NR	NR	NR	NR	NR
HeLa	69,6 \pm 0,2*	NR	NR	NR	NR	NR
PC-3	66,3 \pm 0,4*	NR	NR	NR	NR	NR

Fonte: DUARTE, 2021.

Legenda: A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio MTT. Dados obtidos de um experimento realizado em quadruplicata e expressos em valores de porcentagem de inibição, obtidos a partir da média \pm e.p.m., em comparação com o controle negativo. Os dados foram analisados por ANOVA seguido por Tukey. A triagem farmacológica foi realizada na concentração de 50 μ M. O controle foi considerado como 100% de viabilidade. * p < 0,05 comparado ao grupo controle. IC: Inibição do crescimento. NR: não realizado.

De forma geral, os AMTACs 10, 11, 13 e 16 exibiram percentuais de inibição semelhantes. Dentre os compostos avaliados, o AMTAC-09 foi o

menos citotóxico, evidenciado por seus menores percentuais de inibição no crescimento das linhagens tumorais avaliadas (HCT-116: $49,4 \pm 1,1\%$; HL-60: $61,1 \pm 1,5\%$; MCF-7: $19,0 \pm 1,2\%$; $p<0,05$ para todos). Em contrapartida, AMTAC-06 foi o mais citotóxico, induzindo pelo menos 50% de inibição de crescimento em todas as linhagens tumorais, com maior atividade em células de carcinoma colorretal HCT-116 ($93,8 \pm 0,74\%$; $p<0,05$), enquanto as células de melanoma (SK-MEL-28) foram menos sensíveis ($56,8 \pm 0,5\%$; $p<0,05$) ao tratamento.

Portanto, o AMTAC-06 foi o composto mais promissor desta série, sendo selecionado para dar continuidade aos ensaios de citotoxicidade, com o objetivo de calcular a Cl_{50} em HCT-116 (a linhagem tumoral mais sensível ao tratamento), em diferentes intervalos de tempo (24, 48 e 72 h) (Tabela 2).

Tabela 2 - Efeito do tratamento com AMTAC-06* e doxorrubicina (DXR**) na viabilidade de células HCT-116 e em células não tumorais (HaCaT, L929 e PBMC).

Células	Cl_{50} (μM)				IS	
	AMTAC-06 (24 h)	AMTAC-06 (48 h)	AMTAC-06 (72 h)	DXR (72 h)	AMTAC-06 (72 h)	DXR (72 h)
HCT-116	>200	$21,16 \pm 1,34$	$12,62 \pm 1,19$	$2,57 \pm 0,001$	-	-
HaCaT	NR	NR	$17,87 \pm 1,12$	$0,28 \pm 0,001$	1,41	0,10
L929	NR	NR	$26,15 \pm 1,18$	NR	2,07	ND
PBMC	NR	NR	$7,89 \pm 1,06$	$0,05 \pm 0,002$	0,62	0,01

Fonte: DUARTE, 2021.

Legenda: Dados foram obtidos a partir de três experimentos independentes realizados em quadruplicata, a partir do ensaio do MTT e, apresentados em valores de Cl_{50} (μM) obtidos por regressão não linear com intervalo de confiança de 95%. NR: Não Realizado. ND: Não Determinado. Cl_{50} : Concentração que produz 50% de inibição no crescimento celular. IS: Índice de seletividade (Cl_{50} da célula não tumoral (HaCaT, L929 ou PBMC) / Cl_{50} da célula tumoral (HCT-116)).

*AMTAC-06: (E)-1'-((4-clorobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-diidro10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

**DXR: Doxorrubicina

Ocorreram alterações na viabilidade das células HCT-116 após 24 horas de tratamento com o AMTAC-06 (3,12 - 200 μ M), todavia a Cl_{50} estimada foi superior à máxima concentração testada (200 μ M), demonstrando pouco efeito citotóxico. Em contrapartida, foi observado um aumento da citotoxicidade deste composto com o tempo, como evidenciado pelos valores da Cl_{50} após 48 ($21,16 \pm 1,34 \mu$ M) e 72 horas ($12,62 \pm 1,19 \mu$ M) de exposição (Tabela 2).

Baseado nos resultados obtidos foi avaliado a citotoxicidade do AMTAC-06 contra células não tumorais após 72 horas de tratamento. A viabilidade das PBMCs foi consideravelmente reduzida (Cl_{50} : $7,89 \pm 1,06 \mu$ M) em relação ao grupo controle (100% de viabilidade). Valores de Cl_{50} mais altos foram obtidos para as linhagens HaCaT ($17,87 \pm 1,12 \mu$ M) e L929 ($26,15 \pm 1,18 \mu$ M) (Tabela 2).

O índice de seletividade (IS) foi determinado a partir dos valores de Cl_{50} das células não tumorais e tumoral. Considerando os valores dos índices calculados para HaCaT (IS: 1,41) e PBMC (0,62), não houve seletividade (IS<2) do AMTAC-06 para a célula tumoral HCT-116. Todavia, AMTAC-06 foi mais seletivo para HCT-116 (IS>2) quando considerado a linhagem não tumoral L929 (IS: 2,07).

A droga padrão doxorrubicina apresentou alta toxicidade para HCT-116 (Cl_{50} : $2,57 \pm 0,001 \mu$ M), efeito que foi potencializado em células não tumorais, conforme observado pelos baixos valores de Cl_{50} (PBMC: $0,05 \pm 0,002 \mu$ M; HaCaT: $0,28 \pm 0,001 \mu$ M) e dos índices de seletividade (PBMC: 0,01; HaCaT: 0,10) (Tabela 2).

5.1.2 Investigação do efeito antitumoral *in vitro*

Os ensaios de investigação do efeito antitumoral *in vitro* foram realizados com 48 horas de tratamento, utilizando duas concentrações distintas do AMTAC-06, correspondentes a Cl_{50} (15 μ M) e ao dobro da Cl_{50} (30 μ M), valores estabelecidos a partir dos ensaios de MTT em 72 horas, período em que este composto induziu uma maior citotoxicidade em HCT-116.

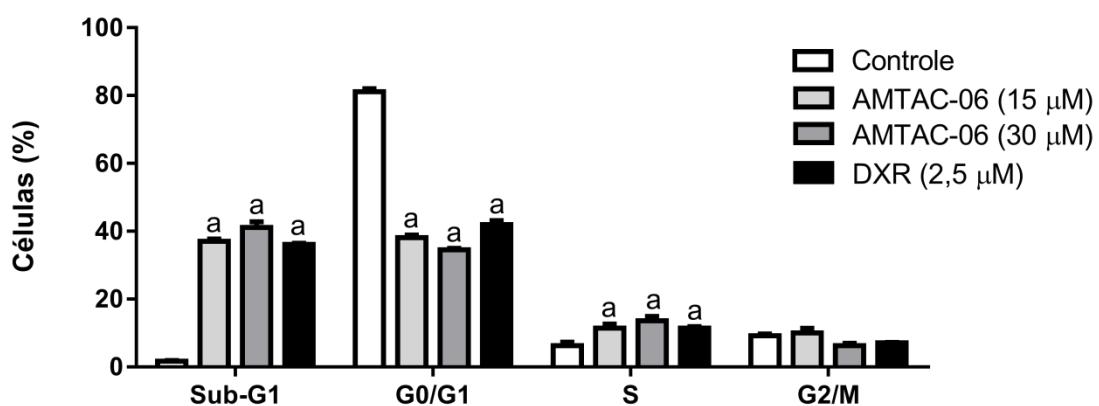
5.1.2.1 Avaliação do ciclo celular

AMTAC-06 promoveu alterações significativas na distribuição das células tumorais (HCT-116) nas diferentes fases do ciclo celular, após 48 horas de tratamento (Gráfico 1). Houve aumento de células distribuídas na fase S em ambas as concentrações avaliadas (15 μ M: $11,45 \pm 1,17\%$; 30 μ M: $13,62 \pm 1,22\%$; $p < 0,05$ para todos), com consequente diminuição no percentual de células na fase G0/G1 (15 μ M: $38,14 \pm 0,74\%$; 30 μ M: $34,57 \pm 0,36\%$; $p < 0,05$ para todos), em comparação aos seus respectivos controles (S: $6,28 \pm 1,02\%$; G0/G1: $81,16 \pm 0,89\%$). Entretanto, não ocorreram alterações significativas na fase G2/M.

Ainda, o tratamento com o AMTAC-06 aumentou significativamente o percentual de células em sub-G1, nas concentrações de 15 μ M ($37,01 \pm 0,69\%$; $p < 0,05$) e 30 μ M ($41,13 \pm 1,68\%$; $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle ($1,67 \pm 0,22\%$) (Gráfico 1).

A droga padrão doxorrubicina (2,5 μ M) também induziu aumento de células em sub-G1 ($36,16 \pm 0,17\%$; $p < 0,05$) e na fase S ($11,44 \pm 0,27\%$; $p < 0,05$), associado a uma diminuição na distribuição de células em G0/G1 ($41,95 \pm 0,66\%$; $p < 0,05$), em comparação com seus respectivos controles. Não houve alterações significativas na fase G2/M (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Efeito do tratamento (48 horas) com o AMTAC-06* (15 e 30 μ M) e a DXR** (2,5 μ M) na progressão do ciclo celular em células HCT-116



Fonte: DUARTE, 2021.

Legenda: A proporção de células (%) em cada fase do ciclo celular foi determinada. Dados são expressos como média \pm e.p.m. de um experimento independente em triplicata, analisado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

*AMTAC-06: (E)-1'-((4-clorobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-diidro10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

**DXR: Doxorrubicina

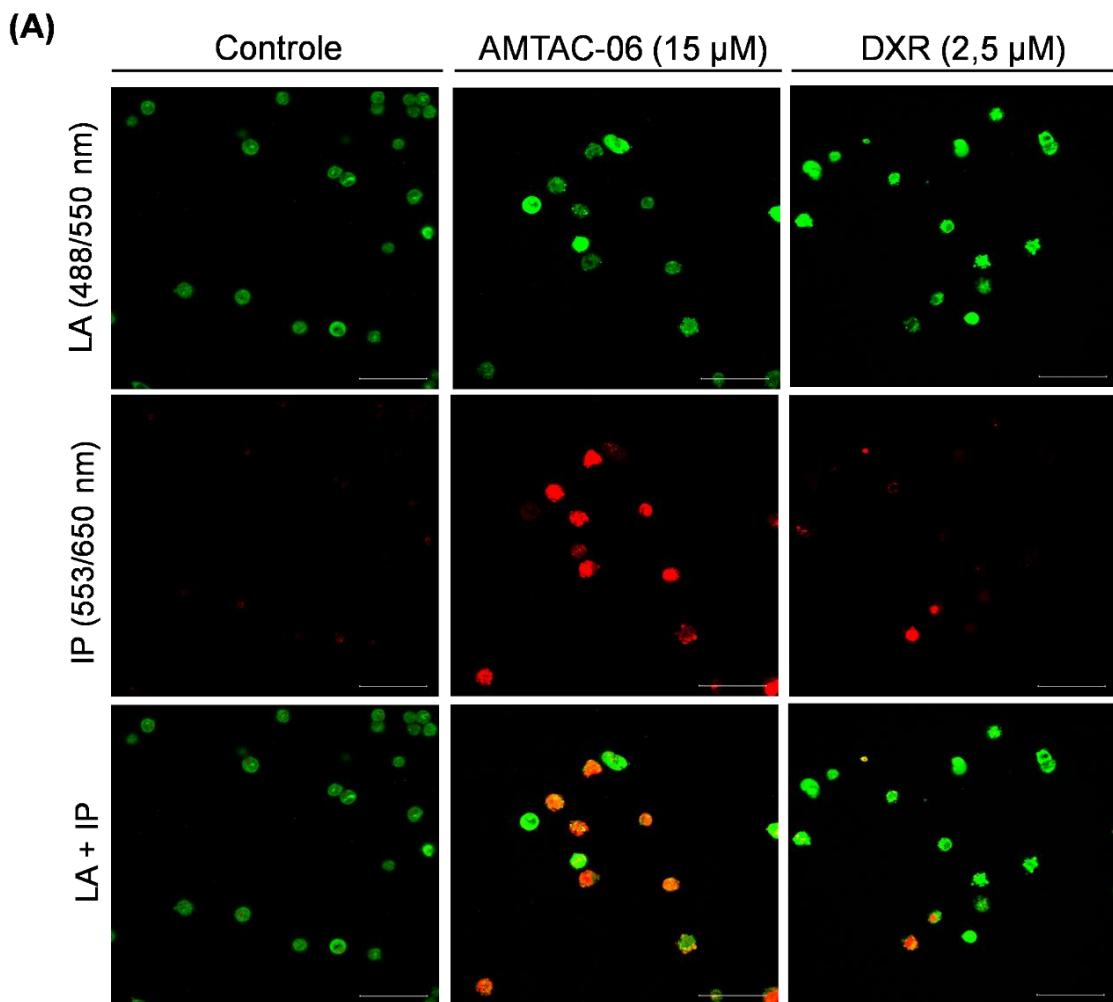
5.1.2.2 Avaliação do mecanismo de morte celular

5.1.2.2.1 Análise morfológica por microscopia confocal

A Figura 10 mostra as células HCT-116 duplamente coradas com laranja de acridina e iodeto de propídeo, analisadas por microscopia confocal. Após a exposição ao AMTAC-06 (15 μ M) e à droga padrão doxorrubicina (2,5 μ M), por 48 horas, observou-se que as células tumorais apresentavam características típicas de apoptose, evidenciadas pelas setas na figura 10B, tais como a formação de *blebs* na membrana, corpos apoptóticos, condensação da cromatina e fragmentação nuclear.

Além das características mencionadas anteriormente, as células apoptóticas também foram diferenciadas pela coloração verde-brilhante do seu núcleo. Células necróticas ou mortas (núcleo vermelho) também foram observadas após os tratamentos. Em contraste, o grupo controle (células não tratadas) apresentou uma estrutura intacta, tamanho morfológicamente homogêneo e núcleo com coloração verde-claro (Figura 10A).

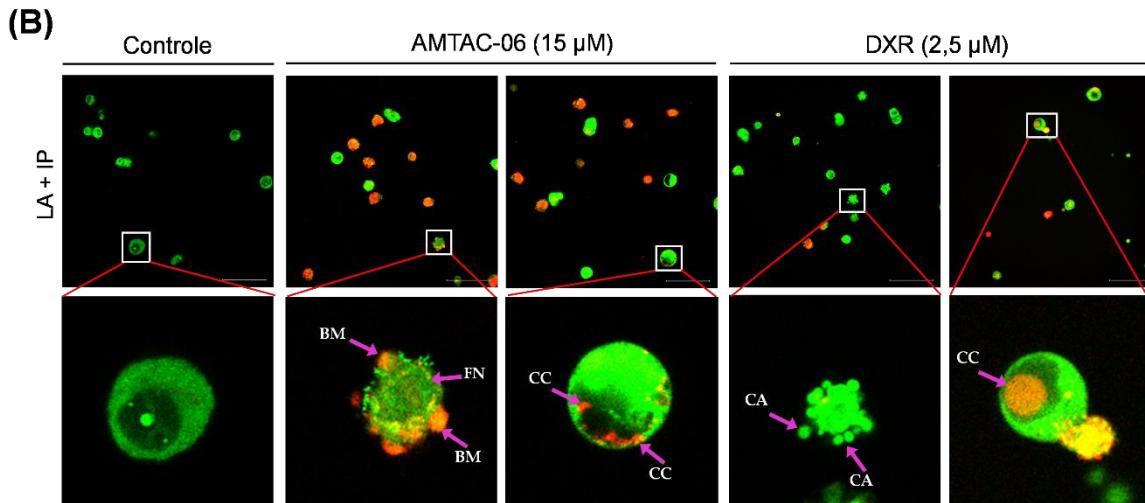
Figura 10 - Efeito do tratamento (48 horas) com AMTAC-06* (15 μ M) e DXR** (2,5 μ M) em células HCT-116 duplamente marcadas com laranja de acridina e iodeto de propídeo



Fonte: DUARTE, 2021.

Legenda: **(A)** Imagens representativas obtidas por microscopia confocal de varredura a laser, com ampliação de 400-630x (barra de escala = 50 μ m). As células foram diferenciadas com base nos seguintes critérios: células viáveis apresentam estrutura intacta e núcleo verde claro; células em apoptose inicial exibem um núcleo verde brilhante e condensação da cromatina; células em apoptose tardia mostram áreas alaranjadas densas (verde/vermelho) de condensação da cromatina e *blebs* de membrana; células necróticas/mortas apresentam um núcleo vermelho. *Nota:* LA (laranja de acridina); IP (iodeto de propídeo).

Figura 10 - Efeito do tratamento (48 horas) com AMTAC-06* (15 μ M) e DXR** (2,5 μ M) em células HCT-116 duplamente marcadas com laranja de acridina e iodeto de propídeo (continuação)



Fonte: DUARTE, 2021.

Legenda: **(B)** Visualização de características morfológicas típicas de apoptose. As setas em roxo indicam a formação de *blebs* de membrana (BM), corpos apoptóticos (CA), condensação da cromatina (CC) e fragmentação nuclear (FN). *Nota:* LA (laranja de acridina); IP (iodeto de propídeo).

*AMTAC-06: (E)-1'-(4-clorobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-diidro10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

**DXR: Doxorrubicina

5.1.2.2.2 Dupla marcação com Anexina V-FITC e iodeto de propídeo

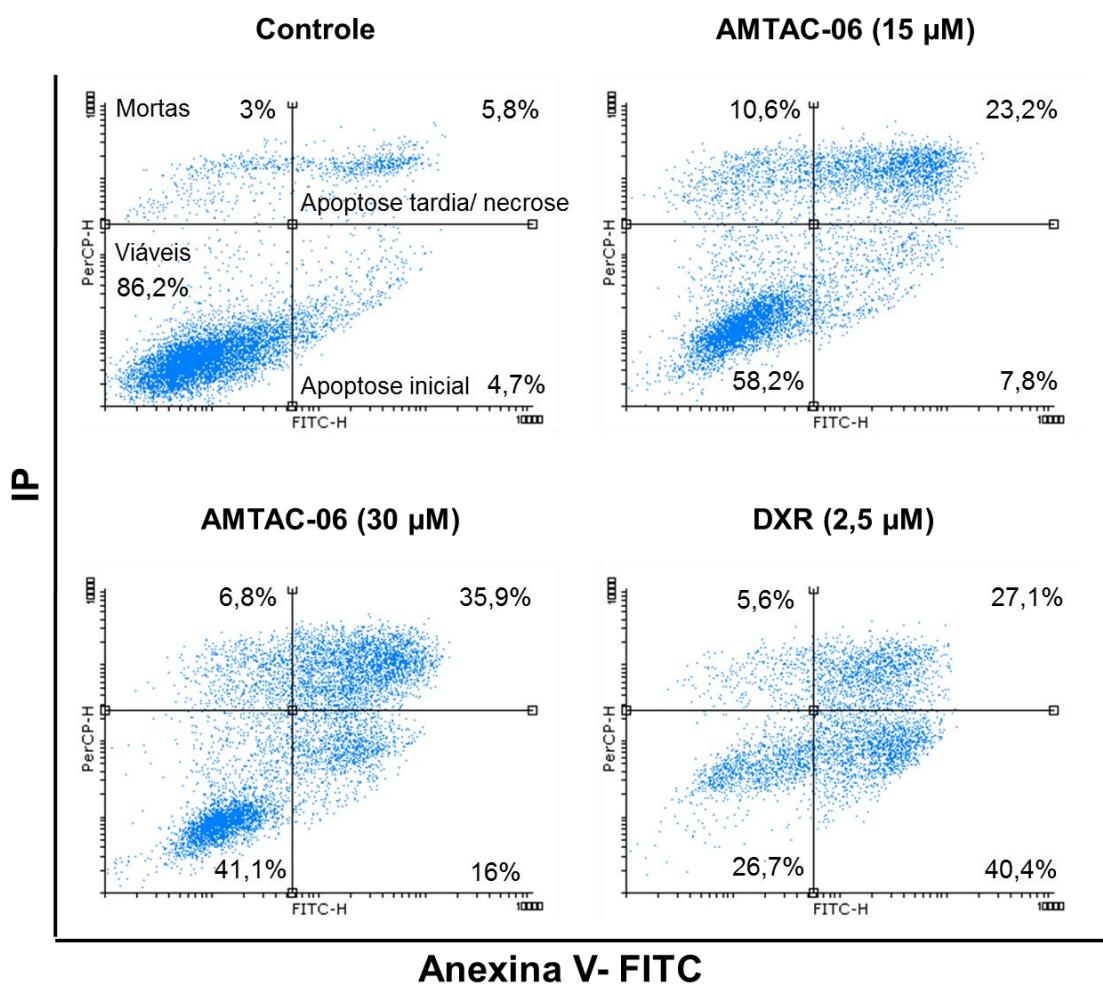
Para confirmar o indicativo de apoptose, as células HCT-116 foram duplamente marcadas com anexina V/ IP e analisadas por citometria de fluxo. Como mostrado na figura 11, a proporção de células em apoptose inicial (anexina + / IP -, quadrante inferior direito) aumentou significativamente de $4,7 \pm 0,4\%$ (controle) para $16,0 \pm 0,4\%$ após o tratamento com 30 μ M de AMTAC-06 ($p<0,05$). Este composto também induziu um aumento significativo no percentual de células em apoptose tardia/ necrose (anexina + / IP +, quadrante superior direito) nas duas concentrações (15 μ M: $23,2 \pm 1,1\%$; 30 μ M: $35,9 \pm 1,2\%$) ($p<0,05$ para ambos), quando comparado ao grupo controle ($5,8 \pm 0,4\%$).

Em conjunto, estes resultados mostram que o AMTAC-06 induziu um aumento significativo de células apoptóticas (apoptose total) nas concentrações

avaliadas (15 μ M: $31,1 \pm 1,4\%$; 30 μ M: $51,9 \pm 0,7\%$; $p < 0,05$ para ambos), em relação ao controle ($10,6 \pm 0,6\%$), com o maior efeito observado no tratamento de 30 μ M (Gráfico 2).

A droga padrão doxorrubicina também aumentou significativamente o número de células em apoptose inicial ($40,4 \pm 1,1\%$; $p < 0,05$) e tardia ($27,1 \pm 0,6\%$; $p < 0,05$), em comparação ao controle (Figura 11 e Gráfico 2).

Figura 11 - *Dotplots* representativos de células HCT-116 duplamente marcadas com Anexina V- FITC e iodeto de propídeo, após tratamento (48 horas) com AMTAC-06* (15 e 30 μ M) e DXR** (2,5 μ M)



Fonte: DUARTE, 2021.

Legenda: *Dotplots* representativos obtidos por análise de citometria de fluxo. Os *dotplots* foram divididos em quatro quadrantes que representam diferentes populações celulares: células viáveis (anexina - / IP -, quadrante inferior esquerdo), células em apoptose inicial (anexina + /

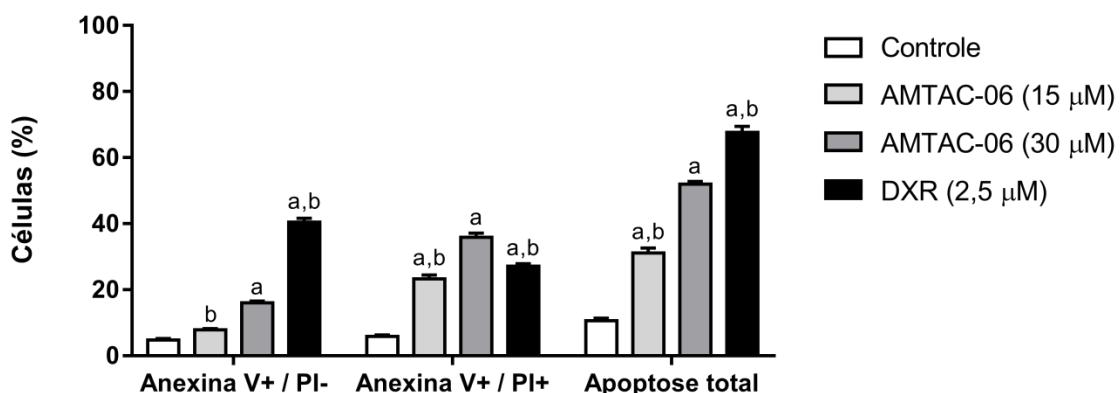
IP -, quadrante inferior direito), células em apoptose tardia/ necrose (anexina + / IP +, quadrante superior direito), células mortas (anexina - / IP +, quadrante superior esquerdo). Foram adquiridos 10.000 eventos/amostra por meio dos detectores de fluorescência vermelha (IP, 325-488 nm) e verde (FITC, 493-525 nm).

Nota: FITC (isotiocianato de fluoresceína); IP (iodeto de propídeo).

*AMTAC-06: (E)-1'-((4-clorobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-diidro10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

**DXR: Doxorrubicina

Gráfico 2 - Efeito do tratamento (48 horas) com AMTAC-06* (15 e 30 μ M) e DXR** (2,5 μ M) em células HCT-116 duplamente marcadas com Anexina V-FITC e iodeto de propídeo



Fonte: DUARTE, 2021.

Legenda: Representação gráfica dos resultados obtidos a partir dos *dotplots*. A porcentagem de células em apoptose inicial (anexina + / IP -) e tardia (anexina + / IP +), bem como os valores de apoptose total (inicial + tardia) foi evidenciada. Os dados são expressos como média \pm e.p.m. de um experimento independente em triplicata, analisado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey. ^ap <0,05 em relação ao controle; ^bp <0,05 em comparação com AMTAC-06 (30 μ M). Nota: FITC (isotiocianato de fluoresceína); IP (iodeto de propídeo).

*AMTAC-06: (E)-1'-((4-clorobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-diidro10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

**DXR: Doxorrubicina

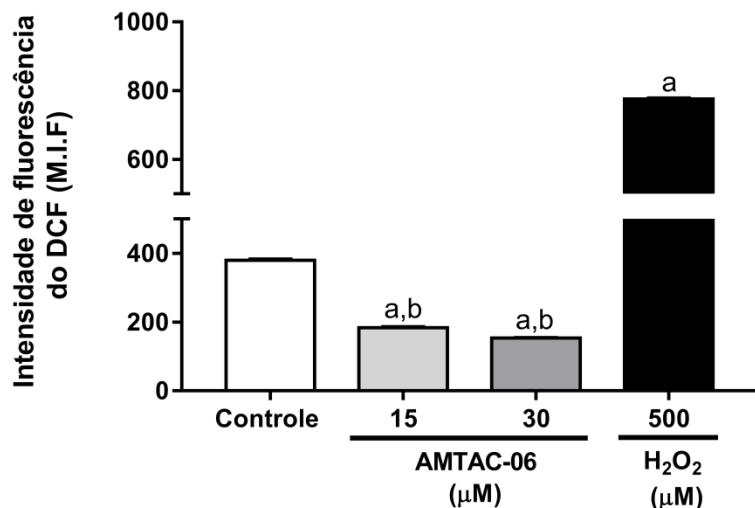
5.1.2.3 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

O tratamento por 48 horas com o composto AMTAC-06 reduziu significativamente a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), em

células HCT-116, nas duas concentrações avaliadas ($15 \mu\text{M}$: $183,6 \pm 3,23$; $30 \mu\text{M}$: $153,3 \pm 1,53$; $p < 0,05$ para ambos) em relação ao controle ($379,9 \pm 3,69$), conforme visualizado no gráfico, a partir da média da intensidade de fluorescência (M.I.F.) do DCF (Gráfico 3).

Como esperado, a exposição ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , $500 \mu\text{M}$) aumentou a intensidade de fluorescência do DCF ($776 \pm 2,77$; $p < 0,05$), em comparação ao controle (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Efeito do tratamento (48 horas) com o composto AMTAC-06 na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células HCT-116 marcadas com H_2DCFDA



Fonte: DUARTE, 2021.

Legenda: Representação gráfica dos resultados obtidos por citometria de fluxo. H_2O_2 foi usado como controle positivo. Os dados são expressos como média \pm e.p.m. de um experimento independente em triplicata, analisado por ANOVA seguido pelo teste de Tukey. ^a $p < 0,05$ em relação ao controle negativo; ^b $p < 0,05$ em comparação ao H_2O_2 ($500 \mu\text{M}$).

Nota: H_2DCFDA ($2',7'$ -diacetato de diclorodihidrofluoresceína); H_2O_2 (peróxido de hidrogênio); DCF ($2',7'$ -diclorofluoresceína).

*AMTAC-06: (E)-1'-((4-clorobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

5.2 Estudos *in vivo*

5.2.1 Ensaios toxicológicos

5.2.1.1 Avaliação da toxicidade aguda em embriões e larvas de peixe-zebra (*Danio rerio*)

A avaliação toxicológica revelou que o AMTAC-06 (7,88-126,2 μ M) não causou a morte dos embriões e larvas de peixe-zebra (Tabela 3). Além disso, não ocorreram alterações co-relacionadas aos pontos de letalidade verificados (coagulação do ovo, ausência de formação do somito, não deslocamento da base da cauda e falta de batimentos cardíacos) ou ainda, qualquer outra modificação morfológica e de desenvolvimento, nas concentrações testadas, durante 96 horas de observação (Figura 12).

O mesmo também foi observado nos embriões e larvas mantidos em meio E3 (controle interno/ negativo) e DMSO 0,5% (grupo solvente) (Figura 12). Diante dos resultados, é possível estimar que o valor da CL₅₀, para 96 horas de exposição ao AMTAC-06, foi superior a 126,2 μ M.

Tabela 3 - Efeito da exposição dos embriões/larvas de peixe-zebra (*Danio rerio*) ao AMTAC-06* (7,88-126,2 μ M) e DMSO** (0,5%), após 96 horas

Grupos	Número de mortos [†] / Número total de embriões/larvas
Controle	0/20
AMTAC-06 (7,88 μ M)	0/20
AMTAC-06 (15,77 μ M)	0/20
AMTAC-06 (31,55 μ M)	0/20
AMTAC-06 (63,1 μ M)	0/20
AMTAC-06 (126,2 μ M)	0/20
DMSO (0,5%)	0/20

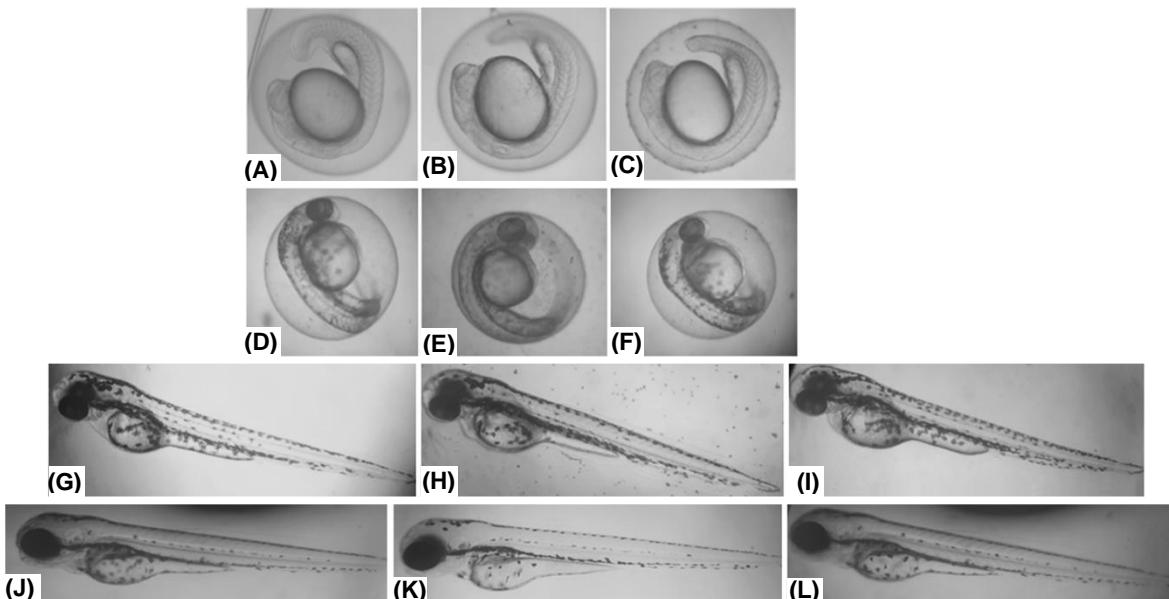
Fonte: DUARTE, 2021.

Legenda: [†] O embrião/larva foi considerado morto a partir da verificação dos seguintes pontos de letalidade:(i) coagulação do ovo; (ii) ausência de formação do somito; (iii) não deslocamento da base da cauda; e (iv) falta de batimentos cardíacos, de acordo com a recomendações do teste FET nº 236 (OECD, 2013).

*AMTAC-06: (E)-1'-((4-clorobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-diidro10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

** DMSO: Dimetilsulfóxido

Figura 12 - Embriões e larvas de peixe-zebra (*Danio rerio*) expostos ao meio E3 (controle negativo), AMTAC-06* (126,2 μ M) e ao solvente (DMSO** 0,5%), durante 96 horas



Fonte: DUARTE, 2021.

Legenda: Imagens representativas (50x) dos embriões (A-F) e larvas (G-L) de peixe-zebra após exposição ao AMTAC-06 (126,2 μ M) ou DMSO 0,5%. Períodos de observação: 24 (A-C), 48 (D-F), 72 (G-I) e 96 (J-L) horas. Controle negativo - Meio E3: (A, D, G, J); AMTAC-06 - 126,2 μ M: (B, E, H, K); DMSO 0,5%: (C, F, I, L).

*AMTAC-06: (E)-1'-(4-clorobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-diidro10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

** DMSO: Dimetilsulfóxido

5.2.1.2 Avaliação da toxicidade não clínica aguda em camundongos

O AMTAC-06 (dose única de 2000 mg/kg, i.p.) não causou morte dos camundongos experimentais durante os 14 dias de avaliação.

Em relação às avaliações comportamentais, foram observadas algumas alterações, incluindo diminuição da resposta ao toque, perda do reflexo auricular e analgesia. Porém, todos os efeitos anteriormente relatados desapareceram após 1 hora de tratamento (Tabela 4).

Os animais também apresentaram constipação, que desapareceu quatro horas após o tratamento e, contorções abdominais, visualizadas apenas no momento da administração (Tabela 4).

O valor da DL_{50} (dose letal média) foi estimada segundo o guia OECD 423 em torno de 5000 mg/kg e o AMTAC-06 foi classificado na categoria 5 da *Globally Harmonized Classification System* (GHS).

Tabela 4 - Efeitos da administração de dose única (i.p.) do AMTAC-06* (2000 mg/kg, i.p.) em camundongos

Grupos	Dose	M/T**	Efeitos comportamentais (duração do efeito)
Controle	-	0/3	Nenhum
AMTAC-06	2000 mg/kg	0/3	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Contorções abdominais (0 hora***); ▪ Diminuição da resposta ao toque, perda do reflexo auricular e analgesia (1 hora); ▪ Constipação (4 horas)

Fonte: DUARTE, 2021.

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

*AMTAC-06: (E)-1'-(4-clorobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-diidro10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

**M/T – Número de animais mortos/número de animais tratados

*** 0 hora: Efeito observado apenas no momento da administração

5.2.1.3 Avaliação da genotoxicidade

A Tabela 5 mostra o número de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos após o tratamento com AMTAC-06 (2000 mg/kg) e com a ciclofosfamida (50 mg/kg). AMTAC-06 não induziu alterações no número de eritrócitos micronucleados ($9,14 \pm 0,91$) em relação ao controle ($9,50 \pm 0,76$). Em contrapartida, a droga padrão ciclofosfamida aumentou significativamente o número de eritrócitos micronucleados ($18,40 \pm 0,52$; $p <0,05$) em comparação ao grupo controle.

Tabela 5 - Efeito da administração de dose única (i.p.) de AMTAC-06* (2000 mg/kg) e ciclofosfamida (50 mg/kg) no número de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos após 48 horas do tratamento

Grupos	Dose (mg/kg)	Número de eritrócitos micronucleados
Controle	-	9,50 ± 0,76
AMTAC-06	2000	9,14 ± 0,91 ^b
Ciclofosfamida	50	18,40 ± 0,52 ^a

Fonte: DUARTE, 2021.

Legenda: Dados apresentados como média ± e.p.m. de seis animais analisados por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p<0,05$ comparado ao grupo controle. ^b $p< 0,05$ comparado ao grupo ciclofosfamida.

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

*AMTAC-06: (E)-1'-((4-clorobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-diidro10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

5.2.2 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich (CAE)

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

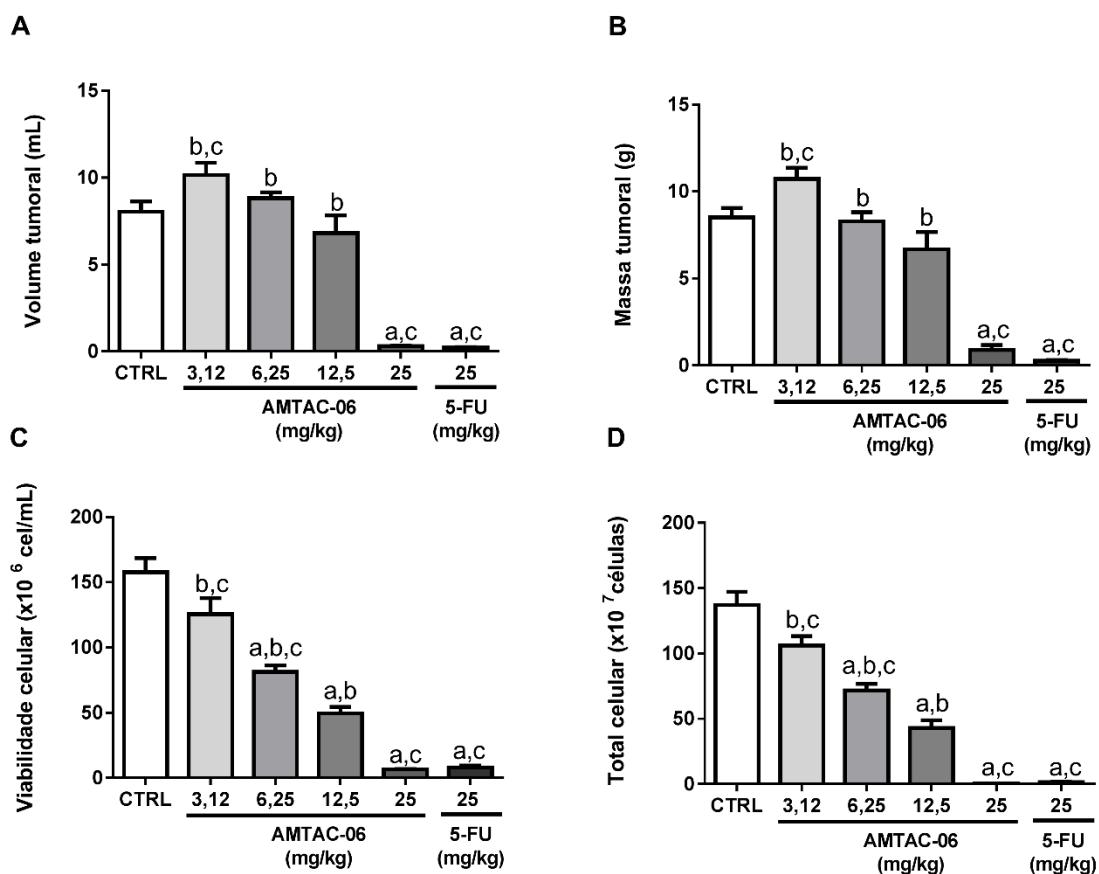
O tratamento com AMTAC-06 não induziu alterações significativas no volume (Gráfico 4A) e massa tumoral (Gráfico 4B) nas doses de 3,12, 6,25 e 12,5 mg/kg, quando comparado ao grupo controle. Entretanto, foi observada uma redução significativa no volume ($0,32 \pm 0,03$ ml; $p < 0,05$) e massa tumoral ($0,87 \pm 0,29$ g; $p < 0,05$) na dose de 25 mg/kg, comparado aos controles ($8,04 \pm 0,6$ ml e $8,5 \pm 0,55$ g, respectivamente).

AMTAC-06 reduziu significativamente a viabilidade celular nas doses de 6,25 mg/kg ($81,27 \pm 4,95 \times 10^6$ células/ml; $p < 0,05$), 12,5 mg/kg ($49,43 \pm 5,05 \times 10^6$ células/ml; $p < 0,05$) e 25 mg/kg ($6,45 \pm 0,33 \times 10^6$ células/ml; $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle ($157,7 \pm 10,85 \times 10^6$ células/ml) (Gráfico 4C). Ao considerar o parâmetro total celular, também houve redução significativa do número de células, nas doses de 6,25 mg/kg ($71,81 \pm 4,92 \times 10^7$ células; $p < 0,05$), 12,5 mg/kg ($43,0 \pm 5,96 \times 10^7$ células; $p < 0,05$) e 25

mg/kg ($0,20 \pm 0,02 \times 10^7$ células $p < 0,05$), em comparação com o grupo controle ($137,2 \pm 9,98 \times 10^7$ células) (Gráfico 4D).

A droga padrão 5-FU (25 mg/kg) reduziu significativamente todos os parâmetros avaliados (volume tumoral: $0,22 \pm 0,04$ mL; $p < 0,05$; massa tumoral: $0,25 \pm 0,05$ g; $p < 0,05$; viabilidade celular: $8,0 \pm 1,43 \times 10^6$ células/ml; $p < 0,05$; e total celular: $1,41 \pm 0,30 \times 10^7$ células; $p < 0,05$), quando comparado aos seus respectivos grupos controle (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Efeitos do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-06* (3,12; 6,5; 12,5 e 25 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) em camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich



Fonte: DUARTE, 2021.

Legenda: (A) volume tumoral; (B) massa tumoral; (C) viabilidade celular; (D) total celular. Dados apresentados como média \pm e.p.m. de oito animais/grupo analisados por ANOVA, seguido de Tukey. CTRL: controle.

^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo 5-FU (25 mg/kg); ^c $p < 0,05$ comparado à dose de 12,5 mg/kg de AMTAC-06.

*AMTAC-06: (E)-1'-((4-clorobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

**5-FU: 5-fluorouracila

5.2.3 Investigação do efeito antitumoral *in vivo*

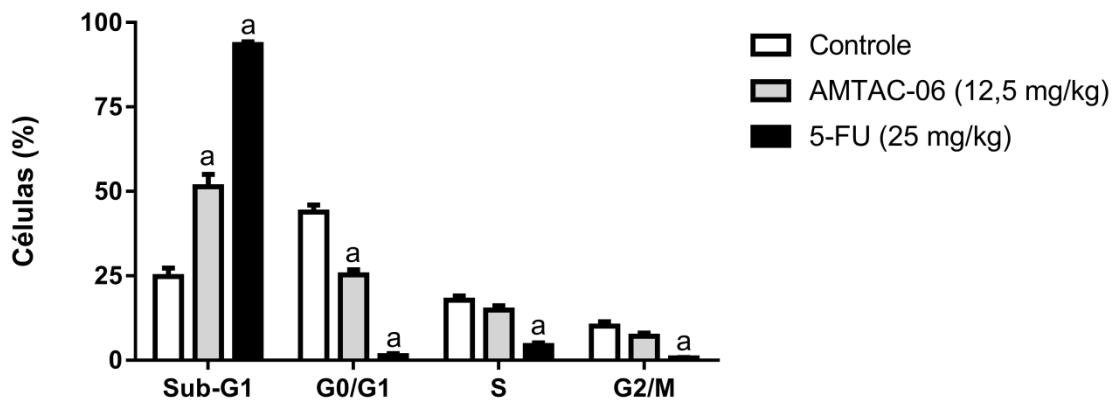
Embora a dose de 25 mg/kg do AMTAC-06 tenha reduzido significativamente todos os parâmetros avaliados *in vivo* em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich (volume e massa tumoral; viabilidade e total celular), não foram obtidas células tumorais no fluido ascítico em quantidade suficiente para realização dos ensaios posteriores. Portanto, a dose de 12,5 mkg/kg foi selecionada para realização das análises que constam nos itens 5.2.3.1 - 5.2.4.4 (página 123 – 133).

5.2.3.1 Análise do ciclo celular

O tratamento com AMTAC-06 (12,5 mg/kg) induziu um aumento significativo no percentual de células em sub-G1 (51,36% \pm 3,69; $p < 0,05$), associado à uma redução significativa de células na fase G0/G1 (25,27% \pm 1,49; $p < 0,05$), comparado ao grupo controle (24,78% \pm 2,54 e 43,89% \pm 2,07, respectivamente) (Gráfico 5).

O tratamento com 5-FU também causou um aumento de células em sub-G1 (93,43% \pm 0,84; $p < 0,05$), enquanto reduziu significativamente a porcentagem celular em todas as fases do ciclo (G0/G1: 1,36% \pm 0,58; $p < 0,05$; S: 4,4% \pm 0,69; $p < 0,05$; e G2/M: 0,69% \pm 0,07; $p < 0,05$), em comparação com o grupo controle (sub-G1: 24,78% \pm 2,54; G0/G1: 43,89% \pm 2,07; S: 17,8% \pm 1,27; G2/M: 10,1% \pm 1,25) (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-06* (12,5 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) na distribuição de células de carcinoma ascítico de Ehrlich nas diferentes fases do ciclo celular



Fonte: DUARTE, 2021.

Legenda: Dados apresentados como média \pm e.p.m. de oito animais/grupo analisados por ANOVA seguido de Tukey. ^ap <0,05 comparado ao grupo controle.

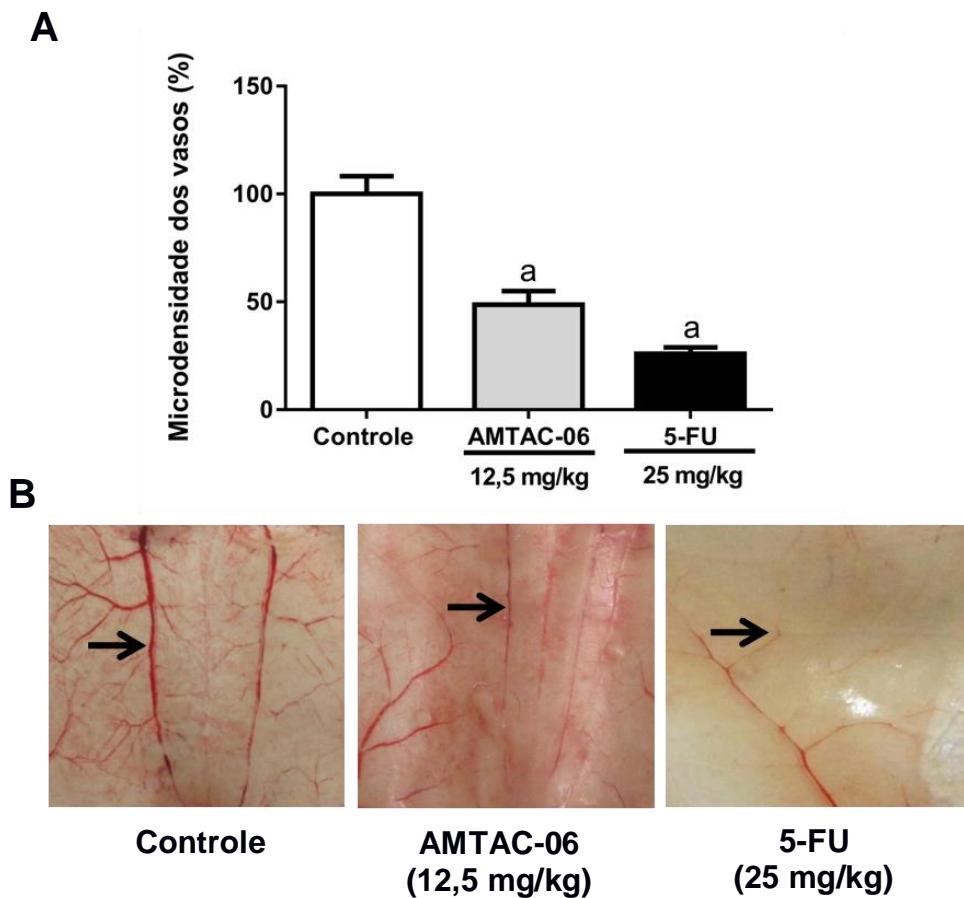
*AMTAC-06: (E)-1'-(4-clorobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

**5-FU: 5-fluorouracila

5.2.3.2 Avaliação do efeito antiangiogênico

Houve uma redução significativa na microdensidade dos vasos tumorais ($48,7\% \pm 6,4$; p <0,05) após os sete dias de tratamento com AMTAC-06 (12,5 mg/kg), quando comparado ao grupo controle ($100\% \pm 8,3$). Efeito similar também foi observado com o grupo tratado com a droga padrão 5-FU ($25,9\% \pm 3,0$; p <0,05) (Figura 13).

Figura 13 - Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-06* (12,5 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg)** na microdensidade dos vasos peritumorais de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich



Fonte: DUARTE, 2021.

Legenda: (A) Representação gráfica dos resultados obtidos. A microdensidade dos vasos (%) foi determinada pela área ocupada por vasos sanguíneos divididos pela área total selecionada. Figuras foram cortadas em tamanho padrão (1 cm x 1 cm). **(B)** Imagens representativas da membrana peritoneal dos camundongos submetidos aos diferentes tratamentos. Dados apresentados como média \pm e.p.m. de oito animais/grupo analisados por ANOVA seguido de Tukey. $^a p<0,05$ comparado ao grupo controle.

*AMTAC-06: (E)-1'-(4-chlorobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

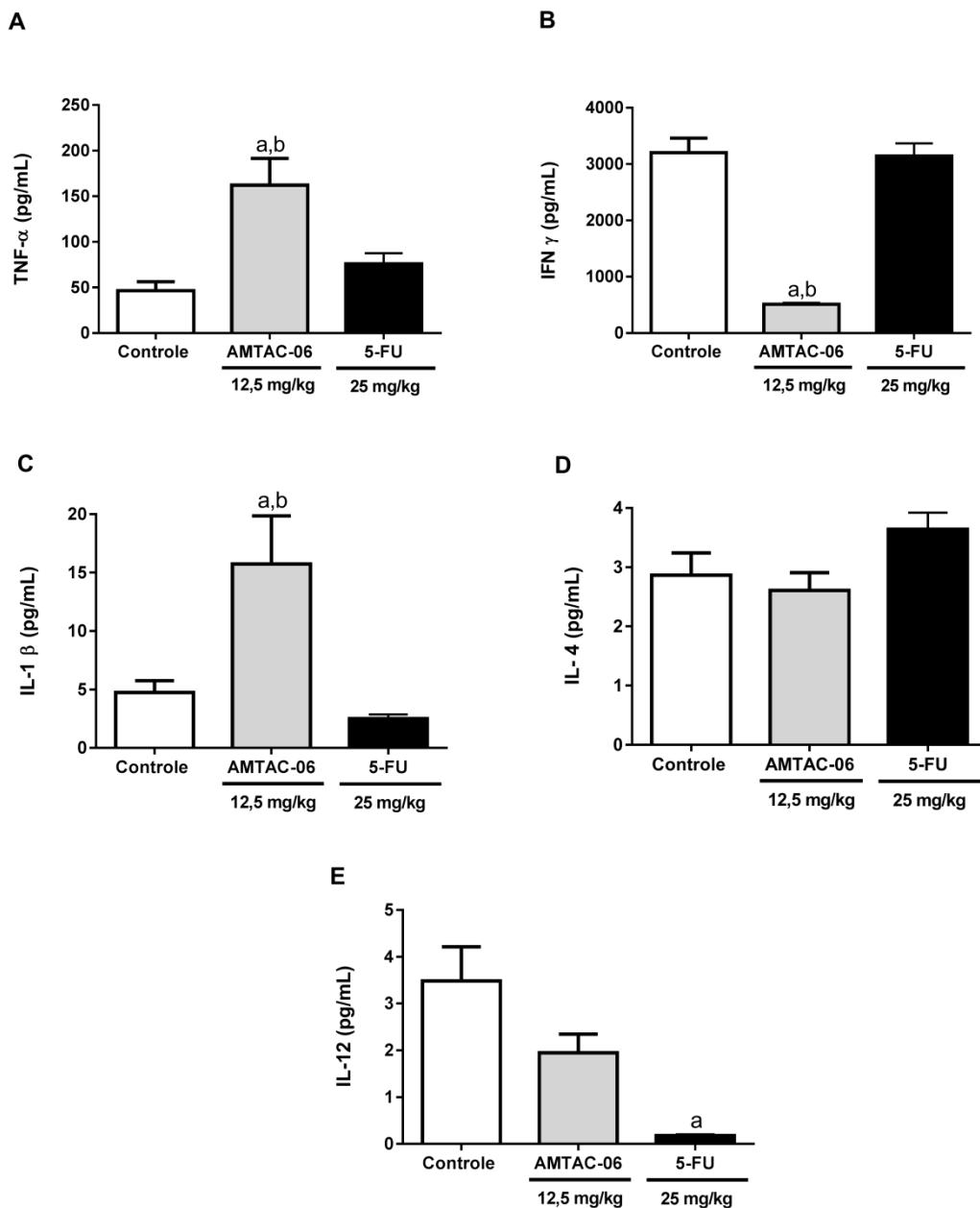
**5-FU: 5-fluorouracila

5.2.3.3 Quantificação de citocinas no lavado peritoneal

O tratamento com AMTAC-06 (12,5 mg/kg) induziu aumento nos níveis de TNF- α ($162,20 \pm 29,36$ pg/mL; $p <0,05$) e IL-1 β ($15,74 \pm 4,12$ pg/mL; $p <0,05$), quando comparados ao grupo controle ($46,60 \pm 9,82$ pg/mL e $4,74 \pm 1,00$ pg/mL, respectivamente). Em contraste, houve uma diminuição nos níveis de INF- γ ($511,50 \pm 16,12$ pg/mL; $p <0,05$), em comparação com o controle ($3.206 \pm 254,10$ pg/mL). Não foram observados efeitos significativos nos níveis de IL-4 e IL-12 (Gráfico 6).

No tratamento com 5-FU (25 mg/kg), foi observada uma diminuição no nível de IL-12 ($0,18 \pm 0,03$ pg/mL; $p <0,05$), em comparação com o controle ($3,48 \pm 0,73$ pg/mL) (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-06* (12,5 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) nos níveis de citocinas do lavado peritoneal de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich



Fonte: DUARTE, 2021.

Legenda: (A) TNF- α , (B) INF- γ , (C) IL-1 β , (D) IL-4, (E) IL-12. Dados apresentados como média \pm e.p.m. de cinco animais/grupo analisados por ANOVA, seguido do teste de Tukey. ^ap <0,05 comparado ao grupo controle; ^bp <0,05 comparado ao grupo 5-FU.

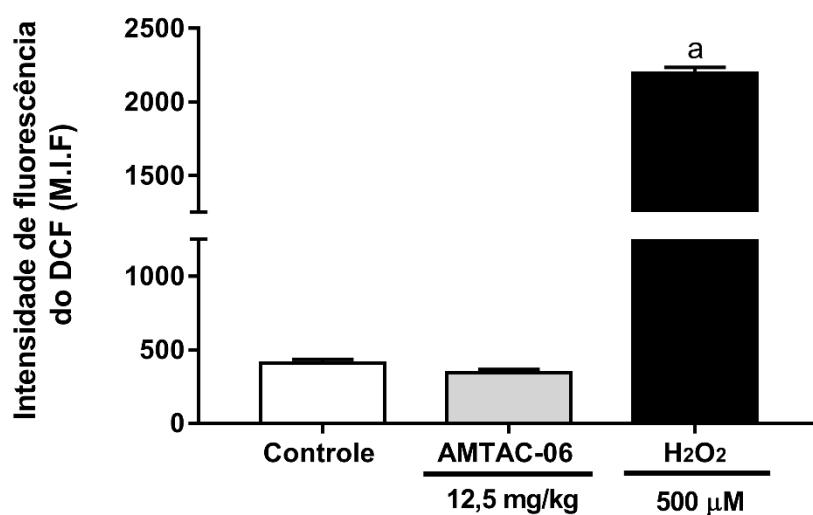
*AMTAC-06: (E)-1'-(4-clorobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

**5-FU: 5-fluorouracila

5.2.3.4 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

O tratamento com AMTAC-06 (12,5 mg/kg) não alterou os níveis de EROs em relação ao grupo controle, em modelo de tumor ascítico de Ehrlich (Gráfico 7).

Gráfico 7 - Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-06* (12,5 mg/kg) na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich



Fonte: DUARTE, 2021.

Legenda: Dados apresentados como média ± e.p.m. de oito animais/grupo analisados por ANOVA seguido de Tukey. H₂O₂: Peróxido de hidrogênio. ^ap <0,05 comparado ao grupo controle.

*AMTAC-06: (E)-1'-((4-clorobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

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

5.2.4.1 Avaliação ponderal e do consumo de água e de ração

Na tabela 6 estão expressos os valores referentes ao consumo de água e ração, bem como a evolução ponderal dos animais tratados com AMTAC-06 (12,5 mg/kg) e com a droga padrão 5-FU (25 mg/kg). De acordo com os

resultados obtidos, não foram observadas alterações significativas no consumo de água e ração dos animais tratados com AMTAC-06 (12,5 mg/kg), bem como nos pesos iniciais e finais, quando comparados ao controle. A droga padrão 5-FU também não induziu alterações nos parâmetros avaliados.

Tabela 6 - Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-06* (12,5 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) no consumo de água e de ração, e evolução ponderal de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich

Grupos	Consumo de água (mL)	Consumo de ração (g)	Peso inicial (g)	Peso final (g)
Controle	40 ± 3,6	33,8 ± 5,9	29,3 ± 0,6	26,5 ± 1,4
AMTAC-06	46,7 ± 4,9	42,6 ± 5,5	28,6 ± 0,4	24,8 ± 0,8
5-FU	29,0 ± 2,9	21,8 ± 1,5	30,6 ± 0,6	28,6 ± 0,3

Fonte: DUARTE, 2021.

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

*AMTAC-06: (E)-1'-((4-clorobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

**5-FU: 5-fluorouracila

5.2.4.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos

A investigação dos efeitos toxicológicos de AMTAC-06 (12,5 mg/kg) por meio das análises bioquímicas mostrou que este composto não causou nenhuma alteração significativa nos parâmetros avaliados, quando comparado aos grupos controle e sadio (Tabela 7).

Todavia, a droga padrão 5-FU (25 mg/kg) induziu um aumento significativo nas enzimas AST (162,6 ± 2,3; p <0,05) e ALT (176,6 ± 3,3; p <0,05), em relação aos grupos controle (AST: 120,5 ± 17,0; ALT: 106,3 ± 14,2) e sadio (AST: 101,0 ± 7,2; ALT: 113,6 ± 7,9). Não houve alterações significativas nos níveis de ureia e creatinina (Tabela 7).

Tabela 7 - Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-06* (12,5 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) nos parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.

Grupos	Dose (mg/kg)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
Grupo Sadio	-	101,0 ± 7,2	113,6 ± 7,9	41,6 ± 4,1	0,92 ± 0,04
Controle	-	120,5 ± 17,0	106,3 ± 14,2	45,5 ± 6,6	1,03 ± 0,15
AMTAC-06	12,5	108,8 ± 5,5	80,5 ± 3,4	37,2 ± 6,8	0,84 ± 0,10
5-FU	25	162,6 ± 2,3 ^{a,b}	176,6 ± 3,3 ^{a,b}	39,75 ± 2,4	0,82 ± 0,06

Fonte: DUARTE, 2021.

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

*AMTAC-06: (E)-1'-(4-clorobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

**5-FU: 5-fluorouracila

Os valores dos parâmetros hematológicos de sangue periférico dos animais submetidos ao tratamento com AMTAC-06 (12,5 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) estão expressos nas tabelas 8 (eritrograma) e 9 (leucograma).

Não foram identificadas alterações significativas em nenhum dos parâmetros do eritrograma e leucograma nos animais tratados com AMTAC-06, quando comparado ao grupo controle transplantado. Porém, ocorreram alterações nos níveis do VCM (45,00 ± 1,82 fm³; p<0,05), CHCM (41,55 ± 1,36 g/dL; p<0,05) e na porcentagem de neutrófilos (16,33 ± 1,64 %; p<0,05), quando comparados aos animais sadios (54,26 ± 1,24 fm³; 19,60 ± 1,26 g/dL; 2,00 ± 0,29 %, respectivamente) (Tabelas 8 e 9).

O grupo tratado com 5-FU mostrou alterações nos parâmetros VCM (63,68 ± 2,52 fm³; p<0,05) e HCM (21,98 ± 0,35 pg; p<0,05), em relação ao controle transplantado (49,89 ± 2,52 fm³; 18,46 ± 0,57 pg, respectivamente) e

ao grupo sadio ($54,26 \pm 1,24 \text{ fm}^3$; $19,65 \pm 0,33 \text{ pg}$, respectivamente). Também houve alteração nos valores de CHCM ($37,12 \pm 2,60 \text{ g/dL}$; $p<0,05$), quando comparado ao grupo sadio ($19,60 \pm 1,26 \text{ g/dL}$) (Tabela 8).

Além disso, o 5-FU alterou a contagem de leucócitos totais ($3,02 \pm 0,06 \text{ } 10^3/\text{mm}^3$; $p<0,05$) e os percentuais de neutrófilos ($6,30 \pm 0,87 \%$; $p<0,05$) e monócitos ($1,00 \pm 0,31 \%$; $p<0,05$), em relação aos grupos controle transplantado ($10,13 \pm 1,60 \text{ } 10^3/\text{mm}^3$; $13,80 \pm 1,77 \%$; $8,85 \pm 1,58 \%$, respectivamente) e sadio ($11,58 \pm 0,82 \text{ } 10^3/\text{mm}^3$; $2,00 \pm 0,29 \%$; $5,42 \pm 0,64 \%$, respectivamente) (Tabela 9).

Tabela 8 - Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-06* (12,5 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) nos parâmetros hematológicos (eritrograma) do sangue periférico de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich

Parâmetro	Grupo Sadio	Controle	AMTAC-06 (12,5 mg/kg)	5-FU (25 mg/kg)
Eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$)	$6,57 \pm 0,21$	$6,91 \pm 0,75$	$6,60 \pm 0,37$	$5,17 \pm 0,29$
Hemoglobina (g/dL)	$12,96 \pm 0,39$	$12,54 \pm 1,03$	$12,18 \pm 0,55$	$11,43 \pm 0,50$
Hematócrito (%)	$35,81 \pm 1,24$	$34,29 \pm 3,85$	$30,00 \pm 2,26$	$32,75 \pm 1,25$
VCM (fm^3)	$54,26 \pm 1,24$	$49,89 \pm 2,52$	$45,00 \pm 1,82^b$	$63,68 \pm 2,52^{a,b}$
HCM (pg)	$19,65 \pm 0,33$	$18,46 \pm 0,57$	$18,54 \pm 0,34$	$21,98 \pm 0,35^{a,b}$
CHCM (g/dL)	$19,60 \pm 1,26^a$	$37,63 \pm 2,30^b$	$41,55 \pm 1,36^b$	$37,12 \pm 2,60^b$

Fonte: DUARTE, 2021.

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

*AMTAC-06: (E)-1'-((4-clorobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

**5-FU: 5-fluorouracila

Tabela 9 - Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-06* (12,5 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) nos parâmetros hematológicos (leucograma) do sangue periférico de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich

Parâmetro	Grupo Sadio	Controle	AMTAC-06 (12,5 mg/kg)	5-FU (25 mg/kg)
Leucócitos totais ($10^3/\text{mm}^3$)	$11,58 \pm 0,82$	$10,13 \pm 1,60$	$8,01 \pm 1,04$	$3,02 \pm 0,06^{\text{a,b}}$
Linfócitos (%)	$81,38 \pm 3,43$	$78,43 \pm 3,31$	$78,57 \pm 3,60$	$88,00 \pm 1,09$
Neutrofilos (%)	$2,00 \pm 0,29^{\text{a}}$	$13,80 \pm 1,77^{\text{b}}$	$16,33 \pm 1,64^{\text{b}}$	$6,30 \pm 0,87^{\text{a,b}}$
Monócitos (%)	$5,42 \pm 0,64$	$8,85 \pm 1,58$	$8,66 \pm 1,08$	$1,00 \pm 0,31^{\text{a,b}}$
Eosinófilos (%)	$2,00 \pm 0,30$	$2,60 \pm 0,24$	$2,12 \pm 0,29$	$1,60 \pm 0,24$

Fonte: DUARTE, 2021.

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

*AMTAC-06: (E)-1'-((4-clorobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

**5-FU: 5-fluorouracila

5.2.4.3 Avaliação dos índices dos órgãos

O tratamento com o AMTAC-06 (12,5 mg/kg) não induziu alterações significativas nos índices dos órgãos avaliados (coração, fígado, rins, baço e timo) em relação ao grupo controle. O mesmo foi observado para o grupo tratado com a droga padrão (5-FU) (Tabela 10).

Tabela 10 - Índices dos órgãos de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich após tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-06* (12,5 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg)

Grupos	Índice de coração (mg/g)	Índice de fígado (mg/g)	Índice de rins (mg/g)	Índice de baço (mg/g)	Índice de timo (mg/g)
Controle	4,2 ± 0,3	65,4 ± 2,2	12,7 ± 0,4	5,6 ± 0,6	3,2 ± 0,4
AMTAC-06	3,8 ± 0,1	64,4 ± 2,6	12,8 ± 0,7	6,9 ± 0,8	3,1 ± 0,3
5-FU	4,3 ± 0,3	63,8 ± 1,2	11,2 ± 0,3	3,9 ± 0,1	2,2 ± 0,1

Fonte: DUARTE, 2021.

Legenda: Dados apresentados como média ± e.p.m. de oito animais/grupo, analisados por ANOVA seguido por Tukey. Controle: animais transplantados com o tumor e tratados apenas com o veículo (12% de Tween 80 em solução salina).

*AMTAC-06: (E)-1'-((4-clorobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

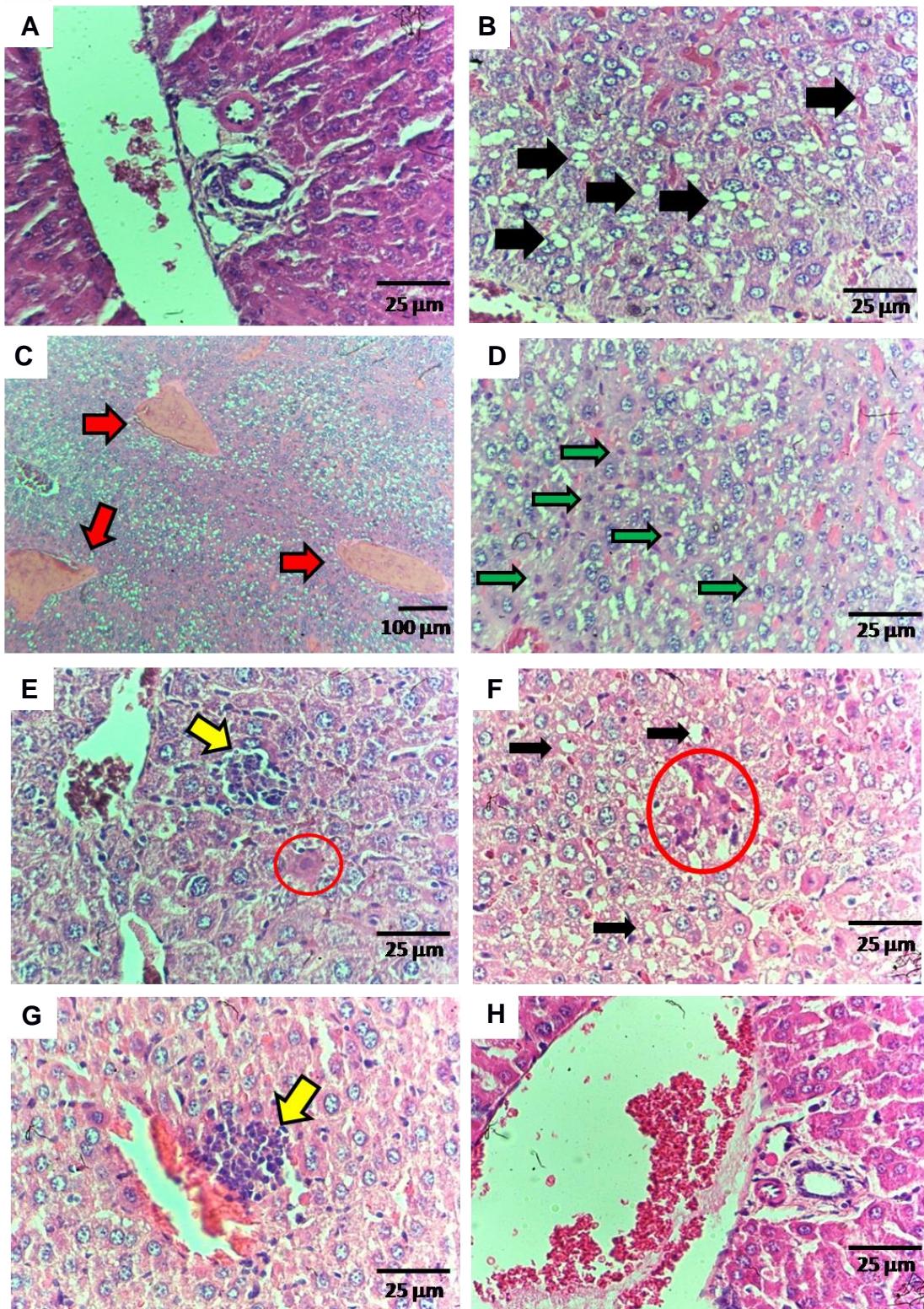
**5-FU: 5-fluorouracila

5.2.4.4 Análises histológicas

Para uma avaliação mais detalhada dos possíveis efeitos hepatotóxicos dos animais tratados com AMTAC-06, foram realizadas análises histológicas em HE (hematoxilina e eosina).

Ao exame de microscopia de luz, os fígados corados em HE dos animais do grupo sadio (sem o tumor de Ehrlich, porém submetidos às mesmas condições experimentais) apresentaram arquitetura hepática bem conservada, com presença da tríade portal (ramo da veia porta, da artéria hepática e o ducto biliar), hepatócitos poligonais uni ou binucleados permaneceram inalterados, organizados em cordões direcionados para as veias hepáticas terminais (Figura 14A).

Figura 14 - Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-06* (12,5 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) na histologia do fígado dos camundongos experimentais



Fonte: DUARTE, 2021.

Legenda: Imagens representativas da histologia hepática de camundongos dos diferentes grupos experimentais (n= 4 animais/grupo). **(A) Grupo sadio.** A: Arquitetura normal dos cordões hepáticos e espaço portal. **(B-D) Grupo controle.** B: Esteatose hepática microgótica (seta preta, HE, 400x); C: Congestão vascular (seta vermelha, HE, 100x); D: Células de kupffer (seta verde, HE, 100x). **(E) Grupo tratado com 5-FU (25 mg/kg).** E: Infiltrado inflamatório (seta amarela) e necrose de hepatócitos (círculo vermelho), (HE 400x). **(F-H) Grupo tratado com AMTAC-06 (12,5 mg/kg).** F: esteatose hepática microgótica (seta preta, HE, 400x) e necrose de hepatócitos (círculo vermelho, HE 400x). G: Infiltrado linfoplasmocitário (seta amarela, HE, 400x). H: Arquitetura dos cordões hepáticos e tríade portal (HE, 400x).

Grupo controle: animais transplantados com o tumor de Ehrlich e tratados apenas com o veículo (12% de Tween 80 em solução salina). Grupo sadio: animais sem o tumor de Ehrlich, submetidos às mesmas condições experimentais. HE: Hematoxilina/Eosina

*AMTAC-06: (E)-1'-((4-clorobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

**5-FU: 5-fluorouracila

Em contrapartida, ao avaliar os animais do grupo controle transplantado (animais com o tumor de Ehrlich e tratados com o veículo) foram observadas lesões reversíveis, do tipo esteatose microgótica (Figura 14B), uma quantidade moderada de vasos congestos (Figura 14C), e aumento do número das células de kupffer (Figura 14D). Entretanto, os espaços portais estavam regularmente distribuídos com a presença da tríade vasculo-biliar habitual, cordões hepáticos inalterados, e não foram encontrados necrose de hepatócitos, atipias celulares ou infiltrado inflamatório.

Os animais tratados com a droga padrão 5-FU apresentaram arquitetura lobular preservada, com células de kupffer e sinusoides hepáticos morfológicamente preservados, porém foi observado discreto infiltrado linfoplasmocitário e alguns hepatócitos necrosados, com núcleo picnótico em algumas áreas no tecido (Figura 14E). Quando analisados os fígados dos animais tratados com o AMTAC-06 observou-se esteatose microgótica leve, alguns poucos hepatócitos necrosados isolados (Figura 14F) e a presença moderada de infiltrado linfoplasmocitário (Figura 14G). No entanto, as demais características morfológicas em relação à tríade portal, cordões de hepatócitos, células de kupffer e arquitetura hepática mantiveram-se inalteradas e bem preservadas, semelhante ao grupo sadio (Figura 14H).

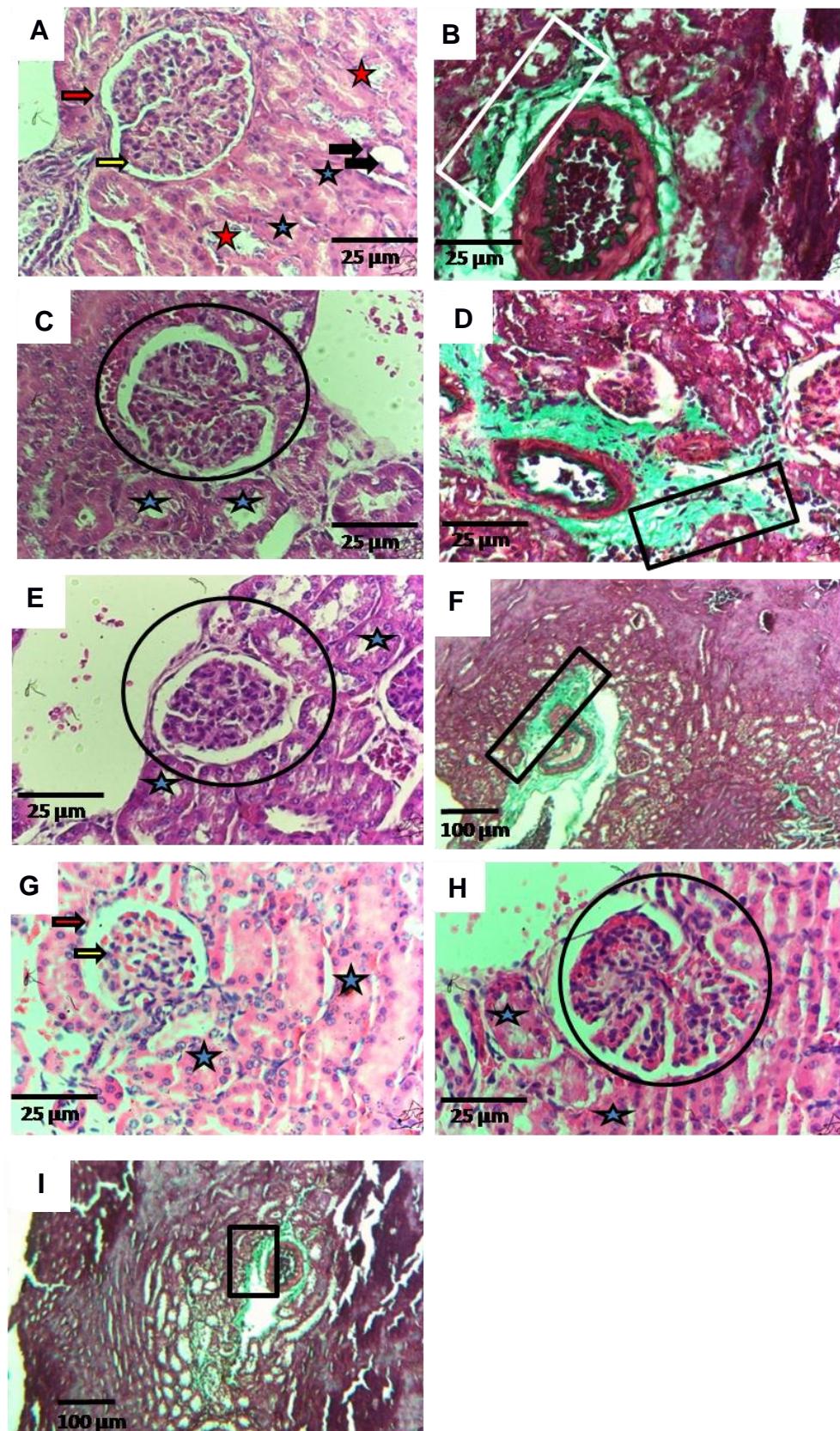
Para uma avaliação mais detalhada dos possíveis efeitos nefrotóxicos dos animais tratados com AMTAC-06, análises histológicas em HE e tricrômio de Gomori foram realizadas (Figura 15).

Os rins dos animais do grupo sadio apresentaram parênquima renal preservado. Na área cortical foram observados corpúsculos renais de tamanho regular, envolvidos por fina cápsula de Bowman e tufo capilar distribuído ao longo do glomérulo, sustentado por delicado mesângio e túbulos proximais e distais normais. (Figura 15A). A coloração histoquímica do tricrômico de Gomori evidenciou tecido conjuntivo bem distribuído nas estruturas vasculares do parênquima renal (Figura 15B)

Os grupos controle transplantado e tratado com 5-FU apresentaram bastante semelhança em relação às estruturas glomerulares com morfologia preservada (Figura 15C e 15E, respectivamente), no entanto apresentaram aumento da deposição de tecido conjuntivo ao redor dos vasos sanguíneos (Figura 15D e 15F, respectivamente), quando comparado ao grupo sadio (Figura 15B).

Os animais tratados com AMTAC-06 apresentaram alguns glomérulos normais (Figura 15G) e outros anormais com morfologia de glomerulonefrite membranoproliferativa, onde o glomérulo apresenta nítido aumento da lobulação (Figura 15H) (tufos glomerulares se afastam uns dos outros com aspecto de folhas de trevo e espessamento da parede dos capilares). No entanto, diferente do que foi observado nos grupos controle transplantado e 5-FU, a deposição de tecido conjuntivo ao redor dos vasos apresenta-se normal (Figura 15I), semelhante à morfologia do grupo sadio (Figura 15B). Características que remetem a danos renais, tais como a presença de necrose tubular ou cilindros protéicos intratubulares não foram encontradas neste grupo.

Figura 15 - Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com AMTAC-06* (12,5 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) na histologia dos rins dos camundongos experimentais



Fonte: DUARTE, 2021.

Legenda: Imagens representativas da histologia renal de camundongos dos diferentes grupos experimentais (n= 4 animais/grupo). **(A-B) Grupo sadio.** **A:** Côrtex renal com glomérulo circundado por cápsula de Bowman. Epitélio parietal (seta vermelha), epitélio visceral (seta amarela), túbulos proximais (estrela azul), distal (estrela vermelha) e alça de henle fina (seta preta) (HE, 400x). **B:** Tecido conjuntivo perivascular (retângulo branco) (TG, 400x). **(C-D) Grupo controle.** **C:** Glomérulo (círculo preto) e túbulos proximais (asterisco azul) (HE, 400x). **D:** Tecido conjuntivo perivascular (retângulo preto) (TG, 400x). **(E-F) Grupo tratado com 5-FU (25 mg/kg).** **E:** Glomérulo (círculo preto) e túbulos proximais (asterisco azul) (HE, 400x). **F:** Tecido conjuntivo perivascular (retângulo preto) (TG, 400x). **(G-I) Grupo tratado com AMTAC-06 (12,5 mg/kg).** **G:** Glomérulos e tubos preservados na região cortical (HE, 400x). Epitélio parietal (seta vermelha), epitélio visceral (seta amarela), túbulos proximais (estrela azul). **H:** Côrtex renal com glomerulonefrite membranoproliferativa (círculo preto) (HE, 400x). Túbulos proximais (estrela azul). **I:** Tecido conjuntivo perivascular (retângulo preto) (TG, 400x).

Grupo controle: animais transplantados com o tumor de Ehrlich e tratados apenas com o veículo (12% de Tween 80 em solução salina). Grupo sadio: animais sem o tumor de Ehrlich, submetidos às mesmas condições experimentais. HE: Hematoxilina/Eosina; TG: Tricrômico de Gomori.

*AMTAC-06: (E)-1'-((4-clorobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

**5-FU: 5-fluorouracila

Discussão

6. DISCUSSÃO

A acridina e seus derivados são utilizados para fins comerciais há muitos anos e têm atraído a atenção de pesquisadores devido às diversas atividades biológicas já relatadas, incluindo antitumoral (GENSICKA-KOWALEWSKA; CHOLEWIŃSKI; DZIERZBICKA, 2017; DE ALMEIDA et al., 2017). Então, considerando seu potencial farmacológico, este trabalho se propôs a investigar a atividade antitumoral e a toxicidade de novos derivados espiro-acridínicos, bem como caracterizar o efeito antitumoral *in vitro* e *in vivo* do composto mais promissor.

Inicialmente, a atividade antitumoral dos compostos espiro-acridínicos (AMTAC: 06, 09, 10, 11, 13 e 16) foi avaliada *in vitro* por meio da realização de uma triagem preliminar com diferentes linhagens celulares tumorais humanas, utilizando o ensaio do MTT (brometo de 3- [4,5- dimetiltiazol-2-il] -2,5 difenil tetrazólio). Os compostos avaliados apresentaram diferentes potenciais de atividade antitumoral contra as linhagens testadas e, dentre eles, o AMTAC-09 mostrou os menores percentuais de inibição do crescimento celular, enquanto o AMTAC-06 foi o mais citotóxico para todas as linhagens tumorais avaliadas, apresentando uma maior atividade em células de carcinoma colorretal (HCT-116).

Resultados semelhantes foram encontrados por Serafim (2014) com os compostos AMTAC 01 e 02, derivados espiro-acridínicos, que, quando avaliados pelo ensaio do MTT, apresentaram atividade antitumoral na linhagem de adenocarcinoma colorretal (HT-29), assim como em células de leucemia promielocítica aguda (HL-60) e câncer de mama (MCF-7) (SERAFIM, 2014). Nesta mesma perspectiva, o espiro-acridínico AMTAC-07 exibiu atividade antiproliferativa nas linhagens HL-60 e HCT-116 (BATISTA, 2019), enquanto o derivado híbrido tiofênico-acridínico, ACS-03, também demonstrou efeito antitumoral na linhagem HCT-116 (LISBOA et al., 2019), quando avaliados *in vitro* pela metodologia do ensaio do MTT.

Ao analisar a estrutura do composto mais ativo, AMTAC-06, observa-se a contribuição positiva do átomo de cloro na posição para do anel benzilidênico, o que possivelmente está relacionado aos efeitos eletrônicos, lipofílicos e estéricos atribuídos a esse átomo, sendo estas características

importantes na formação de complexos ternários mais estáveis com o DNA e outros alvos moleculares (GOUVEIA et al., 2018), o que poderia estar influenciando na sua resposta farmacológica. Diante dos resultados obtidos, o AMTAC-06 foi selecionado para a continuidade dos estudos de atividade antitumoral *in vitro* com a linhagem mais sensível ao tratamento, HCT-116 (carcinoma colorretal).

O câncer colorretal abrange os tumores que se iniciam no cólon (porção inicial do intestino grosso), reto (porção terminal do intestino grosso) e ânus (INCA, 2020). Esta neoplasia apresenta grande relevância epidemiológica em nível mundial, ocupando o terceiro lugar em termos de incidência e o segundo em mortalidade, figurando entre os tipos de câncer mais comuns. No ano de 2018, a Agência Internacional para Pesquisa no Câncer (IARC) estimou mais de 1,8 milhões de novos casos e 881 mil mortes em decorrência desta doença, a nível mundial (BRAY et al., 2018; FERLAY et al., 2019). No Brasil, o INCA apontou que no ano de 2017 foram registradas 18.867 mortes, enquanto que a previsão para o triênio 2020-2022 é de aproximadamente 41 mil novos casos anuais (INCA, 2020). Nesta perspectiva, é fundamental a descoberta de novos fármacos direcionados para seu tratamento (AHMED, 2020; XIE; CHEN; FANG, 2020).

A segunda etapa dos estudos de atividade antitumoral *in vitro* consistiu na determinação da IC_{50} do AMTAC-06 na linhagem HCT-116 e em células não tumorais (PBMC, L929 e HaCaT), um parâmetro comumente utilizado em triagens farmacológicas para estimar a citotoxicidade de novos compostos. A partir dos valores de IC_{50} foi calculado o índice de seletividade (IS), um índice que permite inferir se o composto é mais seletivo para as células tumorais em comparação às não tumorais, sendo considerado promissor quando o valor for igual ou superior a 2 (DE OLIVEIRA et al., 2015; PILON et al., 2020). Os resultados mostraram que, considerando os dados obtidos em células não tumorais, o AMTAC-06 foi menos citotóxico para a linhagem murina L929 (IC_{50} : 26,15 μ M), ao passo que exibiu uma maior toxicidade frente à linhagem humana HaCaT (IC_{50} : 17,87 μ M) e às células PBMCs (IC_{50} : 7,89 μ M). Contudo, é possível observar que a droga padrão doxorrubicina foi consideravelmente mais citotóxica para as células não tumorais HaCaT e PBMC, representado pelos baixos valores dos seus índices de seletividade (HaCaT: 0,10; PBMC:

0,01), quando comparados aos valores obtidos para o AMTAC-06 (HaCaT: 1,41; PBMC: 0,62).

Portanto, este resultado com o composto teste não representou uma limitação para a continuidade dos ensaios, pois é conhecido que a maioria absoluta dos quimioterápicos induzem efeitos tóxicos em células não tumorais (FERNANDO; JONES, 2015; SMITH; PREWETT, 2017), incluindo a própria doxorrubicina, utilizada na clínica para o tratamento de vários tipos de câncer (HEVENER et al., 2018; PUGAZHENDHI et al., 2018). Além disso, estudos conduzidos por nosso grupo de pesquisa com outros derivados espiro-acridínicos mostraram a potencialidade destas moléculas, que apresentaram atividade antitumoral e baixa toxicidade *in vivo* (SILVA et al., 2019; BATISTA, 2019).

Na próxima etapa deste estudo buscou-se caracterizar o efeito antitumoral *in vitro* do AMTAC-06 na linhagem HCT-116. Os efeitos *in vitro* foram investigados após 48 horas de incubação com este composto, utilizando as concentrações correspondentes à IC_{50} (15 μ M) e ao dobro da IC_{50} (30 μ M), escolhidas a partir dos dados de citotoxicidade obtidos. Inicialmente foi avaliado se o tratamento com AMTAC-06 influenciaria na distribuição de células nas diferentes fases do ciclo celular, uma vez que diversos quimioterápicos interferem neste processo (JONES; OCEN, 2020), sendo considerado um alvo de atuação inclusive de derivados acridínicos (MANGUEIRA et al., 2017; SILVA et al., 2019; ZHOU et al., 2018).

Considerando que o AMTAC-06 induziu aumento de células em sub-G1, pode-se sugerir que seu efeito citotóxico envolve a indução de apoptose. A fração sub-G1 apresenta quantidade de DNA inferior à G0/G1 (< 2n). Segundo a literatura, a sua formação é um indicativo do processo de apoptose, pois, durante a análise por citometria de fluxo, os eventos que apresentam um déficit no conteúdo de DNA, em relação à fase G1, normalmente correspondem à células que tiveram o DNA fragmentado, característica observada tipicamente na formação de corpos apoptóticos (DARZYNKIEWICZ; BEDNER; SMOLEWSKI, 2001; POZAROWSKI; DARZYNKIEWICZ, 2004). Estes resultados corroboram relatos da literatura para outros acridínicos (BOROWA-MAZGAJ et al., 2017; FU et al., 2017; SILVA et al., 2019). Em adição, a parada do ciclo celular na fase S, observada após o tratamento com o AMTAC-06,

sugere que o composto pode estar atuando como um antimetabólito (JONES; OCEN, 2020), semelhante ao mecanismo também caracterizado para outros acridínicos (FU et al., 2017; HAIDER et al., 2019) ou agentes que danificam o DNA (DE ALMEIDA et al., 2017). De fato, Gouveia e colaboradores (2018) mostraram anteriormente que o composto AMTAC-06 é capaz de se ligar ao DNA e inibir a atividade da enzima topoisomerase II α , o que possivelmente poderia explicar o acúmulo de células observado na fase S.

Tendo em vista os dados sugestivos relacionados ao aumento de sub-G1 e, considerando que muitos fármacos anticâncer induzem a morte em células tumorais através da ativação da apoptose (CARNEIRO; EL-DEIRY, 2020; PISTRITTO et al., 2016), foi avaliado se o AMTAC-06 atuaria por meio deste mecanismo. As células HCT-116 tratadas com AMTAC-06 e duplamente marcadas com laranja de acridina e iodeto de propídeo exibiram características morfológicas típicas da apoptose, tais como a condensação da cromatina, fragmentação nuclear, formação de corpos apoptóticos e *blebs* na membrana. O efeito apoptótico também foi observado nas análises de citometria de fluxo, por meio do aumento de células marcadas apenas com Anexina V, evidenciando a externalização da fosfatidilserina, que representa um dos primeiros eventos quando esse mecanismo de morte celular é ativado (MAJTNEROVÁ; ROUŠAR, 2018; SARASTE; PULKKI, 2000), bem como o aumento de células duplamente marcadas com Anexina V e iodeto de propídeo, o que indica células em apoptose tardia ou necrose (CROWLEY et al., 2016; DARZYNKIEWICZ; BEDNER; SMOLEWSKI, 2001; HEO et al., 2019; KABAŁA-DZIK et al., 2017)(CROWLEY et al., 2016). Assim, os dados morfológicos e bioquímicos em conjunto sugerem que o efeito citotóxico do AMTAC-06 envolve a indução de apoptose.

A literatura relata a potencialidade dos acridínicos como agentes indutores da apoptose em diferentes linhagens tumorais. O derivado acridínico LS-1-10 foi capaz de induzir a apoptose em células de adenocarcinoma colorretal (DLD-1) após 48 horas de tratamento (FU et al., 2017), enquanto uma nova série de derivados da *N*-fenilbenzamida-4-metilamina (ZHANG et al., 2019) e da tetrahidroacridina (GIREK et al., 2019) causaram apoptose em células de leucemia linfocítica aguda (CCRF-CEM) (ZHANG et al., 2019) e em linhagens de câncer colorretal (HT-29) e de pulmão (A549) (GIREK et al.,

2019), após 48 e 24 horas de exposição, respectivamente. Borowa-Mazgaj e colaboradores (2017) também observaram que um novo composto acridínico (C-1748) promoveu alterações morfológicas características da apoptose em linhagens celulares de adenocarcinoma pancreático humano (Panc-1 e MiaPaCa-2), tais como a condensação da cromatina, encolhimento celular e formação de corpos apoptóticos (BOROWA-MAZGAJ et al., 2017).

Prosseguindo os ensaios, foi investigado se o tratamento com o AMTAC-06 poderia alterar os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) celulares. Muitos antineoplásicos induzem a morte das células tumorais por meio do aumento na produção de EROs associado ao estresse oxidativo (HUANG; PAN, 2020; KASIAPPAN; SAFE, 2016; LI et al., 2020). Todavia, estudos apontam que as EROs desempenham um papel crucial na sobrevivência, proliferação e invasividade das células tumorais, atuando em todas as fases da carcinogênese (AGGARWAL et al., 2019; BABU; TAY, 2019). Neste trabalho, a exposição ao AMTAC-06 promoveu uma significativa diminuição nos níveis de EROs, sugerindo que este composto possui propriedades antioxidantes, efeito que é relatado na literatura para alguns acridínicos (HAIDER et al., 2019; KALIRAJAN et al., 2012).

Em contrapartida, o mecanismo de ação de outros derivados dessa classe de compostos estaria associado ao aumento na produção de EROs e indução de estresse oxidativo, como relatado em estudos *in vitro* realizados com a linhagem HCT-116 (CHEN et al., 2015) e em células de linfoma histiocítico humano (U937) (HUANG et al., 2017a). O resultado obtido para o AMTAC-06 é promissor, uma vez que o tratamento com antioxidantes tem sido uma abordagem terapêutica emergente na terapia anticâncer (AMMAR et al., 2020; GEORGE; ABRAHAMSE, 2020; GOODMAN et al., 2011; GOTHAI et al., 2018; MARTÍN; GOYA; RAMOS, 2016; MONTANÉ et al., 2020; THYAGARAJAN; SAHU, 2018).

A partir dos dados preliminares obtidos pode-se inferir que o AMTAC-06 apresenta atividade antitumoral *in vitro*, com maior efeito na linhagem de câncer colorretal HCT-116. Esta atividade possivelmente está associada à sua ação antioxidante, bem como à interferência no ciclo celular e indução de mecanismos apoptóticos.

A próxima etapa deste estudo avaliou o perfil de toxicidade, bem como investigou a atividade antitumoral *in vivo* do AMTAC-06.

O peixe-zebra (*Danio rerio*) tem sido um modelo experimental emergente, usado em muitos campos da pesquisa farmacológica, incluindo em estudos de toxicologia e em triagens de novas drogas com potencial terapêutico (CABALLERO; CANDIRACCI, 2018; CASSAR et al., 2020; GEHRIG; PANDEY; WESTHOFF, 2018; LEE et al., 2017b; VAZ; OUTEIRO; FERREIRA, 2018). Embriões e larvas de peixe-zebra se destacam como um modelo altamente eficaz em ensaios de toxicidade, pois compartilham diversos genes conservados em humanos (HOWE et al., 2013). Além disso, a distribuição, metabolismo e excreção de drogas também podem ser avaliados neste organismo, o que tem incentivado seu uso (MACRAE; PETERSON, 2015).

Sendo assim, para avaliação toxicológica inicialmente procedeu-se com a realização do teste de toxicidade aguda em embriões de peixes (teste FET), utilizando o modelo de peixe-zebra (*Danio rerio*), conforme orientações do guia nº 236/2013 da OECD (OECD, 2013). Para investigar os efeitos embriotoxicológicos do AMTAC-06 neste modelo experimental, utilizou-se uma concentração 10 vezes maior que a Cl_{50} (72 horas) obtida em HCT-116, a linhagem tumoral em que o AMTAC-06 apresentou a melhor atividade antitumoral *in vitro*. Portanto, esta abordagem propôs a realização de um teste limite que pudesse fornecer resultados mais concretos a respeito da toxicidade deste composto. Considerando que o AMTAC-06 não induziu mortalidade ou alterações morfológicas nos embriões e larvas de peixe-zebra, e que sua Cl_{50} foi estimada como sendo maior que 126,2 μ M (10x o valor da Cl_{50} em HCT-116), pode-se inferir que este composto apresentou baixa toxicidade aguda.

Lisboa e colaboradores (2019) mostraram que o composto acridínico ACS03 não causou mortalidade em embriões e larvas de peixe-zebra, no entanto, diferente do AMTAC-06, esta molécula induziu alterações morfológicas, como deformação da coluna vertebral, redução no comprimento larval e edema pericárdico, em concentrações 5 vezes maiores que a Cl_{50} obtida *in vitro* na linhagem HCT-116 (LISBOA et al., 2019). Alguns estudos têm relatado a conservação de respostas farmacológicas entre humanos e peixe-zebra (MILAN et al., 2003; PATTON; TOBIN, 2019; PHILLIPS; WESTERFIELD,

2014; SALEEM; KANNAN, 2018; SCHWERTE; PELSTER, 2000), sugerindo uma alta correlação direta com os resultados experimentais obtidos nestes organismos.

A seguir, foi realizada a avaliação da toxicidade não clínica aguda em camundongos para determinar doses seguras a serem usadas em testes farmacológicos *in vivo*. Nesta perspectiva, foi utilizado o guia nº 423 da OECD (2001) que fornece importantes diretrizes necessárias para garantir a reproduzibilidade dos experimentos, o uso racional de animais, bem como classificar novos compostos de maneira semelhante a outros métodos de investigação da toxicidade aguda (OECD, 2001). A dose inicial escolhida foi de 2000 mg/kg, pois estudos anteriores de toxicidade não clínica aguda com derivados acridínicos indicaram um baixo nível de toxicidade (BATISTA, 2019; MANGUEIRA et al., 2017).

No grupo tratado foram observadas algumas mudanças comportamentais típicas de drogas que causam efeitos depressores no sistema nervoso central (DE ALMEIDA et al., 1999), no entanto, estes efeitos não foram considerados clinicamente relevantes, pois foram transitórios, sendo revertidos até a primeira hora após a administração da substância. Alterações comportamentais semelhantes foram produzidas pelo derivado acridínico ACS-AZ10 (MANGUEIRA et al., 2017). Considerando que não houve morte dos animais durante os 14 dias de tratamento e, que a DL_{50} do AMTAC-06 foi estimada em cerca de 5000 mg/kg (como preconizado pelo presente guia da OECD), pode-se inferir que o AMTAC-06 apresentou baixa toxicidade aguda em camundongos. A DL_{50} é um parâmetro importante a ser avaliado, pois, geralmente, se a substância apresentar uma DL_{50} três vezes maior que a dose mínima efetiva é considerada uma boa candidata a novos estudos (AMELO; NAGPAL; MAKONNEN, 2014). A baixa toxicidade aguda do AMTAC-06 corrobora os resultados obtidos com outros compostos acridínicos (LISBOA et al., 2019; MANGUEIRA et al., 2017; SOUSA, 2019) e espiro-acridínicos (BATISTA, 2019; SILVA et al., 2019). Por outro lado, alguns análogos acridínicos apresentam um perfil de alta toxicidade aguda (HORNEDO; VAN ECHO, 1985; PAN et al., 2006, 2007).

Posteriormente, o potencial genotóxico do AMTAC-06 também foi investigado. Existem várias metodologias para avaliação da genotoxicidade de

um composto, entre elas destaca-se o ensaio do micronúcleo, que avalia a indução de alterações cromossômicas em sangue periférico de roedores (HAYASHI, 2016). O micronúcleo é um pequeno corpo de cromatina extranuclear, localizado no citoplasma celular e formado em decorrência da não incorporação de um cromossomo inteiro, ou fragmentos deste, nos núcleos das células filhas durante a divisão celular (TOBÓLSKA et al., 2018). Desta forma, um aumento na frequência de micronúcleos detectados representa um indicativo da ocorrência de eventos genotóxicos em consequência de danos cromossômicos ou no aparelho mitótico (HAYASHI, 2016).

O tratamento com AMTAC-06 (2000 mg/kg; i.p.) não aumentou o número de eritrócitos micronucleados, sugerindo que este composto não induziu genotoxicidade *in vivo* nas condições experimentais avaliadas. Os derivados acridínicos AMTAC-07 (2000 mg/kg, i.p.) (BATISTA, 2019), ACMD (300 mg/kg, i.p.) (SOUSA, 2019) e ACS-AZ10 (2000 mg/kg, i.p.) (MANGUEIRA et al., 2017) também não apresentaram genotoxicidade em sangue periférico de camundongos, quando avaliados pelo ensaio do micronúcleo. Em contraste, é relatado que outros acridínicos, entre eles a própria Amsacrina, são potencialmente mutagênicos e genotóxicos para células saudáveis (ATTIA, 2013; DI GIORGIO et al., 2008, 2011).

Considerando a baixa toxicidade do AMTAC-06, o seguinte passo foi avaliar a sua atividade antitumoral *in vivo*, em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich. Este modelo experimental tem sido utilizado há muitos anos nas triagens de moléculas com atividade antitumoral considerando que, após a inoculação intraperitoneal nos camundongos, ocorre a produção de uma alta densidade de células, o que permite avaliar diversos parâmetros (FERNANDES et al., 2015; FERREIRA et al., 2020; LISBOA et al., 2019; MANGUEIRA et al., 2017; OZASLAN et al., 2011; SANTOS et al., 2018).

O tratamento com AMTAC-06, por sete dias consecutivos, reduziu significativamente a viabilidade e total celular nas doses de 6,25, 12,5 e 25 mg/kg, embora apenas a dose de 25 mg/kg tenha sido capaz de reduzir significativamente a massa e o volume tumoral, revertendo, neste último caso, a ascite peritoneal induzida pelo tumor. No entanto, apesar de exercer o efeito farmacológico máximo na dose de 25 mg/kg, inclusive de maneira similar à droga padrão 5-FU, esta dose não poderia ser escolhida para a caracterização

do efeito antitumoral do AMTAC-06, uma vez que não foram obtidas células tumorais no fluido ascítico em quantidade adequada para as análises posteriores, impossibilitando novos ensaios. Considerando que foram observadas diferenças significativas nos parâmetros alterados (viabilidade e total celular) entre as doses de 6,25 e 12,5 mg/kg, esta última foi selecionada para investigar os possíveis mecanismos antitumorais do AMTAC-06.

Dados da literatura mostram que outros derivados acridínicos apresentam atividade antitumoral *in vivo* (KUKOWSKA, 2017), inclusive no modelo de CAE (LISBOA et al., 2019; MANGUEIRA et al., 2017), porém, o primeiro relato de atividade antitumoral *in vivo* de um derivado espiro-acridínico foi publicado recentemente por nosso grupo de pesquisa (SILVA et al., 2019), o que justifica a caracterização dos efeitos antitumorais destes compostos na busca de potenciais agentes antineoplásicos.

Então, o estudo *in vivo* prosseguiu com a avaliação do efeito do AMTAC-06 sobre o ciclo celular. De forma semelhante ao observado nos ensaios *in vitro*, em modelo de tumor de Ehrlich os dados para o AMTAC-06 sugerem a indução de morte celular por apoptose, uma vez que foi observado um aumento na fração sub-G1. Esses dados corroboram estudos realizados com outros acridínicos, *in vitro* nas linhagens celulares de câncer colorretal (FU et al., 2017) e de pâncreas (BOROWA-MAZGAJ et al., 2017), assim como *in vivo* com o espiro-acridínico AMTAC-17, em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich (SILVA et al., 2019). Portanto, a indução da apoptose é relatada como um dos mecanismos antitumorais de compostos acridínicos (FU et al., 2017; ZHOU et al., 2018).

Como esperado, a droga padrão 5-fluorouracil (5-FU) também induziu um aumento em sub-G1, enquanto reduziu a distribuição de células em todas as fases do ciclo celular. O 5-FU é um agente antimetabólico, utilizado na clínica de forma isolada ou em combinação com outros quimioterápicos no tratamento de diversos tumores sólidos, incluindo câncer de mama, colorretal, estômago, pâncreas, cabeça e pescoço (THOMAS et al., 2016). Esta droga é convertida intracelularmente em metabólitos ativos que são incorporados ao DNA ou RNA e inibem a enzima timidilato sintase (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003). O bloqueio desta enzima resulta na indução de danos e inibição da síntese do DNA; parada do ciclo celular; indução da apoptose e

autofagia (DAI et al., 2018; FOCACCETTI et al., 2015; LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003; LOPES-COSTA et al., 2017; PONCE-CUSI; CALAF, 2016).

Além do ciclo celular, outros mecanismos podem estar envolvidos na atividade antitumoral de compostos acridínicos. A angiogênese, processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, desempenha um papel fundamental na sustentação do crescimento e metástase tumoral (YEHYA et al., 2018). Atualmente, a terapia antiangiogênica representa uma estratégia promissora para o tratamento do câncer e vários agentes tem surgido na clínica (AL-ABD et al., 2017; LI et al., 2018; LUPO et al., 2017).

Considerando a redução significativa da microdensidade dos vasos peritumorais observada nos camundongos tratados com AMTAC-06, pode-se sugerir que o efeito antitumoral desta molécula envolve uma ação antiangiogênica, entretanto, outros ensaios precisam ser realizados para investigar quais seriam os prováveis alvos moleculares envolvidos nesta atividade. Efeito similar foi observado no grupo tratado com a droga padrão 5-FU, que apresenta atividade antiangiogênica já relatada (ALBERTSSON; LENNERNS; NORRBY, 2009; BASAKI et al., 2001). Os dados obtidos corroboram outros estudos na literatura que mostram a ação antiangiogênica de acridínicos (MANGUEIRA et al., 2017; SATAPATHY et al., 2018). Silva e colaboradores (2019) também mostraram o efeito antiangiogênico do espiro-acridínico AMTAC-17 *in vivo* em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich (SILVA et al., 2019).

O microambiente tumoral consiste em elementos celulares e não celulares que estabelecem uma complexa rede de interações com células tumorais (BELLI et al., 2018). Sabe-se que esses componentes podem produzir vários mediadores inflamatórios, tais como quimiocinas, citocinas e outros fatores, que estão diretamente envolvidos em diferentes estágios da progressão tumoral, incluindo na modulação da angiogênese (YEHYA et al., 2018). Partindo desse pressuposto, decidiu-se investigar se o efeito antitumoral do AMTAC-06 envolveria uma modulação no perfil de citocinas do microambiente tumoral.

Os dados mostraram que o tratamento com AMTAC-06 aumentou os níveis das citocinas TNF- α e IL-1 β , enquanto reduziu IFN- γ . O papel dual e

oposto dessas citocinas na resposta tumoral é bem discutido na literatura (BAKER; HOUSTON; BRINT, 2019; MONTFORT et al., 2019; NI; LU, 2018). TNF- α e IL-1 β são citocinas pleiotrópicas envolvidas na inflamação e modulação do sistema imunológico para um perfil citotóxico Th1 (BELLI et al., 2018). Dependendo do microambiente, TNF- α pode atuar inibindo a progressão do tumor, principalmente por induzir a morte celular e recrutar outras células do sistema imunológico que desencadeiam respostas citotóxicas (JOSEPHS et al., 2018; MONTFORT et al., 2019; YUAN et al., 2018). IL-1 β estimula o recrutamento e ativação de células efetoras da imunidade inata e adaptativa, tais como os macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e os linfócitos T, promovendo respostas inflamatórias ou ativando a apoptose, mecanismos que auxiliam na eliminação das células tumorais (BAKER; HOUSTON; BRINT, 2019; CASTAÑO et al., 2018; SHEN et al., 2017).

Com relação ao IFN- γ , apesar de evidências relatando seu papel na vigilância imunológica contra o câncer, dados recentes mostram que, dependendo do microambiente tumoral, esta citocina pode desempenhar uma atividade pró-tumoral (CASTRO et al., 2018; JORGOVANOVIC et al., 2020; NI; LU, 2018; SHIME et al., 2017).

Considerando o que foi discutido, sugere-se que o efeito antitumoral e citotóxico do AMTAC-06 pode estar relacionado com a modulação de respostas inflamatórias mediadas por estas citocinas.

Dados relacionados à indução de imunomodulação por compostos acridínicos são escassos na literatura. Porém, recentemente, foi demonstrado que a quinacrina, um composto aminoacridina, modulou a ação do TNF- α , sensibilizando células de adenocarcinoma de pulmão à ação desta citocina *in vitro* (HARADA et al., 2017). Além disso, de forma semelhante aos resultados obtidos, o tratamento com o composto espiro-acridínico AMTAC-17 induziu um aumento nos níveis das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-12, *in vivo* em células de carcinoma ascítico de Ehrlich (SILVA et al., 2019).

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pode estar envolvida na ação de determinadas citocinas, além disso, sabe-se que estes mediadores desempenham um papel vital em todas as fases da carcinogênese, podendo promover ou inibir o crescimento tumoral, dependendo dos sinais estimulantes (DONG; LIU, 2016; RECZEK; CHANDEL, 2017). Desta forma foi

avaliado se o tratamento com o AMTAC-06 induziria alterações nos níveis destas moléculas. No estudo *in vivo*, AMTAC-06 não causou alterações nos níveis de EROs e, portanto, pode-se inferir que a modulação do estresse oxidativo não está envolvida com a ação deste composto. Resultados semelhantes foram obtidos para o derivado espiro-acridínico AMTAC-07, em células de Ehrlich (BATISTA, 2019). Em contrapartida, a literatura relata que a Amsacrina atua induzindo aumento de EROs, ativando vias celulares que culminam com a diminuição da invasividade celular tumoral (LIU et al., 2014a).

Após o estudo do efeito antitumoral do AMTAC-06 *in vivo*, prosseguiu-se com a investigação da toxicidade em camundongos, após o tratamento de sete dias com AMTAC-06 (12,5 mg/kg, i.p.). Inicialmente foi avaliado o consumo de água, ração e evolução ponderal. Não houve alteração significativa em nenhum destes parâmetros avaliados nos grupos tratados com AMTAC-06. Os resultados obtidos são relevantes, pois sabe-se que entre as limitações apresentadas pelo uso de quimioterápicos, estão os efeitos colaterais decorrentes da baixa seletividade destas drogas frente às células tumorais (SMITH; PREWETT, 2017). Consequentemente, algumas drogas podem ocasionar distúrbios gastrointestinais que alteram o estado nutricional dos indivíduos levando à perda de peso, desnutrição ou mesmo anorexia (BOUSSIOS et al., 2012; NICOLINI et al., 2013; TONG; ISENRING; YATES, 2009). Logo, o AMTAC-06 não apresentou os efeitos adversos relacionados às drogas antitumorais que provocam toxicidade gastrointestinal (ESCALANTE et al., 2017).

Os quimioterápicos também podem desencadear alterações no tamanho dos órgãos dos indivíduos em tratamento, logo a avaliação dos efeitos destes agentes em órgãos vitais é um marcador importante para predizer a toxicidade de um candidato a fármaco (EL CHEDIAK et al., 2018; SHARMA et al., 2014). Neste estudo, a análise do índice dos órgãos (coração, fígado, rins, baço e timo) dos camundongos não evidenciou alterações nos órgãos avaliados, após sete dias de tratamento com AMTAC-06. De forma semelhante, o derivado acridínico AMTAC-07 não alterou os índices destes órgãos (BATISTA, 2019). Por outro lado, os acridínicos ACS-AZ10 (MANGUEIRA et al., 2017) e ACMD (SOUSA, 2019) induziram aumento nos índices do coração e baço, respectivamente.

Além dos efeitos colaterais anteriormente mencionados, o tratamento quimioterápico pode afetar as células provenientes da medula óssea dos indivíduos, causando mielossupressão (SMITH; PREWETT, 2017). A toxicidade hematológica geralmente resulta na descontinuação do tratamento, o que pode comprometer o resultado final ou levar o indivíduo a óbito (OYANG; PENG; DHAKAL, 2013; SHAHRASBI et al., 2017). Neste contexto, os efeitos da toxicidade sistêmica de drogas podem ser avaliados pela análise do eritrograma (inclui a avaliação morfológica e contagem total dos eritrócitos, a dosagem de hemoglobina e a determinação do hematócrito) e leucograma (inclui a contagem total de leucócitos e diferencial de seus subtipos celulares) (ARIKA et al., 2016a).

O tratamento com o AMTAC-06 não provocou alterações em nenhum dos parâmetros hematológicos avaliados em relação ao controle transplantado. Por outro lado, quando comparado ao grupo sadio, ocorreram alterações nos parâmetros CHCM (concentração hemoglobínica corporcular média), VCM (volume corporcular médio) e no percentual de neutrófilos. Pode-se inferir que o aumento de CHCM e dos neutrófilos não é decorrente do tratamento com AMTAC-06, já que este efeito também foi observado nos animais do grupo controle transplantado, sugerindo que estariam relacionados com o implante e desenvolvimento do tumor. Por outro lado, a redução no VCM não possui significado clínico, pois o valor alterado encontra-se dentro da normalidade dos valores de referência (45,00–55,00 fm³) estabelecidos para esta espécie (GAD, 2007).

Estes resultados sugerem que AMTAC-06 não induz mielotoxicidade em modelo de CAE. Dados sobre a toxicidade hematológica de derivados acridínicos são escassos. Todavia, outros acridínicos apresentaram efeito mielossupressor, a exemplo do ACMD, que causou redução na concentração de hemoglobina e do hematócrito (SOUZA, 2019), enquanto que o ACS-AZ10 alterou o percentual de neutrófilos e linfócitos (MANGUEIRA et al., 2017).

A estimativa de alguns parâmetros bioquímicos, tais como a avaliação da atividade de enzimas nos fluidos corporais, desempenha um papel importante na investigação toxicológica (CAMPION et al., 2013). O fígado e rins são órgãos fundamentais no organismo, exercendo, entre outras funções, a detoxificação e eliminação de substâncias nocivas (MOURA et al., 2016).

Muitos quimioterápicos causam hepatotoxicidade e nefrotoxicidade, a exemplo da cisplatina e metotrexato, que afetam as funções hepáticas e renais, respectivamente (DOS SANTOS et al., 2012; GRIGORIAN; BRIEN, 2014). Nesta perspectiva, para avaliar a toxicidade renal e hepática do AMTAC-06, utilizou-se como parâmetros os níveis de ureia e creatinina (avaliação da toxicidade renal), e as enzimas AST e ALT (avaliação da toxicidade hepática). Estes indicadores são comumente encontrados em níveis elevados no plasma ou soro de indivíduos que apresentam disfunções nestes orgãos (ARIKA et al., 2016b; KIM; MOON, 2012).

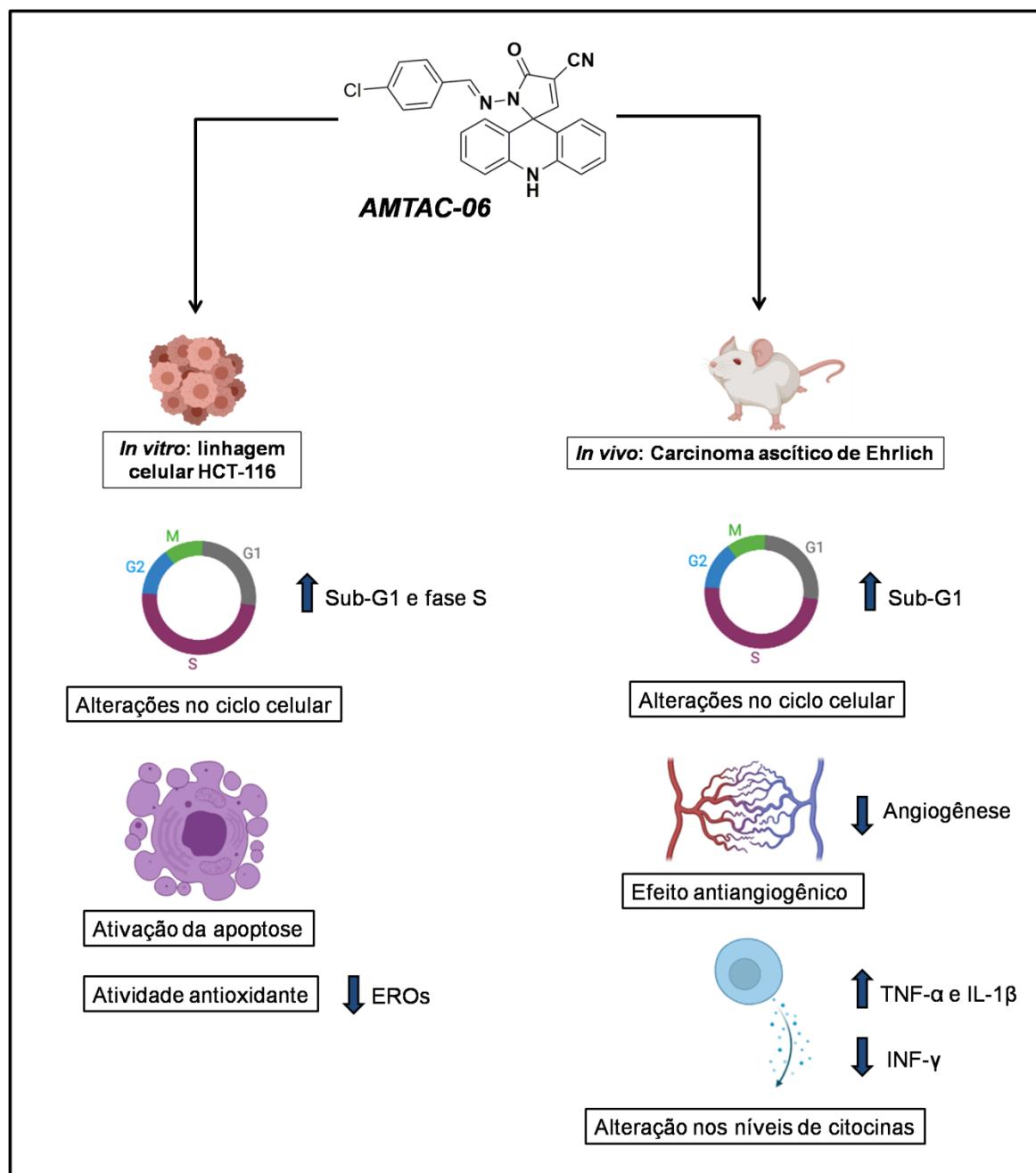
O tratamento com AMTAC-06 não foi capaz de alterar a concentração das enzimas hepáticas AST e ALT, sugerindo que este composto não induz dano hepático nas condições avaliadas. Esse resultado é corroborado quando se considera as análises histológicas do fígado dos animais submetidos ao tratamento, a qual evidenciou poucas alterações e de natureza reversível. Neste sentido, a presença de esteatose hepática, observada nos animais tratados com AMTAC-06, possivelmente está associada ao implante do tumor e não ao tratamento, já que este efeito também foi observado nos animais do grupo controle transplantado. A presença de alguns hepatócitos necrosados e de moderado infiltrado linfoplasmocitário também foi observado no grupo tratado com a substância teste, mas, por ser um achado discreto não possui relevância clínica. Em contrapartida, o acridínico Bis(7)-tacrine, foi potencialmente hepatotóxico para camundongos tratados, induzindo um aumento significativo nos níveis de AST e ALT (PAN et al., 2007).

Considerando as funções renais, AMTAC-06 não induziu alterações nas concentrações séricas de ureia e creatinina. Complementando os dados bioquímicos, as análises histológicas dos rins dos animais tratados não evidenciaram alterações morfológicas que remetem a danos renais. Todavia, o acridínico ACMD aumentou as concentrações de ureia e creatinina em animais transplantados com CAE, sugerindo dano renal (SOUZA, 2019).

A droga padrão 5-FU promoveu alterações nos níveis de parâmetros que indicam toxicidade hematológica (VCM, HCM, CHCM, leucócitos, neutrófilos e monócitos) e hepática (AST e ALT), como já descrito na literatura (ALESSANDRINO et al., 2019; PAPANASTASOPOULOS; STEBBING, 2014).

Diante dos resultados obtidos, o presente estudo demonstra que o espiro-acridínico AMTAC-06 possui baixa toxicidade não clínica e significativa atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* (Figura 16), sendo um composto promissor para futuros estudos no que se refere à seleção de novos candidatos à fármacos antitumorais.

Figura 16 - Mecanismo de ação proposto para o composto AMTAC-06



Fonte: DUARTE, 2021. Criado em BioRender.com

Conclusão

7 CONCLUSÃO

Baseado nos estudos realizados é possível concluir que os novos derivados espiro-acridínicos apresentam citotoxicidade para as células tumorais humanas testadas na triagem farmacológica, destacando-se entre eles o (E)-1'-((4-clorobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-diidro-10H espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-06), que:

- Apresenta citotoxicidade para as células tumorais e não tumorais humanas avaliadas *in vitro*;
- Possui seletividade para células tumorais HCT-116, superior à droga padrão doxorrubicina;
- Induziu efeito antitumoral *in vitro*, com maior atividade na linhagem de carcinoma colorretal humano (HCT-116), associado à alterações na distribuição de células no ciclo celular, ativação da apoptose e ação antioxidante;
- Exibe baixa toxicidade não clínica aguda em camundongos e em embriões/larvas de peixe-zebra (*Danio rerio*);
- Não causou genotoxicidade em camundongos, quando avaliado pelo teste de micronúcleo em sangue periférico;
- Apresenta atividade antitumoral *in vivo* em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich, por interferir no ciclo celular, sugerindo indução da apoptose, e atuar com ação antiangiogênica e imunomoduladora;
- Exibe baixa toxicidade *in vivo*, em animais transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich e submetidos ao tratamento por sete dias consecutivos, considerando o índice dos órgãos, consumo de água e reação, parâmetros hematológicos, bioquímicos e histológicos.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Z; REHMAN, S. An Overview of Cancer Treatment Modalities. In: Hafiz Naveed Shahzad (eds.), **Neoplasm**, p. 139–157, 2018
- ABBOTT, M.; USTOYEV, Y. Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 35, n. 5, 2019.
- ABIKO, K. et al. IFN- γ from lymphocytes induces PD-L1 expression and promotes progression of ovarian cancer. **British Journal of Cancer**, v. 112, n. 9, p. 1501–1509, 2015.
- ADAN, A.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Current Pharmaceutical Pharmaceutical Biotechnology**, v. 17, n. 14, p. 1213–1221, 2016.
- ADAN, A. et al. Flow cytometry: basic principles and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 163–176, 2017.
- AGGARWAL, B. B. Signalling pathways of the TNF superfamily: A double-edged sword. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 9, p. 745–756, 2003.
- AGGARWAL, B. B. et al. Inflammation and cancer: How hot is the link? **Biochemical Pharmacology**, v. 72, n. 11, p. 1605–1621, 2006.
- AGGARWAL, V. et al. Role of reactive oxygen species in cancer progression: Molecular mechanisms and recent advancements. **Biomolecules**, v. 9, n. 11, 2019.
- AGRAWAL, S. S. et al. Cytotoxic and antitumor effects of brucine on Ehrlich ascites tumor and human cancer cell line. **Life Sciences**, v. 89, n. 5–6, p. 147–158, 2011.
- AHMED, M. Colon Cancer: A Clinician's Perspective in 2019. **Gastroenterology Research**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2020.
- AL-ABD, A. M. et al. Anti-angiogenic agents for the treatment of solid tumors: Potential pathways, therapy and current strategies – A review. **Journal of Advanced Research**, v. 8, n. 6, p. 591–605, 2017.
- ALBERTSSON, P.; LENNERNS, B.; NORRBY, K. Low-dose continuous 5-fluorouracil infusion stimulates VEGF-A-mediated angiogenesis. **Acta Oncologica**, v. 48, n. 3, p. 418–425, 2009.
- ALESSANDRINO, F. et al. 5-Fluorouracil induced liver toxicity in patients with colorectal cancer: role of computed tomography texture analysis as a potential biomarker. **Abdominal Radiology**, v. 44, n. 9, p. 3099–3106, 2019.
- ALFAROUK, K. O. et al. Resistance to cancer chemotherapy: Failure in drug

response from ADME to P-gp. **Cancer Cell International**, v. 15, n. 1, p. 1–13, 2015.

ÁLVAREZ-QUILÓN, A. et al. ATM specifically mediates repair of double-strand breaks with blocked DNA ends. **Nature Communications**, v. 5, p. 1–10, 2014.

AMELO, W.; NAGPAL, P.; MAKONNEN, E. Antiplasmodial activity of solvent fractions of methanolic root extract of *Dodonaea angustifolia* in *Plasmodium berghei* infected mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 1–7, 2014.

AMMAR, H. O. et al. Antioxidants in cancer therapy: Recent trends in application of nanotechnology for enhanced delivery. **Scientia Pharmaceutica**, v. 88, n. 1, 2020.

ARIKA, W.M. et al. Hematological Markers of *In Vivo* Toxicity. **Journal of Hematology & Thromboembolic Diseases**, v. 04, n. 02, 2016a.

ARIKA, W.M. et al. Biochemical Markers of *In Vivo* Hepatotoxicity. **Journal of Clinical Toxicology**, v. 06, n. 02, 2016b.

ASADZADEH, Z. et al. The paradox of Th17 cell functions in tumor immunity. **Cellular Immunology**, v. 322, n. October, p. 15–25, 2017.

ASTASHKINA, A.; MANN, B.; GRAINGER, D. W. A critical evaluation of *in vitro* cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 134, n. 1, p. 82–106, 2012.

ATTIA, S. M. Molecular cytogenetic evaluation of the mechanism of genotoxic potential of amsacrine and nocodazole in mouse bone marrow cells. **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, n. 6, p. 426–433, 2013.

BABU, K. R.; TAY, Y. The Yin-Yang regulation of reactive oxygen species and microRNAs in cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 21, 2019.

BAKER, K. J.; HOUSTON, A.; BRINT, E. IL-1 Family Members in Cancer; Two Sides to Every Story. **Frontiers in immunology**, v. 10, n. June, p. 1197, 2019.

BALKWILL, F. TNF- α in promotion and progression of cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 25, n. 3, p. 409–416, 2006.

BALUK, P.; HASHIZUME, H.; MCDONALD, D. M. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 15, n. 1, p. 102–111, 2005.

BAMBINO, K.; CHU, J. Zebrafish in Toxicology and Environmental Health. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 124, n. August, p. 331–367, 2017.

BANZOLA, I. et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase induced by IFN-

γ and TNF- α as potential biomarker of prostate cancer progression. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. MAY, 2018.

BARROS, F. W. A. et al. Synthesis and cytotoxic activity of new acridine-thiazolidine derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 11, p. 3533–3539, 2012.

BARROS, F. W. A. et al. Inhibition of DNA topoisomerase I activity and induction of apoptosis by thiazacridine derivatives. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 268, n. 1, p. 37–46, 2013.

BARTEK, J.; LUKAS, J. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. **Cancer Cell**, v. 3, n. 5, p. 421–429, 2003.

BASAKI, Y. et al. γ -Hydroxybutyric acid and 5-fluorouracil, metabolites of UFT, inhibit the angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor. **Angiogenesis**, v. 4, n. 3, p. 163–173, 2001.

BATISTA, T. M. Toxicidade e atividade antitumoral do derivado acridínico (E)-1’-{(4-flúorobenzilideno)-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.

BAXTER, E. et al. Epigenetic regulation in cancer progression. **Cell and Bioscience**, v. 4, n. 1, p. 1–11, 2014.

BELLI, C. et al. Targeting the microenvironment in solid tumors. **Cancer Treatment Reviews**, v. 65, p. 22–32, 2018.

BENT, R. et al. Interleukin-1 beta—A friend or foe in malignancies? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 8, 2018.

BERGERS, G.; BENJAMIN, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 6, p. 401–410, 2003.

BERRAONDO, P. et al. Revisiting interleukin-12 as a cancer immunotherapy agent. **Clinical Cancer Research**, v. 24, n. 12, p. 2716–2718, 2018.

BERTOLI, C.; SKOTHEIM, J. M.; BRUIN, R. A. M. DE. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases Cosetta. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 8, p. 518–528, 2015.

BESERRA SANTOS, L. K. et al. Assessment of *in Vitro* Anti-melanoma Potential of *Ephedranthus pisocarpus* R.E.Fr. **Anticancer Research**, v. 40, n. 9, p. 5015–5024, 2020.

BEVIS, B. J.; GLICK, B. S. Rapidly maturing variants of the Discosoma red fluorescent protein (DsRed). **Nature biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 83–7, 2002.

BHATTACHARYYA, A. et al. Oxidative stress: An essential factor in the

- pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 2, p. 329–354, 2014.
- BIELENBERG, D. R.; ZETTER, B. R. The Contribution of Angiogenesis to the Process of Metastasis. **Cancer Journal (United States)**, v. 21, n. 4, p. 267–273, 2015.
- BILSKA, M. et al. Th17 Cells and IL-17 As Novel Immune Targets in Ovarian Cancer Therapy. **Journal of Oncology**, v. 2020, 2020.
- BLACKADAR, C. B. Historical review of the causes of cancer. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 7, n. 1, p. 54–86, 2016.
- BOROWA-MAZGAJ, B. et al. The overexpression of CPR and P450 3A4 in pancreatic cancer cells changes the metabolic profile and increases the cytotoxicity and pro-apoptotic activity of acridine antitumor agent, C-1748. **Biochemical Pharmacology**, v. 142, p. 21–38, 2017.
- BOUSSIOS, S. et al. Systemic treatment-induced gastrointestinal toxicity: Incidence, clinical presentation and management. **Annals of Gastroenterology**, v. 25, n. 2, p. 106–118, 2012.
- BOWER, J. J. et al. Patterns of cell cycle checkpoint deregulation associated with intrinsic molecular subtypes of human breast cancer cells. **NPJ Breast Cancer**, v. 3, n. 1, p. 1–9, 2017.
- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.
- BUKOWSKI, K.; KCIUK, M.; KONTEK, R. Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 9, 2020.
- BURKE, P. J. Mitochondria, Bioenergetics and Apoptosis in Cancer. **Trends in Cancer**, v. 3, n. 12, p. 857–870, 2017.
- BURNET, M. Cancer-A Biological Approach I. The Processes Of Control. **British Medical Journal**, v. 1, n. 5022, p. 779–786, 1957.
- CABALLERO, M. V.; CANDIRACCI, M. Zebrafish as Toxicological model for screening and recapitulate human diseases. **Journal of Unexplored Medical Data**, v. 3, n. 2, p. 4, 2018.
- CALMEIRO, J. et al. Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy: The role of human conventional type 1 dendritic cells. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 2, p. 1–20, 2020.
- CALVO, K. R. et al. IL-4 protein expression and basal activation of Erk *in vivo* in follicular lymphoma. **Blood**, v. 112, n. 9, p. 3818–3826, 2008.

- CAMPION, S. et al. The current status of biomarkers for predicting toxicity. **Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology**, v. 9, n. 11, p. 1391–1408, 2013.
- CAMPOS, J. F. et al. Synthesis and *in vitro* anticancer activity of new 2-thioxo-oxazolidin-4-one derivatives. **Pharmacological Reports**, v. 69, n. 4, p. 633–641, 2017.
- CARMI, Y. et al. The Role of IL-1 β in the Early Tumor Cell-Induced Angiogenic Response. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 7, p. 3500–3509, 2013.
- CARNEIRO, B. A.; EL-DEIRY, W. S. Targeting apoptosis in cancer therapy. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 17, n. 7, p. 395–417, 2020.
- CARSWELL, E. A. et al. An endotoxin induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 72, n. 9, p. 3666–3670, 1975.
- CASSAR, S. et al. Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, v. 33, n. 1, p. 95–118, 2020.
- CASTAÑO, Z. et al. IL-1 β inflammatory response driven by primary breast cancer prevents metastasis-initiating cell colonization. **Nature Cell Biology**, v. 20, n. 9, p. 1084–1097, 2018.
- CASTELLS, M. et al. Implication of tumor microenvironment in chemoresistance: Tumor-associated stromal cells protect tumor cells from cell death. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 8, p. 9545–9575, 2012.
- CASTRO, F. et al. Interferon-gamma at the crossroads of tumor immune surveillance or evasion. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. MAY, p. 1–19, 2018.
- CHAI, J.; SHI, Y. Apoptosome and inflammasome: Conserved machineries for caspase activation. **National Science Review**, v. 1, n. 1, p. 101–118, 2014.
- CHANG, S. H. T helper 17 (Th17) cells and interleukin-17 (IL-17) in cancer. **Archives of Pharmacal Research**, 2019.
- CHAPELA, P. J. et al. Cytokine Stimulation of MUC4 Expression in Human Female Reproductive Tissue Carcinoma Cell Lines and Endometrial Cancer. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 116, n. 11, p. 2649–2657, 2015.
- CHARLES, K. A. et al. The tumor-promoting actions of TNF- α involve TNFR1 and IL-17 in ovarian cancer in mice and humans. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 10, p. 3011–3023, 2009.
- CHELOMBITKO, M. A. Role of Reactive Oxygen Species in Inflammation: A Minireview. **Moscow University Biological Sciences Bulletin**, v. 73, n. 4, p. 199–202, 2018.

- CHEN, K. et al. New benzimidazole acridine derivative induces human colon cancer cell apoptosis *in vitro* via the ROS-JNK signaling pathway. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 36, n. 9, p. 1074–1084, 2015.
- CHENG, H. et al. Macrophage polarization in the development and progression of ovarian cancers: An overview. **Frontiers in Oncology**, v. 9, p. 1–11, 2019.
- CHENG, X. et al. Synthesis, characterization and *in vitro* biological evaluation of two matrine derivatives. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018.
- CHOUDHARY, G. S.; AL-HARBI, S.; ALMASAN, A. Caspase-3 Activation Is a Critical Determinant of Genotoxic Stress-Induced Apoptosis. **Apoptosis and Cancer: Methods and Protocols: Second Edition**, v. 1219, p. 1–9, 2014.
- CLAESSON-WELSH, L.; WELSH, M. VEGFA and tumour angiogenesis. **Journal of Internal Medicine**, v. 273, n. 2, p. 114–127, 2013.
- CLEMONS, M.; DANSON, S.; HOWELL, A. Tamoxifen ('Nolvadex'): A review. **Cancer Treatment Reviews**, v. 28, n. 4, p. 165–180, 2002.
- COFFELT, S. B. et al. IL-17-producing γδ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. **Nature**, v. 522, n. 7556, p. 345–348, 2015.
- COMPTON, C. Cancer Initiation, Promotion, and Progression and the Acquisition of Key Behavioral Traits. In: Compton, C (eds). **Cancer: The Enemy from Within: A Comprehensive Textbook of Cancer's Causes, Complexities and Consequences**. Springer, p. 25-48, 2020.
- CONLON, K. C.; MILJKOVIC, M. D.; WALDMANN, T. A. Cytokines in the Treatment of Cancer. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 39, n. 1, p. 6–21, 2019.
- COSSARIZZA, A. et al. Simultaneous analysis of reactive oxygen species and reduced glutathione content in living cells by polychromatic flow cytometry. 2009.
- CRIPPS, J. G. et al. Type 1 T helper cells induce the accumulation of myeloid-derived suppressor cells in the inflamed Tgfb1 knockout mouse liver. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 52, n. 4, p. 1350–1359, 2010.
- CROWLEY, L. C. et al. Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 11, p. 953–957, 2016.
- CURNIS, F.; SACCHI, A.; CORTI, A. Improving chemotherapeutic drug penetration in tumors by vascular targeting and barrier alteration. **Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 4, p. 475–482, 2002.
- D'ARCY, M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell Biology International**, v. 43, n. 6, p. 582–592, 2019.

- DAI, X. Y. et al. Bufalin and 5-fluorouracil synergistically induce apoptosis in colorectal cancer cells. **Oncology Letters**, v. 15, n. 5, p. 8019–8026, 2018.
- DARZYNKIEWICZ, Z.; BEDNER, E.; SMOLEWSKI, P. Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. **Seminars in Hematology**, v. 38, n. 2, p. 179–193, 2001.
- DAY, C. P.; MERLINO, G.; VAN DYKE, T. Preclinical Mouse Cancer Models: A Maze of Opportunities and Challenges. **Cell**, v. 163, n. 1, p. 39–53, 2015.
- DE ALMEIDA, R. N. et al. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacia**, v. 80, n. 3–4, p. 72–76, 1999.
- DE ALMEIDA, S. M. V. et al. Synthesis, DNA binding, and antiproliferative activity of novel acridine-thiosemicarbazone derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 6, p. 13023–13042, 2015.
- DE ALMEIDA, S. M. V. et al. New spiro-acridines: DNA interaction, antiproliferative activity and inhibition of human DNA topoisomerases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 467–475, 2016.
- 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 and Pharmacotherapy**, v. 96, n. November, p. 1538–1556, 2017.
- DE GOOIJER, M. C. et al. The G2 checkpoint—a node-based molecular switch. **FEBS Open Bio**, v. 7, n. 4, p. 439–455, 2017.
- DE LIMA SERAFIM, V. et al. New thiophene–acridine compounds: Synthesis, antileishmanial activity, DNA binding, chemometric, and molecular docking studies. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 91, n. 6, p. 1141–1155, 2018.
- DE OLIVEIRA, P. F. et al. Cytotoxicity screening of essential oils in cancer cell lines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 2, p. 183–188, 2015.
- DEHNE, N. et al. IL-4 reduces the proangiogenic capacity of macrophages by down-regulating HIF-1 translation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 95, n. 1, p. 129–137, 2014.
- DEL VECCHIO, M. et al. Interleukin-12: Biological properties and clinical application. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 16, p. 4677–4685, 2007.
- DELBRIDGE, A. R. D. et al. cancer therapies. **Nature Publishing Group**, v. 16, n. 2, p. 99–109, 2016.
- DEMBIC, Z. The Role and Regulation of the Immune Responses. In: Versteeg- Buschman, L.; Wiliam, H. (eds). **The Cytokines of the Immune System: The Role of Cytokines in Disease Related to Immune Response**. Academic

- Press (Elsevier), 1 st edition, p. 99-122, 2015.
- DICK, F. A.; RUBIN, S. M. Molecular mechanisms underlying RB protein function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 5, p. 297–306, 2013.
- DI GIORGIO, C. et al. DNA-damaging activity and mutagenicity of 16 newly synthesized thiazolo[5,4-a]acridine derivatives with high photo-inducible cytotoxicity. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 650, n. 2, p. 104–114, 2008.
- DI GIORGIO, C. et al. Evaluation of the mutagenic/clastogenic potential of 3,6-di-substituted acridines targeted for anticancer chemotherapy. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 11, p. 2773–2779, 2011.
- DOLADO, I. et al. p38 α MAP Kinase as a Sensor of Reactive Oxygen Species in Tumorigenesis. **Cancer Cell**, v. 11, n. 2, p. 191–205, 2007.
- DOLAI, N. et al. Evaluation of antitumor activity and *in vivo* antioxidant status of *Anthocephalus cadamba* on Ehrlich ascites carcinoma treated mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 3, p. 865–870, 2012.
- DONDOSSOLA, E. et al. Self-targeting of TNF-releasing cancer cells in preclinical models of primary and metastatic tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 8, p. 2223–2228, 2016.
- DONG, J.; LIU, B. Targeting ROS for Cancer Therapy. **Chemotherapy**, v. 05, n. 02, 2016.
- DOS SANTOS, N. A. G. et al. Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: An update. **Archives of Toxicology**, v. 86, n. 8, p. 1233–1250, 2012.
- DU, J. W. et al. Interleukin-17, produced by lymphocytes, promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of breast cancer. **Molecular Medicine Reports**, v. 6, n. 5, p. 1099–1102, 2012.
- DU, Z.; LOVLY, C. M. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. **Molecular Cancer**, v. 17, n. 1, p. 1–13, 2018.
- DUNN, G. P. et al. Cancer immunoediting: From immunosurveillance to tumor escape. **Nature Immunology**, v. 3, n. 11, p. 991–998, 2002.
- DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The Three Es of Cancer Immunoediting. **Annual Review of Immunology**, v. 22, n. 1, p. 329–360, 2004.
- DURONIO, R. J.; XIONG, Y. Signaling pathways that control cell proliferation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 3, 2013.
- DÜSMAN, E. et al. Principais agentes mutagênicos e carcinogênicos de

exposição humana. **SaBios-Revista de saúde e biologia**, v. 7, n. 2, p. 66–81, 2012.

DYSON, N. J. RB1: A prototype tumor suppressor and an enigma. **Genes and Development**, v. 30, n. 13, p. 1492–1502, 2016.

EDIRIWEERA, M. K.; TENNEKOON, K. H.; SAMARAKOON, S. R. *In vitro* assays and techniques utilized in anticancer drug discovery. **Journal of Applied Toxicology**, v. 39, n. 1, p. 38–71, 2019.

EGGERSMANN, T. K. et al. CDK4/6 Inhibitors Expand the Therapeutic Options in Breast Cancer: Palbociclib, Ribociclib and Abemaciclib. **BioDrugs**, v. 33, n. 2, p. 125–135, 2019.

EISENRING, M. et al. IL-12 initiates tumor rejection via lymphoid tissue-inducer cells bearing the natural cytotoxicity receptor NKp46. **Nature Immunology**, v. 11, n. 11, p. 1030–1038, 2010.

EL CHEDIAK, A. et al. Increase in spleen volume as a predictor of oxaliplatin toxicity. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 14, p. 653–657, 2018.

EL SAYED, R. et al. Endocrine and Targeted Therapy for Hormone-Receptor-Positive, HER2-Negative Advanced Breast Cancer: Insights to Sequencing Treatment and Overcoming Resistance Based on Clinical Trials. **Frontiers in Oncology**, v. 9, n. June, 2019.

ELARAJ, D. M. et al. The role of interleukin 1 in growth and metastasis of human cancer xenografts. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 4, p. 1088–1096, 2006.

ELKHAWAGA, O.-A.; GEBRIL, S.; SALAH, N. Evaluation of anti-tumor activity of metformin against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. **Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 6, n. 1, p. 116–123, 2019.

ELLENBROEK, S. I. J.; VAN RHEENEN, J. Imaging hallmarks of cancer in living mice. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 6, p. 406–418, 2014.

ELLIS, L. M. Mechanisms of Action of Bevacizumab as a Component of Therapy for Metastatic Colorectal Cancer. **Seminars in Oncology**, v. 33, n. SUPPL. 10, 2006.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.

EMANUELE, A. A. A. C. R. G. Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde. **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde - Volume 2**, p. 252, 2014.

ENGEL, B. E.; CRESS, W. D.; SANTIAGO-CARDONA, P. G. The retinoblastoma protein: A master tumor suppressor acts as a link between cell cycle and cell adhesion. **Cell Health and Cytoskeleton**, v. 7, p. 1–10, 2014.

ERRICO, A.; COSTANZO, V. Mechanisms of replication fork protection: A safeguard for genome stability. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 47, n. 3, p. 222–235, 2012.

ESCALANTE, J. et al. Impact of chemotherapy on gastrointestinal functions and the enteric nervous system. **Maturitas**, v. 105, p. 23–29, 2017.

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

FERLAY, J. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International Journal of Cancer**, v. 144, n. 8, p. 1941–1953, 2019.

FERLAZZO, G.; MORANDI, B. Cross-talks between natural killer cells and distinct subsets of dendritic cells. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. APR, p. 1–7, 2014.

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

FERNANDO, J.; JONES, R. The principles of cancer treatment by chemotherapy. **Surgery (United Kingdom)**, v. 33, n. 3, p. 131–135, 2015.

FERREIRA, R. C. et al. A novel piperine analogue exerts *in vivo* antitumor effect by inducing oxidative, antiangiogenic and immunomodulatory actions. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 128, n. May, p. 110247, 2020.

FLORES-GONZALEZ, J.; CANCINO-DÍAZ, J. C.; CHAVEZ-GALAN, L. Flow cytometry: From experimental design to its application in the diagnosis and monitoring of respiratory diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 22, p. 1–19, 2020.

FOCACETTI, C. et al. Effects of 5-fluorouracil on morphology, cell cycle, proliferation, apoptosis, autophagy and ROS production in endothelial cells and cardiomyocytes. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 1–25, 2015.

FOKAS, E. et al. Targeting ATR in DNA damage response and cancer therapeutics. **Cancer Treatment Reviews**, v. 40, n. 1, p. 109–117, 2014.

FOLGIERO, V. et al. TIM-3/Gal-9 interaction induces IFNy-dependent IDO1 expression in acute myeloid leukemia blast cells. **Journal of Hematology and Oncology**, v. 8, n. 1, p. 4–8, 2015.

FOSTER, I. Cancer: A cell cycle defect. **Radiography**, v. 14, n. 2, p. 144–149,

2008.

FRAJACOMO, F. T. T. et al. Solid Ehrlich carcinoma reproduces functional and biological characteristics of cancer cachexia. **Life Sciences**, v. 162, p. 47–53, 2016.

FRIDMAN, W. H. et al. The immune contexture in human tumours: Impact on clinical outcome. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 4, p. 298–306, 2012.

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, 2017.

FUCIKOVA, J. et al. Induction of tolerance and immunity by dendritic cells: Mechanisms and clinical applications. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1–17, 2019.

FULDA, S. Targeting extrinsic apoptosis in cancer : Challenges and opportunities. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, p. 1–6, 2015.

FURUYA, M. et al. Pathophysiology of tumor neovascularization. **Vascular health and risk management**, v. 1, n. 4, p. 277–290, 2005.

GABAY, M.; LI, Y.; FELSHER, D. W. MYC Activation Is a Hallmark of Cancer Initiation and Maintenance. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 36, n. 2, p. 186–194, 2009.

GAD, S. C. **Animal Models in Toxicology**. 2. ed. Flórida: CRC Press, 2007.

GAJEK, A. et al. Chemical modification of melphalan as a key to improving treatment of haematological malignancies. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2020.

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

GALDIERO, M. R. et al. Roles of neutrophils in cancer growth and progression. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 103, n. 3, p. 457–464, 2018.

GALIÈ, M. RAS as Supporting Actor in Breast Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 9, p. 1–9, 2019.

GALIMBERTI, V. E.; ROTHLIN, C. V.; GHOSH, S. Funerals and feasts: The immunological rites of cell death. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 92, n. 4, p. 663–674, 2019.

GARGIULO, G. Next-generation *in vivo* modeling of human cancers. **Frontiers in Oncology**, v. 8, 2018.

GEHRIG, J.; PANDEY, G.; WESTHOFF, J. H. Zebrafish as a model for drug screening in genetic kidney diseases. **Frontiers in Pediatrics**, v. 6, p. 1–10, 2018.

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

GEORGE, S.; ABRAHAMSE, H. Redox potential of antioxidants in cancer progression and prevention. **Antioxidants**, v. 9, n. 11, p. 1–21, 2020.

GERBER, S. A. et al. Mechanism of IL-12 mediated alterations in tumour blood vessel morphology: Analysis using whole-tissue mounts. **British Journal of Cancer**, v. 88, n. 9, p. 1453–1461, 2003.

GHOSH, N. et al. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage and Cell Death. In: Chatterjee, S.; Jungraithmayr, W.; Bagghi, D. (eds). **Immunity and Inflammation in Health and Disease: Emerging Roles of Nutraceuticals and Functional Foods in Immune Support**. Academic Press (Elsevier), 1 st edition, p.45-55, 2018

GIACINTI, C.; GIORDANO, A. RB and cell cycle progression. **Oncogene**, v. 25, n. 38, p. 5220–5227, 2006.

GIREK, M. et al. Novel tetrahydroacridine derivatives with iodobenzoic moieties induce G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis in A549 non-small lung cancer and HT-29 colorectal cancer cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 460, n. 1–2, p. 123–150, 2019.

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

GOCHEVA, V. et al. IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. **Genes and Development**, v. 24, n. 3, p. 241–255, 2010.

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

GONZALEZ, H.; HAGERLING, C.; WERB, Z. Roles of the immune system in cancer: From tumor initiation to metastatic progression. **Genes and Development**, v. 32, n. 19–20, p. 1267–1284, 2018.

GOODMAN, M. et al. Clinical trials of antioxidants as cancer prevention agents: Past, present, and future. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 5, p. 1068–1084, 2011.

GOTHAI, S. et al. Pharmacological insights into antioxidants against colorectal

- cancer: A detailed review of the possible mechanisms. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 107, p. 1514–1522, 2018.
- GOUVEIA, R. G. et al. Synthesis, DNA and protein interactions and human topoisomerase inhibition of novel Spiroacridine derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 22, p. 5911–5921, 2018.
- GRANOT, Z. Neutrophils as a Therapeutic Target in Cancer. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 1710, 2019.
- GRIGORIAN, A.; BRIEN, C. B. O. Hepatotoxicity Secondary to Chemotherapy. **Journal of Clinical and Translational Hepatology**, v. 2, n. 2, p. 95–102, 2014.
- GRIMSLEY, A.; SHAH, K. S.; MCKIBBIN, T. Monoclonal antibodies in cancer. **Pharmaceutical Biotechnology: Fundamentals and Applications, Fourth Edition**, v. 12, p. 337–359, 2013.
- GU, K. et al. Interleukin-17-induced EMT promotes lung cancer cell migration and invasion via NF-κB/ZEB1 signal pathway. **American journal of cancer research**, v. 5, n. 3, p. 1169–79, 2015.
- GÜMÜŞHAN, H.; MUSA, D. Effect of Adriamycin Administered via Different Routes on Ehrlich Ascites Tumor Cells. **IUFS Journal of Biology**, v. 67, n. 1, p. 49-54–54, 2008.
- GUO, B. et al. Targeting inflammasome/IL-1 pathways for cancer immunotherapy. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–12, 2016.
- GUO, N. et al. Interleukin-17 promotes migration and invasion of human cancer cells through upregulation of MTA1 expression. **Frontiers in Oncology**, v. 9, p. 1–11, 2019.
- HAABETH, O. A. W. et al. Inflammation driven by tumour-specific Th1 cells protects against B-cell cancer. **Nature Communications**, v. 2, n. 1, 2011.
- HAABETH, O. A. W. et al. Interleukin-1 is required for cancer eradication mediated by tumor-specific Th1 cells. **Oncolmmunology**, v. 5, n. 1, p. 1–11, 2016.
- HAIDER, M. R. et al. Novel 9-(2-(1-arylethylidene)hydrazinyl)acridine derivatives: Target Topoisomerase 1 and growth inhibition of HeLa cancer cells. **Bioorganic Chemistry**, v. 88, p. 102962, 2019.
- HAM, B. et al. The diverse roles of the TNF axis in cancer progression and metastasis. **Trends in cancer research**, v. 11, n. 1, p. 1–27, 2016.
- HAMOT, G. et al. Method validation for automated isolation of viable peripheral blood mononuclear cells. **Biopreservation and Biobanking**, v. 13, n. 3, p. 152–163, 2015.

HAN, J.; SUN, P. The pathways to tumor suppression via route p38. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 8, p. 364–371, 2007.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.

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

HARADA, M. et al. Quinacrine inhibits ICAM-1 transcription by blocking DNA binding of the NF-κB subunit p65 and sensitizes human lung adenocarcinoma a549 cells to TNF-α and the fas ligand. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, 2017.

HASHEM, M. A. et al. The antitumor activity of *Arthrospira platensis* and/or cisplatin in a murine model of Ehrlich ascites carcinoma with hematinic and hepato-renal protective action. **Journal of Functional Foods**, v. 66, n. November 2019, p. 103831, 2020.

HAYASHI, M. The micronucleus test - most widely used *in vivo* genotoxicity test. **Genes and Environment**, v. 38, p. 18, 2016.

HAYATA, K. et al. Inhibition of IL-17A in Tumor Microenvironment Augments Cytotoxicity of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Tumor-Bearing Mice. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2013.

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

HEIDEGGER, I.; PIRCHER, A.; PICHLER, R. Targeting the tumor microenvironment in renal cell cancer biology and therapy. **Frontiers in Oncology**, v. 9, p. 1–11, 2019.

HEIDLER, C. L. et al. Prexasertib (LY2606368) reduces clonogenic survival by inducing apoptosis in primary patient-derived osteosarcoma cells and synergizes with cisplatin and talazoparib. **International Journal of Cancer**, v. 147, n. 4, p. 1059–1070, 2019.

HEO, G. et al. Pro-apoptotic effect of the novel benzylidene derivative MHY695 in human colon cancer cells. **Oncology Letters**, v. 18, n. 3, p. 3256–3264, 2019.

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

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

HICKLIN, D. J.; ELLIS, L. M. Role of the vascular endothelial growth factor

pathway in tumor growth and angiogenesis. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 5, p. 1011–1027, 2005.

HIGDON, L. E. et al. Virtual Global Transplant Laboratory Standard Operating Procedures for Blood Collection, PBMC Isolation, and Storage.

Transplantation Direct, v. 2, n. 9, p. e101, 2016.

HILL, A. J. et al. Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. v. 86, n. 1, p. 6–19, 2005.

HOELDER, S.; CLARKE, P. A.; WORKMAN, P. Discovery of small molecule cancer drugs: Successes, challenges and opportunities. **Molecular Oncology**, v. 6, n. 2, p. 155–176, 2012.

HOLBECK, S. L. et al. The National Cancer Institute ALMANAC: A comprehensive screening resource for the detection of anticancer drug pairs with enhanced therapeutic activity. **Cancer Research**, v. 77, n. 13, p. 3564–3576, 2017.

HOLMGREN, L.; O'REILLY, M. S.; FOLKMAN, J. Dormancy of micrometastases: Balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. **Nature Medicine**, v. 1, n. 2, p. 149–153, 1995.

HOLMSTRÖM, K. M.; FINKEL, T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 6, p. 411–421, 2014.

HORNEDO, J.; VAN ECHO, D. A. Amsacrine (m-AMSA): A New Antineoplastic Agent Pharmacology, Clinical Activity and Toxicity. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 5, n. 2, p. 78–90, 1985.

HOVING, S. et al. Early destruction of tumor vasculature in tumor necrosis factor- α -based isolated limb perfusion is responsible for tumor response. **Anti-Cancer Drugs**, v. 17, n. 8, p. 949–959, 2006.

HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. The generation of maps used in the initial assemblies and the production of clone tiling paths were carried out. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498–503, 2013.

HU, W. et al. Cancer immunotherapy based on natural killer cells: Current progress and new opportunities. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. MAY, p. 1–16, 2019.

HUANG, C. H. et al. Quinacrine induces the apoptosis of human leukemia U937 cells through FOXP3/miR-183/ β -TrCP/SP1 axis-mediated BAX upregulation. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 334, n. September, p. 35–46, 2017a.

HUANG, C. Y. et al. A review on the effects of current chemotherapy drugs and natural agents in treating non-small cell lung cancer. **BioMedicine (France)**, v. 7, n. 4, p. 12–23, 2017b.

HUANG, G.; PAN, S. T. ROS-Mediated Therapeutic Strategy in Chemo-/Radiotherapy of Head and Neck Cancer. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, 2020.

HUANG, Q. et al. IL-17 Promotes Angiogenic Factors IL-6, IL-8, and Vegf Production via Stat1 in Lung Adenocarcinoma. **Scientific Reports**, v. 6, n. 32, p. 201–209, 2016.

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

HYNDS, R. E.; VLADIMIROU, E.; JANES, S. M. The secret lives of cancer cell lines. **DMM Disease Models and Mechanisms**, v. 11, n. 11, p. 1–5, 2018.

IBRAHIM, H. M. et al. Antitumor and immune-modulatory efficacy of dual-treatment based on levamisole and/or taurine in Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 106, p. 43–49, 2018.

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

INCA. **Estimativa 2020 – Incidência de câncer no Brasil**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil>>. Acesso em: 10 nov. 2020.

JAEHNIG, E. J. et al. Checkpoint Kinases Regulate a Global Network of Transcription Factors in Response to DNA Damage. **Cell Reports**, v. 4, n. 1, p. 174–188, 2013.

JAILLON, S. et al. Neutrophil diversity and plasticity in tumour progression and therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 20, n. 9, p. 485–503, 2020.

JAIN, P. et al. Th17 and non-th17 interleukin-17-expressing cells in chronic lymphocytic leukemia: Delineation, distribution, and clinical relevance. **Haematologica**, v. 97, n. 4, p. 599–607, 2012.

JAMES E TALMADGE AND ISAIAH J FIDLER. The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective. **Cancer Res.**, v. 70, n. 14, p. 5649–5669, 2010.

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.

JIANG, C. et al. Tumor vasculature-targeted recombinant mutated human TNF- α enhanced the antitumor activity of doxorubicin by increasing tumor vessel

- permeability in mouse xenograft models. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.
- JIMÉNEZ-VALERIO, G.; CASANOVAS, O. Angiogenesis and Metabolism: Entwined for Therapy Resistance. **Trends in Cancer**, v. 3, n. 1, p. 10–18, 2017.
- JOHNSON, J. et al. Europe PMC Funders Group Targeting the RB-E2F pathway in breast cancer. **Oncogene**, v. 35, n. 37, p. 4829–4835, 2016.
- JOHNSON, K. E.; WILGUS, T. A. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair. **Advances in Wound Care**, v. 3, n. 10, p. 647–661, 2014.
- JONES, R.; OCEN, J. Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects. **Medicine (United Kingdom)**, v. 48, n. 2, p. 97–102, 2020.
- JORGOVANOVIC, D. et al. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: A review. **Biomarker Research**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 2020.
- JOSEPHS, S. F. et al. Unleashing endogenous TNF-alpha as a cancer immunotherapeutic. **Journal of Translational Medicine**, v. 16, n. 1, p. 1–8, 2018.
- JOSHI, B. H. et al. Interleukin-4 receptor alpha overexpression in human bladder cancer correlates with the pathological grade and stage of the disease. **Cancer Medicine**, v. 3, n. 6, p. 1615–1628, 2014.
- JOSHI, S.; DURDEN, D. L. Combinatorial Approach to Improve Cancer Immunotherapy: Rational Drug Design Strategy to Simultaneously Hit Multiple Targets to Kill Tumor Cells and to Activate the Immune System. **Journal of Oncology**, v. 2019, 2019.
- JULIEN, O.; WELLS, J. A. Caspases and their substrates. **Cell death and differentiation**, v. 24, n. 8, p. 1380–1389, 2017.
- KABAŁA-DZIK, A. et al. Comparison of two components of propolis: Caffeic acid (CA) and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) induce apoptosis and cell cycle arrest of breast cancer cells MDA-MB-231. **Molecules**, v. 22, n. 9, 2017.
- KABEER, F. A. et al. *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of deoxyelephantopin from a potential medicinal plant *Elephantopus scaber* against Ehrlich ascites carcinoma. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 19, n. September 2018, p. 101106, 2019.
- KACZANOWSKI, S. Apoptosis: Its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging. **Physical Biology**, v. 13, n. 3, 2016.
- KALIRAJAN, R. et al. Docking studies, synthesis, characterization of some novel oxazine substituted 9-anilinoacridine derivatives and evaluation for their antioxidant and anticancer activities as topoisomerase II inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, p. 217–224, 2012.

- KASIAPPAN, R.; SAFE, S. ROS-Inducing Agents for Cancer Chemotherapy. **Reactive Oxygen Species**, v. 1, n. 1, 2016.
- CASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 316–323, 2004.
- KATAKWAR, P. et al. Oxidative stress marker in oral cancer: A review. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 12, n. 2, p. 438–446, 2016.
- KE, X.; SHEN, L. Molecular targeted therapy of cancer: The progress and future prospect. **Frontiers in Laboratory Medicine**, v. 1, n. 2, p. 69–75, 2017.
- KERKAR, S. et al. IL-12 triggers a programmatic change in dysfunctional myeloid-derived cells within mouse tumors. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 12, p. 4746–4757, 2011.
- KERKAR, S. P. et al. Collapse of the tumor stroma is triggered by IL-12 induction of Fas. **Molecular Therapy**, v. 21, n. 7, p. 1369–1377, 2013.
- KERR, J. F. R.; WYLLIE, A H.; CURRIE, A R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239–257, 1972.
- KETRON, A. C. et al. Amsacrine as a topoisomerase II poison: Importance of drug-DNA interactions. **Biochemistry**, v. 51, n. 8, p. 1730–1739, 2012.
- KHAN, A. Q. et al. RAS-mediated oncogenic signaling pathways in human malignancies. **Seminars in Cancer Biology**, v. 54, p. 1–13, 2019.
- KHROMOVA, N. V. et al. p53 hot-spot mutants increase tumor vascularization via ROS-mediated activation of the HIF1/VEGF-A pathway. **Cancer Letters**, v. 276, n. 2, p. 143–151, 2009.
- KIM, S. Y.; MOON, A. Drug-induced nephrotoxicity and its biomarkers. **Biomolecules and Therapeutics**, v. 20, n. 3, p. 268–272, 2012.
- KITAEVA, K. V. et al. Cell Culture Based *in vitro* Test Systems for Anticancer Drug Screening. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 1–9, 2020.
- KOH, C. M.; SABÒ, A.; GUCCIONE, E. Targeting MYC in cancer therapy: RNA processing offers new opportunities. **BioEssays**, v. 38, n. 3, p. 266–275, 2016.
- KRAKHMAL, N. V. et al. Cancer invasion: Patterns and mechanisms. **Acta Naturae**, v. 7, n. 2, p. 17–28, 2015.
- KRUISWIJK, F.; LABUSCHAGNE, C. F.; VOUSDEN, K. H. P53 in survival, death and metabolic health: A lifeguard with a licence to kill. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 7, p. 393–405, 2015.

KRZEWSKI, K.; COLIGAN, J. E. Human NK cell lytic granules and regulation of their exocytosis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 1–16, 2012.

KUEN, D. S.; KIM, B. S.; CHUNG, Y. IL-17-producing cells in tumor immunity: Friends or foes? **Immune Network**, v. 20, n. 1, p. 1–20, 2020.

KUKOWSKA, M. Amino acid or peptide conjugates of acridine/acridone and quinoline/quinolone-containing drugs. A critical examination of their clinical effectiveness within a twenty-year timeframe in antitumor chemotherapy and treatment of infectious diseases. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 109, p. 587–615, 2017.

KULKARNI, A. C.; KUPPUSAMY, P.; PARINANDI, N. Oxygen, the lead actor in the pathophysiologic drama: Enactment of the trinity of normoxia, hypoxia, and hyperoxia in disease and therapy. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 9, n. 10, p. 1717–1730, 2007.

KUMAR, R.; KAUR, M.; KUMARI, M. Acridine: A versatile heterocyclic nucleus. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 69, n. 1, p. 3–9, 2012.

KUMAR, S.; BAJAJ, S.; BODLA, R. Preclinical screening methods in cancer. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 48, n. 5, p. 481–486, 2016.

LAFAYETTE, E. A. et al. Synthesis, DNA binding and topoisomerase i inhibition activity of thiazacridine and imidazacridine derivatives. **Molecules**, v. 18, n. 12, p. 15035–15050, 2013.

LAGE, O. M. et al. Current screening methodologies in drug discovery for selected human diseases. **Marine Drugs**, v. 16, n. 8, p. 1–31, 2018.

LANE, R. S. et al. IFNy-activated dermal lymphatic vessels inhibit cytotoxic T cells in melanoma and inflamed skin. **Journal of Experimental Medicine**, v. 215, n. 12, p. 3057–3074, 2018.

LANG, X. et al. Novel synthetic acridine derivatives as potent DNA-binding and apoptosis-inducing antitumor agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 14, p. 4170–4177, 2013.

LARMONIER, N. et al. The inhibition of TNF- α anti-tumoral properties by blocking antibodies promotes tumor growth in a rat model. **Experimental Cell Research**, v. 313, n. 11, p. 2345–2355, 2007.

LASEK, W.; ZAGOŻDŻON, R.; JAKOBISIAK, M. Interleukin 12: Still a promising candidate for tumor immunotherapy? **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 63, n. 5, p. 419–435, 2014.

LECOT, P. et al. Neutrophil Heterogeneity in Cancer: From Biology to Therapies. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1–19, 2019.

LEE, H. L. et al. Tumor growth suppressive effect of IL-4 through p21-mediated

activation of STAT6 in IL-4R α overexpressed melanoma models. **Oncotarget**, v. 8, n. 25, p. 23425–23438, 2017a.

LEE, K. Y. et al. Zebrafish models for functional and toxicological screening of nanoscale drug delivery systems: Promoting preclinical applications. **Bioscience Reports**, v. 37, n. 3, p. 1–13, 2017b.

LEVINE, A. J.; OREN, M. The first 30 years of p53: Growing ever more complex. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 10, p. 749–758, 2009.

LEWIS, C. E.; POLLARD, J. W. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. **Cancer Research**, v. 66, n. 2, p. 605–612, 2006.

LI, B. et al. Low levels of tumor necrosis factor α increase tumor growth by inducing an endothelial phenotype of monocytes recruited to the tumor site. **Cancer Research**, v. 69, n. 1, p. 338–348, 2009.

LI, T. et al. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic gene therapy for cancer (Review). **Oncology Letters**, v. 16, n. 1, p. 687–702, 2018.

LI, X. et al. Combination of chemotherapy and oxidative stress to enhance cancer cell apoptosis. **Chemical Science**, v. 11, n. 12, p. 3215–3222, 2020.

LIAO, S. J. et al. TGF- β 1 and TNF- α synergistically induce epithelial to mesenchymal transition of breast cancer cells by enhancing TAK1 activation. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 13, n. 3, p. 369–380, 2019.

LIM, S.; KALDIS, P. Cdks, cyclins and CKIs: Roles beyond cell cycle regulation. **Development (Cambridge)**, v. 140, n. 15, p. 3079–3093, 2013.

LISBOA, T. et al. Toxicity and Antitumor Activity of a Thiophene-Acridine Hybrid. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 1, 2019.

LIU, W. H. et al. Amsacrine suppresses matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)/MMP-9 expression in human leukemia cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 229, n. 5, p. 588–598, 2014a.

LIU, X. et al. Intratumor IL-17-positive mast cells are the major source of the IL-17 that is predictive of survival in gastric cancer patients. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. 1–10, 2014b.

LIU, Y. et al. Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research. **Quantitative Imaging in Medicine and Surgery**, v. 5, n. 5, p. 708–729, 2015.

LO, U. G. et al. IFNG-induced IFIT5 promotes epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer via miRNA processing. **Cancer Research**, v. 79, n. 6, p. 1098–1112, 2019.

LOCATELLI, S. L. et al. Targeting cancer cells and tumor microenvironment in

preclinical and clinical models of Hodgkin lymphoma using the dual PI3Kd/G inhibitor RP6530. **Clinical Cancer Research**, v. 25, n. 3, p. 1098–1112, 2019.

LOMBARDI, G. Effector and Regulatory CD4+ T helper lineages in cancer. **Journal of Cancer Treatment and Diagnosis**, v. 2, n. 1, p. 38–42, 2017.

LOMBARDI, V. C.; KHAIBOULLINA, S. F.; RIZVANOV, A. A. Plasmacytoid dendritic cells, a role in neoplastic prevention and progression. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 45, n. s1, p. 1–8, 2015.

LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 330–338, 2003.

LOPES-COSTA, E. et al. Anticancer effects of seaweed compounds fucoxanthin and phloroglucinol, alone and in combination with 5-fluorouracil in colon cells. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, v. 80, n. 13–15, p. 776–787, 2017.

LOPEZ, J.; TAIT, S. W. G. Mitochondrial apoptosis : killing cancer using the enemy within. **British Journal of Cancer**, v. 112, n. 6, p. 957–962, 2015.

LU, L. et al. IL-17A promotes immune cell recruitment in human esophageal cancers and the infiltrating dendritic cells represent a positive prognostic marker for patient survival. **Journal of Immunotherapy**, v. 36, n. 8, p. 451–458, 2013.

LU, Y. et al. Interferon- γ produced by tumor-infiltrating NK cells and CD4 + T cells downregulates TNFSF15 expression in vascular endothelial cells. **Angiogenesis**, v. 17, n. 3, p. 529–540, 2014.

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

LUPO, G. et al. Anti-angiogenic therapy in cancer: Downsides and new pivots for precision medicine. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, p. 1–9, 2017.

MACRAE, C. A.; PETERSON, R. T. Zebrafish as tools for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 10, p. 721–731, 2015.

MAILANKODY, S.; PRASAD, V. Five years of cancer drug approvals: Innovation, efficacy, and costs. **JAMA Oncology**, v. 1, n. 4, p. 539–540, 2015.

MAJ, E.; PAPIERNIK, D.; WIETRZYK, J. Antiangiogenic cancer treatment: The great discovery and greater complexity (Review). **International Journal of Oncology**, v. 49, n. 5, p. 1773–1784, 2016.

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

MALUMBRES, M. Cyclin-dependent kinases. **Genome Biology**, v. 15, n. 6, p. 1–10, 2014.

MANDAI, M. et al. Dual Faces of IFNy in Cancer Progression: A Role of PD-L1 Induction in the Determination of Pro- and Antitumor immunity. **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 10, p. 2329–2334, 2016.

MANDAL, M. et al. Effect of honey and eugenol on ehrlich ascites and solid carcinoma. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, n. March, 2010.

MANDER, K. A.; FINNIE, J. W. Tumour angiogenesis, anti-angiogenic therapy and chemotherapeutic resistance. **Australian Veterinary Journal**, v. 96, n. 10, p. 371–378, 2018.

MANETTI, R. et al. Natural Killer Cell Stimulatory Factory (Interleucin 12 [IL-12]) Induces Responses and Inhibits the Dedifferentiation of IL-4-producing Th Cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 177, n. 4, p. 1199–1204, 1993.

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.

MANIC, G. et al. Trial Watch: Targeting ATM–CHK2 and ATR–CHK1 pathways for anticancer therapy. **Molecular and Cellular Oncology**, v. 2, n. 4, p. 1–17, 2015.

MANTOVANI, F.; COLLAVIN, L.; DEL SAL, G. Mutant p53 as a guardian of the cancer cell. **Cell Death and Differentiation**, v. 26, n. 2, p. 199–212, 2019.

MARCINKOWSKA, E.; GOCEK, E. Tyrosine Kinase Signaling Pathways in Normal and Cancer Cells. In: Focosi D. (eds) **Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors**. Springer, Cham. p. 1–25, 2016.

MARTÍN, M.; GOYA, L.; RAMOS, S. Preventive Effects of Cocoa and Cocoa Antioxidants in Colon Cancer. **Diseases**, v. 4, n. 1, p. 6, 2016.

MARTINELLI, E. et al. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer therapy. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 158, n. 1, p. 1–9, 2009.

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, N. L.; TAVÁREZ, S.; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, Z. I. *In vitro* toxicity assessment of zinc and nickel ferrite nanoparticles in human erythrocytes and peripheral blood mononuclear cell. **Toxicology in Vitro**, v. 57, n. January, p. 54–61, 2019.

MCKINNON, K. M. Flow cytometry: An overview. **Current Protocols in Immunology**, v. 2018, p. 5.1.1-5.1.11, 2018.

MEDINA, P. J.; GOODIN, S. Lapatinib: A dual inhibitor of human epidermal

growth factor receptor tyrosine kinases. **Clinical Therapeutics**, v. 30, n. 8, p. 1426–1447, 2008.

MÉRY, B. et al. *In Vitro* Cell Death Determination for Drug Discovery: A Landscape Review of Real Issues. **Journal of Cell Death**, v. 10, 2017.

MILAN, D. J. et al. Drugs that induce repolarization abnormalities cause bradycardia in zebrafish. **Circulation**, v. 107, n. 10, p. 1355–1358, 2003.

MILLER, K. D. et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 69, n. 5, p. 363–385, 2019.

MILLS, C. C.; KOLB, E. A.; SAMPSON, V. B. Development of chemotherapy with cell-cycle inhibitors for adult and pediatric cancer therapy. **Cancer Research**, v. 78, n. 2, p. 320–325, 2018.

MITOLA, S. et al. IL-12 Regulates an Endothelial Cell-Lymphocyte Network: Effect on Metalloproteinase-9 Production. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 7, p. 3725–3733, 2003.

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

MONTANÉ, X. et al. Current perspectives of the applications of polyphenols and flavonoids in cancer therapy. **Molecules**, v. 25, n. 15, 2020.

MONTFORT, A. et al. The TNF Paradox in Cancer Progression and Immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 2019.

MORGAN, M. J.; LIU, Z. G. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling. **Cell Research**, v. 21, n. 1, p. 103–115, 2011.

MORSE, M. A. et al. The role of angiogenesis in hepatocellular carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 25, n. 3, p. 912–920, 2019.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

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

MOURA, E. C. R. et al. Tumor growth activity of duloxetine in Ehrlich carcinoma in mice. **BMC Research Notes**, v. 11, n. 1, p. 1–4, 2018.

MOUSA, S. A.; DAVIS, P. J. Angiogenesis and Anti-Angiogenesis Strategies in Cancer. In: Mousa, S.A.; Davis, P.J. (eds). **Anti-Angiogenesis Strategies in Cancer Therapeutics**. Academic Press (Elsevier), p.1-19, 2017.

- MÜLLER, L.; AIGNER, P.; STOIBER, D. Type I interferons and natural killer cell regulation in cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1–11, 2017.
- NAGY, J. A. et al. Heterogeneity of the tumor vasculature. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 36, n. 3, p. 321–331, 2010.
- NAJAFI, M. et al. Macrophage polarity in cancer: A review. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 3, p. 2756–2765, 2019.
- NAKAGAWA, J. et al. TNF expressed by tumor-associated macrophages, but not microglia, can eliminate glioma. **International Journal of Oncology**, v. 30, n. 4, p. 803–811, 2007.
- NAKAO, S. et al. Infiltration of COX-2-expressing macrophages is a prerequisite for IL-1 β -induced neovascularization and tumor growth. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 11, p. 2979–2991, 2005.
- NAKATSU, N. et al. Evaluation of action mechanisms of toxic chemicals using JFCR39, a panel of human cancer cell lines. **Molecular Pharmacology**, v. 72, n. 5, p. 1171–1180, 2007.
- NAKAYAMA, J.; MAKINOSHIMA, H. Zebrafish-based screening models for the identification of anti-metastatic drugs. **Molecules**, v. 25, n. 10, p. 1–14, 2020.
- NAMIKI, M.; UENO, S.; KITAGAWA, Y. Role of hormonal therapy for prostate cancer: Perspective from Japanese experiences. **Translational Andrology and Urology**, v. 1, n. 3, p. 160–172, 2012.
- NAPPO, G. et al. The immunosuppressive cytokine interleukin-4 increases the clonogenic potential of prostate stem-like cells by activation of STAT6 signalling. **Oncogenesis**, v. 6, n. 5, 2017.
- NELSON, M. H.; DOLDER, C. R. Lapatinib: A novel dual tyrosine kinase inhibitor with activity in solid tumors. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 40, n. 2, p. 261–269, 2006.
- NI, L.; LU, J. Interferon gamma in cancer immunotherapy. **Cancer Medicine**, v. 7, n. 9, p. 4509–4516, 2018.
- NICOLINI, A. et al. Malnutrition, anorexia and cachexia in cancer patients: A mini-review on pathogenesis and treatment. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 67, n. 8, p. 807–817, 2013.
- NIELSEN, S. R.; SCHMID, M. C. Macrophages as Key Drivers of Cancer Progression and Metastasis. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, 2017.
- NORDIN, N. et al. *In vitro* cytotoxicity and anticancer effects of citral nanostructured lipid carrier on MDA MBA-231 human breast cancer cells. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–19, 2019.

NORTH, R. J. et al. Interleukin 1-induced, T cell-mediated regression of immunogenic murine tumors: Requirement for an adequate level of already acquired host concomitant immunity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 168, n. 6, p. 2031–2043, 1988.

NURGALI, K.; JAGOE, R. T.; ABALO, R. Editorial: Adverse effects of cancer chemotherapy: Anything new to improve tolerance and reduce sequelae? **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1–3, 2018.

O'DONNELL, J. S.; TENG, M. W. L.; SMYTH, M. J. Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 16, n. 3, p. 151–167, 2019.

OECD. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. **OECD Guideline for the testing of chemicals**, p. 1–10, 1997.

OECD. Acute oral toxicity – acute toxic class method. **OECD Guideline for Testing of Chemicals**, n. 423, p. 1–14, 2001.

OECD. Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals** n. 236. Paris: OECD Publishing, p. 1–22, 2013.

OELMANN, E. et al. Expression of interleukin-1 and interleukin-1 receptors type 1 and type 2 in Hodgkin lymphoma. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–13, 2015.

OGISHIMA, J. et al. The oncogene KRAS promotes cancer cell dissemination by stabilizing spheroid formation via the MEK pathway. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 1–13, 2018.

OH, K. et al. IL-1 β induces IL-6 production and increases invasiveness and estrogen-independent growth in a TG2-dependent manner in human breast cancer cells. **BMC Cancer**, v. 16, n. 1, p. 1–11, 2016.

OLSSON, A. K. et al. VEGF receptor signalling - In control of vascular function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 5, p. 359–371, 2006.

OLSZEWSKA, P. et al. Novel tetrahydroacridine derivatives inhibit human lung adenocarcinoma cell growth by inducing G1 phase cell cycle arrest and apoptosis. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 68, n. 8, p. 959–967, 2014.

ORECCHIONI, M. et al. Macrophage polarization: Different gene signatures in M1(Lps+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively activated macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1–14, 2019.

OSIŃSKA, I.; POPKO, K.; DEMKOW, U. Perforin: An important player in immune response. **Central European Journal of Immunology**, v. 39, n. 1, p. 109–115, 2014.

OSTUNI, R. et al. Macrophages and cancer: From mechanisms to therapeutic implications. **Trends in Immunology**, v. 36, n. 4, p. 229–239, 2015.

- OTANI, T. et al. Identification of IFN-gamma-producing cells in IL-12/IL-18-treated mice. **Cellular immunology**, v. 198, n. 2, p. 111–119, 1999.
- OTTO, T.; SICINSKI, P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 2, p. 93–115, 2017.
- OUYANG, L. et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Proliferation**, v. 45, n. 6, p. 487–498, 2012.
- OUYANG, Z.; PENG, D.; DHAKAL, D. P. Risk factors for hematological toxicity of chemotherapy for bone and soft tissue sarcoma. **Oncology Letters**, v. 5, n. 5, p. 1736–1740, 2013.
- OZASLAN, M. et al. Ehrlich ascites carcinoma. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 13, p. 2375–2378, 2011.
- PAI, C. C. S. et al. Clonal Deletion of Tumor-Specific T Cells by Interferon- γ Confers Therapeutic Resistance to Combination Immune Checkpoint Blockade. **Immunity**, v. 50, n. 2, p. 477- 492.e8, 2019.
- PAN, B. et al. Interleukin-17 promotes angiogenesis by stimulating VEGF production of cancer cells via the STAT3/GIV signaling pathway in non-small-cell lung cancer. **Scientific Reports**, v. 5, n. September, p. 1–13, 2015.
- PAN, S. Y. et al. Evaluation of acute tacrine treatment on passive-avoidance response, open-field behavior, and toxicity in 17- and 30-day-old mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 85, n. 1, p. 50–56, 2006.
- PAN, S. Y. et al. Evaluation of acute bis(7)-tacrine treatment on behavioral functions in 17-day-old and 30-day-old mice, with attention to drug toxicity. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 86, n. 4, p. 778–783, 2007.
- PANDYA, P. H. et al. The Immune System in Cancer Pathogenesis: Potential Therapeutic Approaches. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, 2016.
- PAPANASTASOPOULOS, P.; STEBBING, J. Molecular basis of 5-fluorouracil-related toxicity: Lessons from clinical practice. **Anticancer Research**, v. 34, n. 4, p. 1531–1536, 2014.
- PÁRAL, P. et al. Cell cycle and differentiation of Sca-1+ and Sca-1– hematopoietic stem and progenitor cells. **Cell Cycle**, v. 17, n. 16, p. 1979–1991, 2018.
- PARANGI, S. et al. Antiangiogenic therapy of transgenic mice impairs de novo tumor growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 5, p. 2002–2007, 1996.
- PATEL, D. et al. Monoclonal antibody cetuximab binds to and down-regulates constitutively activated epidermal growth factor receptor VIII on the cell surface.

Anticancer Research, v. 27, n. 5 A, p. 3355–3366, 2007.

PATIL, M.; PABLA, N.; DONG, Z. Checkpoint kinase 1 in DNA damage response and cell cycle regulation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 21, p. 4009–4021, 2013.

PATTON, E. E.; TOBIN, D. M. Spotlight on zebrafish: The next wave of translational research. **DMM Disease Models and Mechanisms**, v. 12, n. 3, p. 2017–2020, 2019.

PETRELLI, F. et al. Comparative efficacy of palbociclib, ribociclib and abemaciclib for ER+ metastatic breast cancer: an adjusted indirect analysis of randomized controlled trials. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 174, n. 3, p. 597–604, 2019.

PHILLIPS, J. B.; WESTERFIELD, M. Zebrafish models in translational research: Tipping the scales toward advancements in human health. **DMM Disease Models and Mechanisms**, v. 7, n. 7, p. 739–743, 2014.

PICCININI, F. et al. Cell Counting and Viability Assessment of 2D and 3D Cell Cultures: Expected Reliability of the Trypan Blue Assay. **Biological Procedures Online**, v. 19, n. 1, p. 1–12, 2017.

PILON, A. et al. A new family of iron(II)-cyclopentadienyl compounds shows strong activity against colorectal and triple negative breast cancer cells. **Molecules**, v. 25, n. 7, 2020.

PISTRITTO, G. et al. Apoptosis as anticancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. **Aging**, v. 8, n. 4, p. 603–619, 2016.

PIZZINO, G. et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.

POLK, A. et al. Specific CDK4/6 inhibition in breast cancer: A systematic review of current clinical evidence. **ESMO Open**, v. 1, n. 6, p. 1–11, 2016.

PONCE-CUSI, R.; CALAF, G. M. Apoptotic activity of 5-fluorouracil in breast cancer cells transformed by low doses of ionizing α -particle radiation. **International Journal of Oncology**, v. 48, n. 2, p. 774–782, 2016.

POZAROWSKI, P.; DARZYNKIEWICZ, Z. Analysis of cell cycle by flow cytometry. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 281, p. 301–311, 2004.

PRAGER, I. et al. NK cells switch from granzyme B to death receptor-mediated cytotoxicity during serial killing. **Journal of Experimental Medicine**, v. 216, n. 9, p. 2113–2127, 2019.

PRASAD, V.; DE JESÚS, K.; MAILANKODY, S. The high price of anticancer

- drugs: Origins, implications, barriers, solutions. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 14, n. 6, p. 381–390, 2017.
- PROKHOROVA, E. A. et al. Apoptosis regulation by subcellular relocation of caspases. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.
- PROKOPCHUK, O. et al. Interleukin-4 enhances proliferation of human pancreatic cancer cells: Evidence for autocrine and paracrine actions. **British Journal of Cancer**, v. 92, n. 5, p. 921–928, 2005.
- PUAR, Y. R. et al. Evidence for the involvement of the master transcription factor NF-κB in cancer initiation and progression. **Biomedicines**, v. 6, n. 3, p. 1–21, 2018.
- PUGAZHENDHI, A. et al. Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems. **Life Sciences**, v. 200, n. October 2017, p. 26–30, 2018.
- PUNT, S. et al. FoxP3+ and IL-17+ cells are correlated with improved prognosis in cervical adenocarcinoma. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 64, n. 6, p. 745–753, 2015.
- QIAN, X. et al. Interleukin-17 acts as double-edged sword in anti-tumor immunity and tumorigenesis. **Cytokine**, v. 89, p. 34–44, 2017.
- QUEREDA, V. et al. An essential role for Ink4 and Cip/Kip cell-cycle inhibitors in preventing replicative stress. **Cell Death and Differentiation**, v. 23, n. 3, p. 430–441, 2016.
- RADHA, G.; RAGHAVAN, S. C. BCL2: A promising cancer therapeutic target. **BBA - Reviews on Cancer**, v. 1868, n. 1, p. 309–314, 2017.
- RAHMAN, M. S. et al. Anticancer activity and antioxidant potential of *Aponogeton undulatus* against Ehrlich ascites carcinoma cells in Swiss albino mice. **Oncology Letters**, v. 14, n. 3, p. 3169–3176, 2017.
- RAJABI, M.; MOUSA, S. A. The role of angiogenesis in cancer treatment. **Biomedicines**, v. 5, n. 2, 2017.
- RANI, V.; SINGH YADAV, U. C. Free radicals in human health and disease. **Free Radicals in Human Health and Disease**, p. 1–430, 2015.
- RAO, N.; LEE, Y. F.; GE, R. Novel endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic potential. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 36, n. 10, p. 1177–1190, 2015.
- RATHORE, R. et al. Overcoming chemotherapy drug resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins (IAPs). **Apoptosis**, v. 22, n. 7, p. 898–919, 2017.
- RAZA, M. H. et al. ROS-modulated therapeutic approaches in cancer treatment.

Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, v. 143, n. 9, p. 1789–1809, 2017.

RECZEK, C. R.; CHANDEL, N. S. The Two Faces of Reactive Oxygen Species in Cancer. **Annual Review of Cancer Biology**, v. 1, n. 1, p. 79–98, 2017.

RENOVIZÉ, 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.

RILEY, B. D. et al. Essential elements of genetic cancer risk assessment, counseling, and testing: Updated recommendations of the National Society of genetic Counselors. **Journal of Genetic Counseling**, v. 21, n. 2, p. 151–161, 2012.

ROBERTS, N. J. et al. Systemic use of tumor necrosis factor alpha as an anticancer agent. **Oncotarget**, v. 2, n. 10, p. 739–751, 2011.

ROMA-RODRIGUES, C. et al. Targeting tumor microenvironment for cancer therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 4, 2019.

RONCO, C. et al. ATM, ATR, CHK1, CHK2 and WEE1 inhibitors in cancer and cancer stem cells. **MedChemComm**, v. 8, n. 2, p. 295–319, 2017.

ROTHLIN, C. V.; GHOSH, S. Lifting the innate immune barriers to antitumor immunity. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 8, n. 1, p. 1–15, 2020.

ROŽMAN, P.; ŠVAJGER, U. The tolerogenic role of IFN- γ . **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 41, n. 2010, p. 40–53, 2018.

RUMMAN, M.; DHAWAN, J.; KASSEM, M. Concise Review: Quiescence in Adult Stem Cells: Biological Significance and Relevance to Tissue Regeneration. **Stem Cells**, v. 33, n. 10, p. 2903–2912, 2015.

SAADEH, D.; KURBAN, M.; ABBAS, O. Plasmacytoid dendritic cell role in cutaneous malignancies. **Journal of Dermatological Science**, v. 83, n. 1, p. 3–9, 2016.

SACCHI, A. et al. Synergistic antitumor activity of cisplatin, paclitaxel, and gemcitabine with tumor vasculature-targeted tumor necrosis factor- α . **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 1, p. 175–182, 2006.

SAIJO, Y. et al. Proinflammatory Cytokine IL-1 β Promotes Tumor Growth of Lewis Lung Carcinoma by Induction of Angiogenic Factors: *In Vivo* Analysis of Tumor-Stromal Interaction. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 1, p. 469–475, 2002.

SALEEM, S.; KANNAN, R. R. Zebrafish : an emerging real-time model system

to study Alzheimer 's disease and neurospecific drug discovery. **Cell death discovery**, v. 4, n. 45, 2018.

SANTORO, M. M. Antiangiogenic cancer drug using the zebrafish model. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 34, n. 9, p. 1846–1853, 2014.

SANTOS, J. et al. Th1-Biased Immunomodulation and *In Vivo* Antitumor Effect of a Novel Piperine Analogue. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 9, p. 1–22, 2018.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular Research**, v. 45, n. 3, p. 528–537, 2000.

SASI, S. P. et al. Breaking the harmony of TNF- α signaling for cancer treatment. **Oncogene**, v. 31, n. 37, p. 4117–4127, 2012.

SATAPATHY, S. R. et al. Metallic gold and bioactive quinacrine hybrid nanoparticles inhibit oral cancer stem cell and angiogenesis by deregulating inflammatory cytokines in p53 dependent manner. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 14, n. 3, p. 883–896, 2018.

SATYANARAYANA, A.; KALDIS, P. Mammalian cell-cycle regulation: Several cdk's, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. **Oncogene**, v. 28, n. 33, p. 2925–2939, 2009.

SCHALPER, K. A. et al. Differential expression and significance of PD-L1, IDO-1, and B7-H4 in human lung cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 23, n. 2, p. 370–378, 2017.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. **Current Biology**, v. 24, n. 10, p. R453–R462, 2014.

SCHIRRMACHER, V. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). **International Journal of Oncology**, v. 54, n. 2, p. 407–419, 2019.

SCHMIDT, A.; LIU, M. Recent Advances in the Chemistry of Acridines. **Advances in Heterocyclic Chemistry**, v. 115, p. 287–353, 2015

SCHRODER, K. et al. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of leukocyte biology**, v. 75, n. 2, p. 163–189, 2004.

SCHWERTE, T.; PELSTER, B. Digital motion analysis as a tool for analysing the shape and performance of the circulatory system in transparent animals. **Journal of Experimental Biology**, v. 203, n. 11, p. 1659–1669, 2000.

SCREPANTI, V. et al. Impact of FASL-induced apoptosis in the elimination of tumor cells by NK cells. **Molecular Immunology**, v. 42, n. 4, p. 495–499, 2005.

SEEBACHER, N. A. et al. Clinical development of targeted and immune based anti-cancer therapies. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 38, n. 156, p. 1–39, 2019.

SEIGER, K. et al. Cost and utilization of immunotherapy and targeted therapy for melanoma: Cross-sectional analysis in the Medicare population, 2013 and 2015. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 82, n. 3, p. 761–764, 2020.

SERAFIM, V. L. Síntese, elucidação estrutural e avaliação biológica de potenciais fármacos antitumoriais e antimaláricos de derivados acilidrazônicos-acridínicos. **Trabalho de conclusão de curso. Universidade Estadual da Paraíba**, p. 81, 2014.

SETERRAHMANE, S.; XU, H. Tumor-related interleukins: Old validated targets for new anti-cancer drug development. **Molecular Cancer**, v. 16, n. 1, p. 1–17, 2017.

SHABGAH, A. G.; FATTABI, E.; SHAHNEH, F. Z. Interleukin-17 in human inflammatory diseases. **Advances in dermatology and allergology**, v. 31, n. 4, p. 256–261, 2014.

SHAKERI, R.; KHEIROLLAHI, A.; DAVOODI, J. Apaf-1: Regulation and function in cell death. **Biochimie**, v. 135, p. 111–125, 2017.

SHARMA, A. et al. Chemotherapy induced liver abnormalities: an imaging perspective. **Clinical and molecular hepatology**, v. 20, n. 3, p. 317–326, 2014.

SHARMA, A.; BOISE, L. H.; SHANMUGAM, M. Cancer metabolism and the evasion of apoptotic cell death. **Cancers**, v. 11, n. 8, p. 1–20, 2019.

SHEN, J. et al. Vascular-targeted TNF α and IFN γ inhibits orthotopic colorectal tumor growth. **Journal of Translational Medicine**, v. 14, n. 1, p. 1–13, 2016.

SHEN, J. et al. IL-1 β induces apoptosis and autophagy via mitochondria pathway in human degenerative nucleus pulposus cells. **Scientific Reports**, v. 7, n. August 2016, p. 1–12, 2017.

SHEN, J. et al. Anti-cancer therapy with TNF α and IFN γ : A comprehensive review. **Cell Proliferation**, v. 51, n. 4, p. 1–11, 2018.

SHERR, C. J.; BARTEK, J. Cell Cycle–Targeted Cancer Therapies. **Annual Review of Cancer Biology**, v. 1, n. 1, p. 41–57, 2017.

SHIME, H. et al. Toll-like receptor 2 ligand and interferon- γ suppress anti-tumor T cell responses by enhancing the immunosuppressive activity of monocytic myeloid-derived suppressor cells. **Oncolimmunology**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

SHINOHARA, M. et al. Reactive oxygen generated by NADPH oxidase 1

(Nox1) contributes to cell invasion by regulating matrix metalloprotease-9 production and cell migration. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 7, p. 4481–4488, 2010.

SHLOMOVITZ, I. et al. Flipping the dogma - Phosphatidylserine in non-apoptotic cell death. **Cell Communication and Signaling**, v. 17, n. 1, p. 1–12, 2019.

SHORTT, J.; JOHNSTONE, R. W. Oncogenes in cell survival and cell death. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 12, p. 1–10, 2012.

SIDDQUI, I. A. et al. Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1348, n. 1, p. 20–31, 2015.

SIGISMUND, S.; AVANZATO, D.; LANZETTI, L. Emerging functions of the EGFR in cancer. **Molecular Oncology**, v. 12, n. 1, p. 3–20, 2018.

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 (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 1, p. 1–9, 2019.

SILVA, D. K. F. Efeito antitumoral e toxicidade de um novo derivado acridínico (AMTAC-17) em modelos *in vitro* e *in vivo*. **Tese de Doutorado. Universidade Federal da Paraíba**, p. 183, 2020.

SILVEIRA, A. L. Compound A398 , a Novel Podophyllotoxin Analogue : Cytotoxicity and Induction of Apoptosis in Human Leukemia Cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. 1–9, 2014.

SINGH, K. et al. Antioxidants as precision weapons in war against cancer chemotherapy induced toxicity – Exploring the armoury of obscurity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, n. 2, p. 177–190, 2018.

SINGH, S. et al. Loss of ELF5–FBXW7 stabilizes IFNGR1 to promote the growth and metastasis of triple-negative breast cancer through interferon-γ signalling. **Nature Cell Biology**, v. 22, n. 5, p. 591–602, 2020.

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

SNEZHINA, A. V. et al. ROS Generation and Antioxidant Defense Systems in Normal and Malignant Cells. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2019, p. 6175804, 2019.

SON, Y. et al. Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways? **Journal of Signal Transduction**, v. 2011, p. 1–6, 2011.

- SONDHI, S. M. et al. Synthesis, anti-inflammatory and anticancer activity evaluation of some novel acridine derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 555–563, 2010.
- SONG, M. et al. Low-dose IFNg induces tumor cell stemness in tumor microenvironment of non–small cell lung cancer. **Cancer Research**, v. 79, n. 14, p. 3737–3748, 2019.
- SOSA, V. et al. Oxidative stress and cancer: An overview. **Ageing Research Reviews**, v. 12, n. 1, p. 376–390, 2013.
- SOUSA, T. K. G. DE. Potencial antitumoral e toxicidade do 5'-oxo-1'-fenil-1',5'-diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (ACMD). **Tese de Doutorado. Universidade Federal da Paraíba**, p. 175, 2019.
- SPRANGER, S.; GAJEWSKI, T. F. Mechanisms of Tumor Cell–Intrinsic Immune Evasion. **Annual Review of Cancer Biology**, v. 2, n. 1, p. 213–228, 2018.
- STARK, G. R.; TAYLOR, W. R. Analyzing the G2/M Checkpoint. **Methods in molecular biology**, v. 280, n. 1, p. 51–82, 2004.
- STOCKMANN, C. et al. The impact of the immune system on tumor: Angiogenesis and vascular remodeling. **Frontiers in Oncology**, v. 4, p. 1–13, 2014.
- STODDART, R. W. The Generation of Cancer: Initiation, promotion, progression and the multiple influences of the environment. **Nutrition and Health**, v. 2, n. 3–4, p. 153–162, 1983.
- STRACKER, T. H. et al. The ATM signaling network in development and disease. **Frontiers in Genetics**, v. 4, p. 1–19, 2013.
- SU, Z. et al. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. **Molecular Cancer**, v. 14, n. 1, p. 48, 2015.
- SUI, G. et al. Interleukin-17 promotes the development of cisplatin resistance in colorectal cancer. **Oncology Letters**, v. 17, n. 1, p. 944–950, 2019.
- SUN, Y. et al. IL-17/miR-192/IL-17Rs regulatory feedback loop facilitates multiple myeloma progression. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1–16, 2014.
- SURYADINATA, R.; SADOWSKI, M.; SARCEVIC, B. Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates. **Bioscience reports**, v. 30, n. 4, p. 243–255, 2010.
- SZAFRAN, M. J. et al. Amsacrine derivatives selectively inhibit Mycobacterial topoisomerase I (TopA), impair *M. smegmatis* growth and disturb chromosome replication. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1–13, 2018.

TAIT, S. W. G.; GREEN, D. R. Mitochondria and cell death : outer membrane permeabilization and beyond. **Nature Publishing Group**, v. 11, n. 9, p. 621–632, 2010.

TAKIMOTO, C. H. Anticancer drug development at the US National Cancer Institute. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology, Supplement**, v. 52, n. 1, p. 29–33, 2003.

TAMURA, R. et al. Dual role of macrophage in tumor immunity. **Immunotherapy**, v. 10, n. 10, p. 899–909, 2018.

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, p. 748–757, 2019.

TAN, E. P.; DUNCAN, F. E.; SLAWSON, C. The sweet side of the cell cycle. **Biochemical Society Transactions**, v. 45, n. 2, p. 313–322, 2017.

TAN, Q. et al. Potential roles of IL-1 subfamily members in glycolysis in disease. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 44, p. 18–27, 2018.

TANG, D. et al. TNF-Alpha Promotes Invasion and Metastasis via NF-Kappa B Pathway in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Medical science monitor basic research**, v. 23, p. 141–149, 2017.

TANNENBAUM, C. S.; HAMILTON, T. A. Immune-inflammatory mechanisms in IFNy-mediated anti-tumor activity. **Seminars in Cancer Biology**, v. 10, n. 2, p. 113–123, 2000.

TEAME, T. et al. The use of zebrafish (*Danio rerio*) as biomedical models. **Animal Frontiers**, v. 9, n. 3, p. 68–77, 2019.

TENG, M. W. L.; KERSHAW, M. H.; SMYTH, M. J. Cancer Immunoediting: From Surveillance to Escape. In: Prendergast, G. C.; Jaffee, E. M. (eds). **Cancer immunotherapy: immune suppression and tumor growth**. San Diego, CA, United States. Academic Press (Elsevier), p. 85-99, 2013.

THOMAS, S. A. et al. Adverse Effects of 5-fluorouracil: Focus on Rare Side Effects. **Cancer Cell & Microenvironment**, p. 3–6, 2016.

THORNTON, T. M.; RINCON, M. Non-classical p38 map kinase functions: Cell cycle checkpoints and survival. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 1, p. 44–52, 2009.

THWAITES, M. J. et al. Context dependent roles for RB-E2F transcriptional regulation in tumor suppression. **PLoS ONE**, v. 14, n. 1, p. 1–14, 2019.

THYAGARAJAN, A.; SAHU, R. P. Potential Contributions of Antioxidants to Cancer Therapy: Immunomodulation and Radiosensitization. **Integrative**

Cancer Therapies, v. 17, n. 2, p. 210–216, 2018.

TOBÓLSKA, S. et al. Genotoxicity and mutagenicity of inosine pranobex. **Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 2, p. 207–213, 2018.

TODARO, M. et al. Apoptosis resistance in epithelial tumors is mediated by tumor-cell-derived interleukin-4. **Cell Death and Differentiation**, v. 15, n. 4, p. 762–772, 2008.

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

TORREY, H. et al. Targeting TNFR2 with antagonistic antibodies inhibits proliferation of ovarian cancer cells and tumor-associated Tregs. **Science Signaling**, v. 10, n. 462, 2017.

TOUFEKTCHAN, E.; TOLEDO, F. The guardian of the genome revisited: P53 downregulates genes required for telomere maintenance, DNA repair, and centromere structure. **Cancers**, v. 10, n. 5, 2018.

TREMONT, A.; LU, J.; COLE, J. T. Endocrine therapy for early breast cancer: Updated review. **Ochsner Journal**, v. 17, n. 4, p. 405–411, 2017.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 2, p. 133–146, 2003.

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

TUMMERS, B.; GREEN, D. R. Caspase-8: regulating life and death. **Immunological reviews**, v. 277, p. 76–89, 2017.

URIBE-QUEROL, E.; ROSALES, C. Neutrophils in cancer: Two sides of the same coin. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, 2015.

VAN DYKE, T.; JACKS, T. Cancer modeling in the modern era: Progress and challenges. **Cell**, v. 108, n. 2, p. 135–144, 2002.

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

VAZ, R. L.; OUTEIRO, T. F.; FERREIRA, J. J. Zebrafish as an animal model for drug discovery in Parkinson's disease and other movement disorders: A systematic review. **Frontiers in Neurology**, v. 9, 2018.

VEGLIA, F.; GABRILOVICH, D. I. Dendritic cells in cancer: the role revisited. **Current Opinion in Immunology**, v. 45, p. 43–51, 2017.

- VERBRUGGE, I.; JOHNSTONE, R. W.; SMYTH, M. J. SnapShot: Extrinsic Apoptosis Pathways. **Cell**, v. 143, n. 7, p. 1192- 1192, 2010.
- VIALLARD, C.; LARRIVÉE, B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. **Angiogenesis**, v. 20, n. 4, p. 409–426, 2017.
- VINAY, D. S. et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, p. S185–S198, 2015.
- VISCONTI, R.; DELLA MONICA, R.; GRIECO, D. Cell cycle checkpoint in cancer: A therapeutically targetable double-edged sword. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 35, n. 1, p. 1–8, 2016.
- VOIGT, C. et al. Cancer cells induce interleukin-22 production from memory CD4+ T cells via interleukin-1 to promote tumor growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 49, p. 12994–12999, 2017.
- WANG, L. H. et al. Loss of tumor suppressor gene function in human cancer: An overview. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 51, n. 6, p. 2647–2693, 2019.
- WANG, L. LE et al. Bevacizumab induces A549 cell apoptosis through the mechanism of endoplasmic reticulum stress in vitro. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 5, p. 5291–5299, 2015.
- WANG, M. et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 5, p. 761–773, 2017.
- WANG, X.; LIN, Y. Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 29, n. 11, p. 1275–1288, 2008.
- WANG, Y. et al. The Application of Natural Products in Cancer Therapy by Targeting Apoptosis Pathways. **Current Drug Metabolism**, v. 19, n. 9, p. 739–749, 2018.
- WCULEK, S. K. et al. Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 1, p. 7–24, 2020.
- WEICHAND, B. et al. S1PR1 on tumor-associated macrophages promotes lymphangiogenesis and metastasis via NLRP3/IL-1 β . **Journal of Experimental Medicine**, v. 214, n. 9, p. 2695–2713, 2017.
- WHITTAKER, S. R. et al. Inhibitors of cyclin-dependent kinases as cancer therapeutics. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 173, p. 83–105, 2017.
- WILLETT, C. G. et al. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. **Nature**

- Medicine**, v. 10, n. 2, p. 145–147, 2004.
- WIMAN, K. G.; ZHIVOTOVSKY, B. Understanding cell cycle and cell death regulation provides novel weapons against human diseases. **Journal of Internal Medicine**, v. 281, n. 5, p. 483–495, 2017.
- WONG, R. S. Y. Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 30, n. 1, p. 87, 2011.
- WORKMAN, P. et al. How Much Longer Will We Put Up With 100,000 Cancer Drugs? **Cell**, v. 168, n. 4, p. 579–583, 2017.
- WU, L. et al. Tumor-associated neutrophils in cancer: Going pro. **Cancers**, v. 11, n. 4, 2019.
- WU, S. et al. Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development. **Nature**, v. 529, n. 7584, p. 43–47, 2016.
- WU, S. et al. Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.
- WU, S. Y. et al. Natural killer cells in cancer biology and therapy. **Molecular Cancer**, v. 19, n. 1, p. 1–26, 2020.
- XIA, C. et al. Reactive oxygen species regulate angiogenesis and tumor growth through vascular endothelial growth factor. **Cancer Research**, v. 67, n. 22, p. 10823–10830, 2007.
- XIE, Y. H.; CHEN, Y. X.; FANG, J. Y. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, 2020.
- YANG, H. et al. The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 37, n. 1, p. 1–10, 2018.
- YANG, L. et al. Multisite phosphorylation and network dynamics of cyclin-dependent kinase signaling in the eukaryotic cell cycle. **Biophysical Journal**, v. 86, n. 6, p. 3432–3443, 2004.
- YAO, M. et al. Cytokine Regulation of Metastasis and Tumorigenicity. **Advances in cancer research**, v. 132, p. 265–367, 2016.
- YARCHOAN, M. et al. Targeting neoantigens to augment. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 4, p. 209–222, 2017.
- YEHYA, A. H. S. et al. Broad spectrum targeting of tumor vasculature by medicinal plants: An updated review. **Journal of Herbal Medicine**, v. 9, p. 1–13, 2017.

- YEHYA, A. H. S. et al. Angiogenesis: Managing the culprits behind tumorigenesis and metastasis. **Medicina (Lithuania)**, v. 54, n. 1, p. 1–20, 2018.
- YUAN, B. et al. Effects of active bufadienolide compounds on human cancer cells and CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in mitogen-activated human peripheral blood mononuclear cells. **Oncology Reports**, v. 36, n. 3, p. 1377–1384, 2016.
- YUAN, Y. et al. TNF- α induces autophagy through ERK1/2 pathway to regulate apoptosis in neonatal necrotizing enterocolitis model cells IEC-6. **Cell Cycle**, v. 17, n. 11, p. 1390–1402, 2018.
- ZACHARIA, L. C. Permitted daily exposure of the androgen receptor antagonist flutamide. **Toxicological Sciences**, v. 159, n. 2, p. 279–289, 2017.
- ZHANG, B. et al. Acridine and its derivatives: A patent review (2009–2013). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 24, n. 6, p. 647–664, 2014.
- ZHANG, B. et al. Design, synthesis and biological research of novel N-phenylbenzamide-4-methylamine acridine derivatives as potential topoisomerase I/II and apoptosis-inducing agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 29, n. 23, p. 126714, 2019.
- ZHANG, H.; CHEN, J. Current status and future directions of cancer immunotherapy. **Journal of Cancer**, v. 9, n. 10, p. 1773–1781, 2018.
- ZHANG, J. et al. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.
- ZHANG, S. S. et al. Capsaicin enhances the antitumor activity of sorafenib in hepatocellular carcinoma cells and mouse xenograft tumors through increased ERK signaling. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 39, n. 3, p. 438–448, 2018.
- ZHANG, W. J. et al. IL-4-induced Stat6 activities affect apoptosis and gene expression in breast cancer cells. **Cytokine**, v. 42, n. 1, p. 39–47, 2008.
- ZHAO, X. et al. Tumor necrosis factor receptor 2-mediated tumor suppression is nitric oxide dependent and involves angiostasis. **Cancer Research**, v. 67, n. 9, p. 4443–4450, 2007.
- ZHAO, X. et al. TNF signaling drives myeloid-derived suppressor cell accumulation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 11, p. 4094–4104, 2012.
- ZHAO, Y. et al. Screening drugs for myocardial disease *in vivo* with zebrafish: an expert update. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 14, n. 4, p. 343–353, 2019.
- ZHAO, Y.; ADJEI, A. A. New Drug Development and Clinical Pharmacology Targeting Angiogenesis in Cancer Therapy: Moving Beyond Vascular

Endothelial Growth Factor. **The Oncologist**, v. 20, p. 660–673, 2015.

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. 2017, p. 1–9, 2018.

ZHU, X. D. et al. Antiangiogenic therapy promoted metastasis of hepatocellular carcinoma by suppressing host-derived interleukin-12b in mouse models. **Angiogenesis**, v. 16, n. 4, p. 809–820, 2013.

ZHU, Y.; HUANG, B.; SHI, J. Fas ligand and lytic granule differentially control cytotoxic dynamics of Natural Killer cell against cancer target. **Oncotarget**, v. 7, n. 30, p. 47163–47172, 2016.

ŽIVKOVIĆ, M. B. et al. Synthesis, characterization and in vitro cytotoxic activities of new steroidal thiosemicarbazones and thiadiazolines. **RSC Advances**, v. 6, n. 41, p. 34312–34333, 2016.

ZUAZO-GAZTELU, I.; CASANOVAS, O. Unraveling the role of angiogenesis in cancer ecosystems. **Frontiers in Oncology**, v. 8, p. 1–13, 2018.

Anexos

ANEXOS

Anexo A – Parecer da Comissão de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde (para ensaios com PBMCs)

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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: MARIANNA VIEIRA SOBRAL CASTELLO BRANCO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 22986519.0.0000.5188

Instituição Proponente: Centro De Ciências da Saúde

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Parcial

Detalhe:

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

Data do Envio: 05/03/2020

Situação da Notificação: Parecer Consustanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.935.975

Apresentação da Notificação:

Bem apresentada

Objetivo da Notificação:

Bem definido

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Realizada

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

Está dentro das normas exigidas

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentados corretamente pois a sede do estudo também recebeu os resultados parciais aqui

Endereço: UNIVERSITARIO S/N

Bairro: CASTELO BRANCO

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br

Anexo A – Parecer da Comissão de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde (para ensaios com PBMCs)

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



Continuação do Parecer: 3.935.975

descritos

Recomendações:

Vide conclusões

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Podem ser publicados os dados constantes no relatório aqui avaliado

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Parcial	DECLARACAO_PPgPNSB.PDF	05/03/2020 17:54:21	MARIANNA VIEIRA SOBRAL CASTELLO BRANCO	Postado
Envio de Relatório Parcial	RELATORIO_PARCIAL_AMTAC_06.pdf	05/03/2020 17:55:12	MARIANNA VIEIRA SOBRAL CASTELLO BRANCO	Postado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JOAO PESSOA, 26 de Março de 2020

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

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

Anexo B - Certidão da Comissão de Ética no Uso de Animais para os ensaios com peixe-zebra (*Danio rerio*)



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais

Reitoria



CERTIFICADO

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

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

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **09/2018** a **09/2021** Área: **Ciências Farmacêuticas**

Origem:	Unidade de Produção de Organismos Modelo Não Convencionais (UniPOM)						
Espécie:	Peixes	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 3 horas	N:	2400
Linhagem:	Danio rerio			Peso:	0 a 0 g		

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

João Pessoa, 03 de março de 2021

Profa. Dra. Jailane de Souza Aquino
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Carlos Augusto Alanis Clemente
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Anexo C - Certidão da Comissão de Ética no Uso de Animais para os ensaios com camundongos Swiss (*Mus musculus*)



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais

Reitoria



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Investigação da toxicidade não clínica e potencial antitumoral de um derivado acridínico em modelo de adenocarcinoma ascítico de Ehrlich", protocolada sob o CEUA nº 9129090919 (ID 000786), sob a responsabilidade de **Marianna Vieira Sobral** e equipe; Sânia Sousa Duarte - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 13/09/2019.

We certify that the proposal "Investigation of non-clinical toxicity and antitumor potential of an acridine derivative in the Ehrlich ascites adenocarcinoma model", utilizing 162 Heterogenics mice (162 females), protocol number CEUA 9129090919 (ID 000786), under the responsibility of **Marianna Vieira Sobral and team; Sânia Sousa Duarte** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 09/13/2019.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 10/2019 a 02/2020

Área: Ciências Farmacêuticas

Origem: Unidade de Produção Animal IPeFarM

Espécie: Camundongos heterogênicos

sexo: Fêmeas

idade: 6 a 8 semanas

N: 162

Linhagem: *Mus musculus* - Swiss

Peso: 28 a 32 g

Local do experimento: As atividades de pesquisa serão desenvolvidas no Laboratório de Oncofarmacologia (Oncofar), no biotério Prof. Thomas George, ambos situados no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) onde funciona o Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde (PPgPNSB/CCS), todos pertencentes à Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

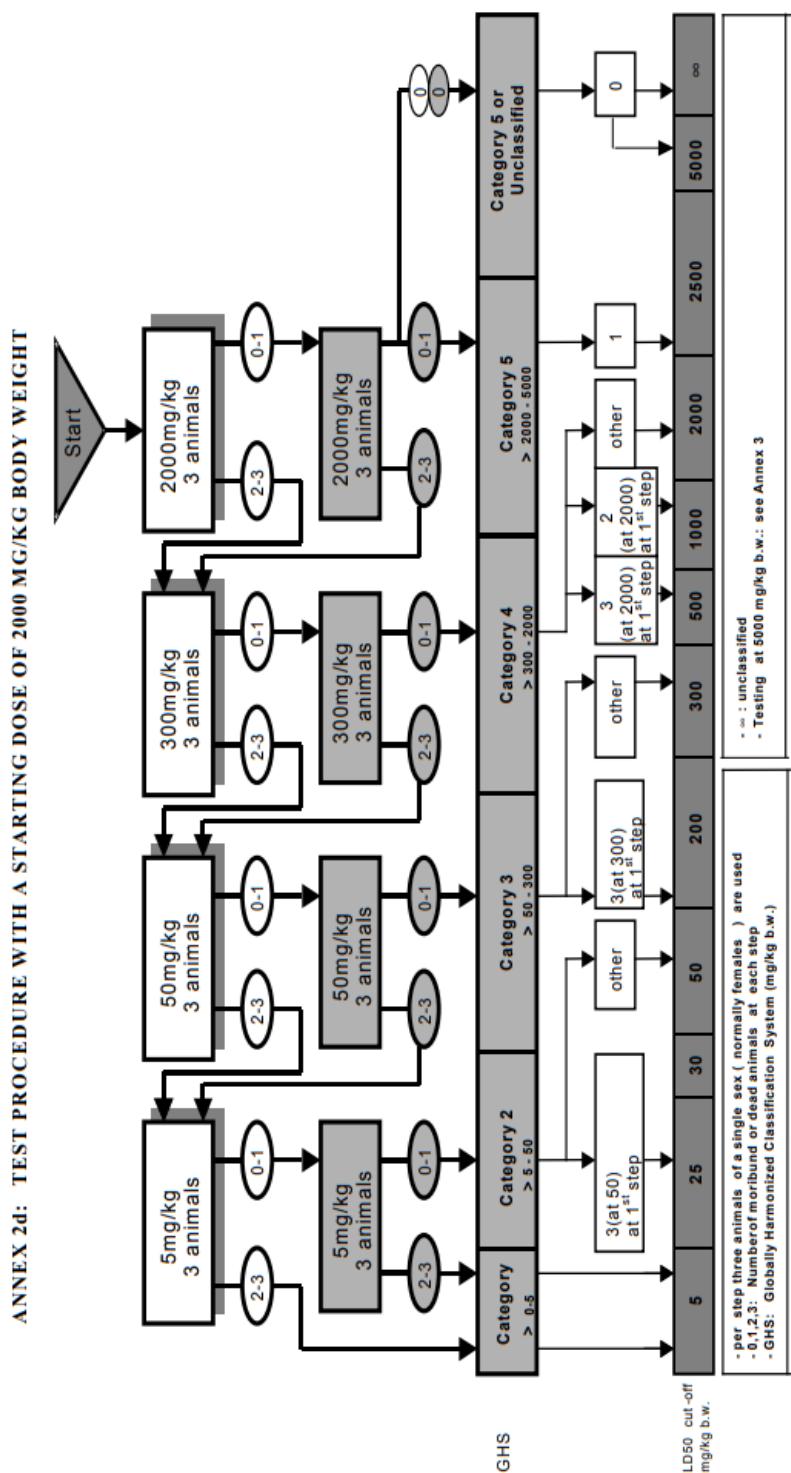
João Pessoa, 25 de setembro de 2019

Islânia Gisela A. Gonçalves

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

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

Anexo D - Fluxograma de realização do teste de toxicidade aguda em camundongos, com dose inicial de 2000 mg/kg



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

Anexo E – Protocolo experimental de Triagem Farmacológica Comportamental

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

Fonte: DE ALMEIDA et al. (1999)

Apêndice

Artigos publicados durante o doutorado

Apêndice A – Artigo publicado na revista *Anticancer Research* (Fator de impacto 1,994; Qualis B1)

ANTICANCER RESEARCH 40: 5049-5057 (2020)
doi:10.21873/anticanres.14508

Anticancer Effect of a Spiro-acridine Compound Involves Immunomodulatory and Anti-angiogenic Actions

SÂMIA SOUSA DUARTE¹, DAIANA KARLA FRADE SILVA¹, THAÍS MANGEON HONORATO LISBOA¹,
RAWNY GALDINO GOUVEIA¹, RAFAEL CARLOS FERREIRA¹,
RICARDO OLÍMPIO DE MOURA², JAMIRE MURIEL DA SILVA³,
ÉSSIA DE ALMEIDA LIMA⁴, SANDRA RODRIGUES-MASCARENHAS^{1,4},
PATRICIA MIRELLA DA SILVA⁵, DAVI FELIPE FARIAS⁶,
JULIANA ALVES DA COSTA RIBEIRO SOUZA⁶, KARINA CARLA DE PAULA MEDEIROS⁷,
JUAN CARLOS RAMOS GONÇALVES⁸ and MARIANNA VIEIRA SOBRAL^{1,8}

¹Post Graduation Program in Bioactive Natural and Synthetic Products,
Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil;

²Drug Development and Synthesis Laboratory, Department of Pharmacy,
State University of Paraíba, João Pessoa, Brazil;

³Post Graduation Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil;

⁴Multicenter Postgraduate Program in Physiological Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil;

⁵Department of Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil;

⁶Laboratory of Risk Assessment for Novel Technologies,

Department of Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil;

⁷Department of Morphology, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil;

⁸Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

Abstract. *Background/Aim:* Studies with acridine compounds have reported anticancer effects. Herein, we evaluated the toxicity and antitumor effect of the (E)-1'-(4-chlorobenzylidene)amino)-5'-oxo-1',5'-dihydro-10H-spiro[acridine-9,2'-pyrrole]-4'-carbonitrile (AMTAC-06), a promising anticancer spiro-acridine compound. *Materials and Methods:* The toxicity of AMTAC-06 was evaluated on zebrafish and mice. Antitumor activity was assessed in Ehrlich ascites carcinoma model. Effects on angiogenesis, cytokine levels and cell cycle were also investigated. *Results:* AMTAC-06 did not induce toxicity on zebrafish and mice (LD_{50} approximately 5000 mg/kg, intraperitoneally). No genotoxicity was observed on micronucleus assay. AMTAC-06 significantly reduced the total viable Ehrlich tumor cells

and increased sub-G₁ peak, suggesting apoptosis was triggered. Moreover, the compound significantly decreased the density of peritumoral microvessels, indicating an anti-angiogenic action, possibly dependent on the cytokine modulation (TNF- α , IL-1 β and IFN- γ). No significant toxicological effects were recorded for AMTAC-06 on tumor transplanted animals. *Conclusion:* AMTAC-06 has low toxicity and a significant antitumor activity.

The mechanisms underlying the transformation of normal cells into malignant cells have been thoroughly studied, aiming to better understand the biology of cancer and develop new treatments. Researchers have described common traits acquired during tumorigenesis, including sustaining proliferative signaling, induction of angiogenesis, deregulation of cell cycle, resistance to cell death and tumor-promoting inflammation (1-3). These hallmarks are important therapeutic targets for new antitumor drug development (3, 4).

Acridines are heterocyclic molecules containing a planar ring, which have shown anti-inflammatory, anticancer, antiparasitic, antiviral, and antimicrobial activities, among others (5). Their antitumor action is based on DNA binding and topoisomerase inhibition (6), which may cause apoptosis and cell cycle arrest (7). Nevertheless, acridine compounds

Correspondence to: Dr. Marianna Vieira Sobral, Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos, Universidade Federal da Paraíba - Campus I, Jardim Universitário, S/N, Castelo Branco, CEP: 58051-900, João Pessoa, PB, Brasil. Tel: +55 83988123555, e-mail: mariannavbs@gmail.com

Key Words: Spiro-acridine, antitumor activity, anti-angiogenic activity, immunomodulation, zebrafish, Ehrlich ascites carcinoma model.

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



Communication

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



Abstract: Tumor cells have specific features, including angiogenesis induction, cell cycle dysregulation, and immune destruction evasion. By inducing a T helper type 2 (Th2) immune response, tumor cells may favor immune tolerance within the tumor, which allows progression of cancer growth. Drugs with potential antitumor activity are the spiro-acridines, which is a promising new class of acridine compounds. Herein, the novel spiro-acridine (*E*)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimethoxybenzylidene)amino)-1',5'-dihydro-10*H*-spiro[acridine-9,2'-pyrrole]-4'-carbonitrile (AMTAC-17) was synthesized and tested for antitumor effects. Toxicity evaluation was performed in mice after acute treatment (2000 mg/kg, intraperitoneally, i.p.). The Ehrlich ascites carcinoma model was used to investigate the antitumor activity of AMTAC-17 (12.5, 25, or 50 mg/kg, i.p.) after seven days of treatment. Effects on the cell cycle, angiogenesis, and inflammatory responses were investigated. LD₅₀ (lethal dose 50%) was estimated to be higher than 5000 mg/kg. AMTAC-17 reduced the Ehrlich tumor's total viable cancer cells count and peritumoral micro-vessels density, and induced an increase in the sub-G1 peak. Additionally, there was an increase of Th1 cytokine profile levels (IL-1 β , TNF- α , and IL-12). In conclusion, the spiro-acridine compound AMTAC-17 presents low toxicity, and its in vivo antitumor effect involves modulation of the immune system to a cytotoxic Th1 profile and a reduction of tumor angiogenesis.

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

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



Communication

Toxicity and Antitumor Activity of a Thiophene–Acridine Hybrid

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

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

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

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

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

⁵ Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, 58051-970 João Pessoa, Paraíba, Brazil

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

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



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

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

1. Introduction

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

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

19109

Brazilian Journal of Development

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

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

DOI:10.34117/bjdv5n10-144

Recebimento dos originais: 10/09/2019

Aceitação para publicação: 11/10/2019

Bruno Hanry Melo de Oliveira

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

Universidade Federal da Paraíba

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

Email: hanrygb@hotmail.com

Luiz André Araujo Silva

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

Universidade Federal da Paraíba

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

Email: luiz32@gmail.com

Fernando Ferreira Leite

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

Universidade Federal da Paraíba

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

Email: fernandoferreira_15@gmail.com

Gabrielly Diniz Duarte

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

Universidade Federal da Paraíba

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

Email: gabriellyduarte@gmail.com

Sâmia Sousa Duarte

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

Universidade Federal da Paraíba

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

Email: samiasduarte@gmail.com

Daiana Karla Frade Silva

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

Marianna Vieira Sobral

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

Luis Cézar Rodrigues

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

ABSTRACT

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

Keywords: synthesis; kadsurenin; lignans; neolignans.

RESUMO

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

Palavras-chave: Síntese; Kadsurenin; Lignanas; Neolignanas

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

20779

Brazilian Journal of Development

Synthesis of 2',4,4'-trimethoxychalcon and in vitro cytotoxic study in human tumor cells

Síntese da 2',4,4'-trimetoxichalcona e estudo citotóxico in vitro em células tumorais humanas

DOI:10.34117/bjdv5n10-255

Recebimento dos originais: 20/09/2019

Aceitação para publicação: 18/10/2019

Tamyrys Fernandes Vilar Bento

Graduanda em Biotecnologia pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Universidade Federal da Paraíba

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

E-mail: tamyrysfvb@gmail.com

Luiz André Araujo Silva

Programa de Pós-Graduação Em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Universidade Federal da Paraíba

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

E-mail: luiz32@gmail.com

Flávio Valadares Pereira Borges

Programa de Pós-Graduação Em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Universidade Federal da Paraíba

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

E-mail: flavinhovb@gmail.com

Bruno Hanry Melo de Oliveira

Biomédico especialista em Biologia Molecular, mestrando em Biotecnologia pela Universidade Federal da Paraíba – UFPB

Universidade Federal da Paraíba

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

58033-455

E-mail: hanrygb@hotmail.com

Fernando Ferreira Leite

Programa de Pós-Graduação Em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Universidade Federal da Paraíba

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

58033-455

E-mail: fernandoferreira_15@gmail.com

Sâmia Sousa Duarte

Programa de Pós-Graduação Em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB)
 Universidade Federal da Paraíba
 Endereço: R. Tab. Stanislau Eloy, 41-769 - Conj. Pres. Castelo Branco III, João Pessoa - PB,
 58033-455
 E-mail: samiasduarte@gmail.com

Marianna Vieira Sobral

Professora da Universidade Federal da Paraíba – UFPB
 Programa de Pós-Graduação Em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB)
 Universidade Federal da Paraíba
 Endereço: R. Tab. Stanislau Eloy, 41-769 - Conj. Pres. Castelo Branco III, João Pessoa - PB,
 58033-455
 E-mail: mariannavbs@gmail.com

Luis Cézar Rodrigues

Professor da Universidade Federal da Paraíba – UFPB
 Programa de Pós-Graduação Em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos e Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB)
 Universidade Federal da Paraíba
 Endereço: R. Tab. Stanislau Eloy, 41-769 - Conj. Pres. Castelo Branco III, João Pessoa - PB,
 58033-455
 E-mail: luiscezarodrigues@gmail.com

ABSTRACT

Chalcones are a class of natural compounds, aromatic ketones that forms central core for several important pharmacological activities reported such as anticarcinogenicity and antioxidation activities. Due to those important properties, the purpose of this work is the organic synthesis of 2',4,4'-trimethoxychalcone and its cytotoxicity test against four human tumor cell lines: HL-60 (human promyelocytic leukemia), HCT-116 (human colorectal carcinoma), MCF-7 (human breast adenocarcinoma) and K562 (chronic myeloid leukemia) and also evaluated in normal cells L929 (murine fibroblast). The synthesis of 2', 4,4'-trimethoxychalcone was successful and in the viability cell assay (MTT assay), the HL-60 strain was found to have an inhibitory potential of 84.5% and an IC₅₀ of approximately 20.84 µM.

Keywords: Chalcone, Organic Synthesis, Cytotoxicity, Aldol Condensation, HL-60.

RESUMO

As chalconas são uma classe de compostos naturais, cetonas aromáticas que são o núcleo central de diversas atividades farmacológicas importantes relatadas tais quais anticarcinogenicidade e antioxidante. Devido a estas importantes propriedades, o objetivo deste trabalho é a síntese da 2',4,4'-trimetoxichalcona e seu teste de citotoxicidade em quatro linhagens de células tumorais humanas: HL-60 (leucemia promielocítica aguda), HCT-116 (carcinoma colorretal humano), MCF-7 (adenocarcinoma da mama humano) e K562 (leucemia mielóide crônica) em células normais L929 (fibroblasto murino). A síntese da 2',4,4'-trimetoxichalcona foi bem-sucedida e no ensaio de

Apêndice F – Artigo publicado na revista *Biomedicine & Pharmacotherapy* (Fator de impacto: 3,743; Qualis A2)

Biomedicine & Pharmacotherapy 128 (2020) 110247



Original article

A novel piperine analogue exerts *in vivo* antitumor effect by inducing oxidative, antiangiogenic and immunomodulatory actions



Rafael Carlos Ferreira^a, Tatianne Mota Batista^a, Sânia Sousa Duarte^a, Daiana Karla Frade Silva^a, Thaís Mangeon Honorato Lisboa^a, Raquel Fragoso Pereira Cavalcanti^a, Fagner Carvalho Leite^a, Vivianne Mendes Mangueira^a, Tatyanna Kélvia Gomes de Sousa^a, Renata Albuquerque de Abrantes^a, Emmely Oliveira da Trindade^b, Petrônio Filgueiras de Athayde-Filho^b, Maria Cláudia Rodrigues Brandão^b, Karina Carla de Paula Medeiros^c, Davi Felipe Farias^d, Marianna Vieira Sobral^{a,*}

^a Postgraduate Program in Natural Products and Bioactive Synthetics, Federal University of Paraíba, 58051-970, João Pessoa, Paraíba, Brazil

^b Postgraduate Program in Chemistry, Federal University of Paraíba, 58051-970, João Pessoa, Paraíba, Brazil

^c Department of Morphology, Center of Biosciences, Federal University of Rio Grande Do Norte, 59078-970, Rio Grande do Norte, Brazil

^d Department of Molecular Biology, Federal University of Paraíba, 58051-970, João Pessoa, Paraíba, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Piperine analogue
Non-clinical toxicity
Zebrafish
Oxidative stress
Angiogenesis
Tumor microenvironment.

ABSTRACT

Structural diversity characterizes natural products as prototypes for design of lead compounds. The aim of this study was to synthesize, and to evaluate the toxicity and antitumor action of a new piperine analogue, the butyl 4-(4-nitrobenzoate)-piperinoate (DE-07). Toxicity was evaluated against zebrafish, and in mice (acute and micronucleus assays). To evaluate the DE-07 antitumor activity Ehrlich ascites carcinoma model was used in mice. Angiogenesis, Reactive Oxygen Species (ROS) production and cytokines levels were investigated. Ninety-six hours exposure to DE-07 did not cause morphological or developmental changes in zebrafish embryos and larvae, with estimated LC₅₀ (lethal concentration 50%) higher than 100 µg/mL. On the acute toxicity assay in mice, LD₅₀ (lethal dose 50%) was estimated at around 1000 mg/kg, intraperitoneally (i.p.). DE-07 (300 mg/kg, i.p.) did not induce increase in the number of micronucleated erythrocytes in mice, suggesting no genotoxicity. On Ehrlich tumor model, DE-07 (12.5, 25 or 50 mg/kg, i.p.) induced a significant decrease on cell viability. In addition, there was an increase on ROS production and a decrease in peritumoral microvessels density. Moreover, DE-07 induced an increase of cytokines levels involved in oxidative stress and antiangiogenic effect (IL-1β, TNF-α and IL-4). No significant clinical toxicological effects were recorded in Ehrlich tumor transplanted animals. These data provide evidence that DE-07 presents low toxicity, and antitumor effect *via* oxidative and antiangiogenic actions by inducing modulation of inflammatory response in the tumor microenvironment.

1. Introduction

Cancer is a group of diseases whose cells proliferate uncontrollably and induce metastasis, causing significant morbidity and mortality [1–3].

During carcinogenesis, tumor cells acquire malignant characteristics, including sustained proliferation even in the absence of external stimuli [4]; angiogenesis, for the supply of oxygen and nutrients [5]; and chronic inflammation associated with the release of several inflammatory mediators that regulate the extensive networks implicated in several cancer hallmarks [6,7].

Angiogenesis, a process of forming new blood vessels from pre-existing vessels, also allows the removal of tumor metabolism products [5,8], genetic instability, inflammation, microenvironmental rupture, invasion and metastasis [9]. Thus, various agents in clinical practice and others in clinical development interfere with the signals that promote angiogenesis [10], constituting one of the most important anti-tumor strategies [11].

Tumor cells coexist and coevolve with their stroma, and they together create the tumor microenvironment [12,13]. Direct interaction established between tumor cells and other components of the tumor microenvironment occurs through direct contact or release of soluble

* Corresponding author.

E-mail address: mariannavbs@lft.ufpb.br (M.V. Sobral).

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110247>

Received 16 December 2019; Received in revised form 1 May 2020; Accepted 10 May 2020
0753-3322/ © 2020 The Author(s). Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/>).

Apêndice G – Artigo publicado na Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (Fator de impacto: 1,024; Qualis A2)

Original Article

Braz. J. Vet. Parasitol., Jaboticabal, v. 26, n. 4, p. 401-410, oct.-dec. 2017

ISSN 0103-846X (Print) / ISSN 1984-2961 (Electronic)

Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612017061>

Growth, mortality and susceptibility of oyster *Crassostrea* spp. to *Perkinsus* spp. infection during on growing in northeast Brazil

Crescimento, mortalidade e susceptibilidade de ostras *Crassostrea* spp. à infecção por *Perkinsus* spp. em cultivo no Nordeste do Brasil

Marcos Paiva Scardua^{1,2}; Rogério Tubino Vianna^{3,4}; Sânia Sousa Duarte⁵; Natanael Dantas Farias⁵; Maria Luíza Dias Correia⁵; Helen Taynara Araújo dos Santos³; Patricia Mirella da Silva^{3,5*}

¹ Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracajú, SE, Brasil

² Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Ceará – IFCE, Aracati, CE, Brasil

³ Núcleo de Engenharia de Pesca, Universidade Federal de Sergipe – UFS, Aracajú, SE, Brasil

⁴ Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, RS, Brasil

⁵ Laboratório de Imunologia e Patologia de Invertebrados, Departamento de Biologia Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba – UFPB, João Pessoa, PB, Brasil

Received May 18, 2017

Accepted October 4, 2017

Abstract

Crassostrea rhizophorae and *C. gasar* oysters are cultivated in the northeast region. *Perkinsus* parasites infect bivalves, and their effects on oysters from tropical regions are poorly understood. This study evaluated the impact of *Perkinsus* infection on the productive traits of native oysters. Oysters were sampled bimonthly during 7 months, from July 2010 to February 2011, to evaluate growth rate, mortality and shell color patterns (white and dark-gray) (n = 500), and to determine the prevalence and intensity of *Perkinsus* (n = 152). *Perkinsus* and *Crassostrea* species were determined using molecular tools. Results showed that most dark-gray (90%, n = 20) and white (67%, n = 18) oysters were *C. gasar* and *C. rhizophorae*, respectively. Oysters showed a high growth rate and moderate cumulative mortality (44%). *C. gasar* oysters grew better and showed lower mortality and lower incidence of *Perkinsus* compared to *C. rhizophorae*. The mean prevalence of *Perkinsus* was moderate (48%), but the infection intensity was light (2.2). Perkinsosis affected very small oysters (19.4 mm). In conclusion, native oysters, especially *C. gasar*, have a great potential for culture, mortality is not associated with perkinsosis, and the shell color of oysters can be used to improve selection for spats with better performance.

Keywords: Oyster productive traits, *Perkinsus marinus*, *Perkinsus beihaiensis*, PCR-RFLP, ITS rDNA, 16S mtDNA.

Resumo

Crassostrea rhizophorae e *C. gasar* são cultivadas na região Nordeste. Parasitas *Perkinsus* infectam bivalves e seus efeitos em ostras de regiões tropicais são pouco compreendidos. Este estudo avaliou o impacto da infecção por *Perkinsus* em parâmetros de produção de ostras nativas. Ostras foram coletadas bimestralmente durante 7 meses, de julho de 2010 a fevereiro de 2011, para avaliar crescimento, mortalidade e padrão de coloração da concha (branca e cinza-escura) (n = 500); além da presença e intensidade de *Perkinsus* (n = 152). *Perkinsus* e *Crassostrea* foram identificados por abordagem molecular. Os resultados mostraram que as ostras cinza-escuras (90%, n = 20) e brancas (67%, n = 18) eram *C. gasar* e *C. rhizophorae*, respectivamente. As ostras mostraram uma boa taxa de crescimento e mortalidade acumulada moderada (44%). *C. gasar* cresceu melhor com menor mortalidade e menor incidência de *Perkinsus* que *C. rhizophorae*. A prevalência média de *Perkinsus* foi moderada (48%), mas a intensidade de infecção foi leve (2,2). A perkinsose afetou ostras pequenas (19,4 mm). Em conclusão, ostras nativas, especialmente *C. gasar*, têm grande potencial de produção; sem mortalidade associada à perkinsose; e, a cor da concha pode ser usada para melhorar a seleção de sementes com melhor desempenho.

Palavras-chave: Parâmetros de produção de ostras, *Perkinsus marinus*, *Perkinsus beihaiensis*, PCR-RFLP, ITS rDNA, 16S mtDNA.

*Corresponding author: Patricia Mirella da Silva. Departamento de Biologia Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba – UFPB, Jardim Universitário, s/n, Bairro Castelo Branco, CEP 58051-900, João Pessoa, PB, Brasil. e-mail: mirella_dasilva@hotmail.com

Apêndice H – Artigo publicado na revista *Experimental Parasitology* (Fator de impacto: 1,69; Qualis A4)



Effect of antiprotozoal molecules on hypnospores of *Perkinsus* spp. parasite

Sâmia Sousa Duarte^a, Ricardo Olímpio de Moura^b, Patricia Mirella da Silva^{a,*}



^a Laboratório de Imunologia e Patologia de Invertebrados, Departamento de Biologia Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba – Campus I, 58051-900, João Pessoa, PB, Brazil

^b Laboratório de Síntese e Veterização de Moléculas, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, 58070-450, João Pessoa, PB, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
2-Aminothiophene
Acylhydrazone
Tricosan
Antiprotozoal activity
Perkinsus
Hypnospores
Metabolic activity

ABSTRACT

Perkinsus protozoan parasites have been associated with high mortality of bivalves worldwide, including Brazil. The use of antiproliferative drugs to treat the Perkinsosis is an unusual prophylactic strategy. However, because of their environment impact it could be used to control parasite proliferation in closed system, such as hatchery. This study evaluated the anti-*Perkinsus* activity potential of synthesized and commercial compounds. Viability of hypnospores of *Perkinsus* spp. was assessed *in vitro*. Cells were incubated with three 2-amino-thiophene (6AMD, 6CN, 5CN) and one acylhydrazone derivatives (AMZ-DCL), at the concentrations of 31.25; 62.5; 125; 250 and 500 µM and one commercial chlorinated phenoxy phenol derivative, tricosan (2, 5, 10 and 20 µM), for 24–48 h. Two synthetic molecules (6CN and AMZ-DCL) caused a significant decline (38 and 39%, respectively) in hypnospores viability, at the highest concentration (500 µM), after 48 h. Tricosan was the most cytotoxic compound, causing 100% of mortality at 20 µM after 24 h and at 10 µM after 48 h. Cytotoxic effects of the compounds 6CN, AMZ-DCL, and tricosan were investigated by measuring parasite's zoosporulation, morphological changes and metabolic activities (esterase activity, production of reactive oxygen species and lipid content). Results showed that zoosporulation occurred in few cell. Tricosan caused changes in the morphology of hypnospores. The 6CN and AMZ-DCL did not alter the metabolic activities studied whilst Tricosan significantly increased the production of reactive oxygen species and changed the amount and distribution of lipids in the hypnospores. These results suggest that three compounds had potential to be used as antiprotozoal drugs, although further investigation of their mechanism of action must be enlightened.

1. Introduction

Perkinsus protozoan parasites have been associated with high mortality of bivalves worldwide (Villalba et al., 2011). Distribution range of Perkinsosis has been expanding in the last few years (Cáceres-Martínez et al., 2012; Dang et al., 2015; Ruano et al., 2015), including reports of *Perkinsus marinus*, *P. Olsenii*, *P. chesapeakei* in the northeastern (NE) coast of Brazil (da Silva et al., 2014, 2013; Dantas Neto et al., 2016; Queiroga et al., 2015). *Perkinsus marinus* is one of the most well studied parasites associated with extensive oyster *Crassostrea virginica* mortalities in the states of Maryland and Virginia (US), where the economic losses were drastic (Gouletquer et al., 1994). Thus, it is imperative to established preventive control strategies in order to avoid spreading of disease. Some of these practices include prohibiting the transfer of bivalves from areas where the disease was detected or develop a selective breeding program for resistance to the parasite; the latter is expensive and time consuming (see review of Dégremont et al., 2015). These practices are

accompanied by intensive legislative measures, including committees and national strategic plan for aquatic animal health, which will establish precautionary measures, disease surveillance, controls and management of aquatic animal diseases (Oidtmann et al., 2011; Rodgers et al., 2015). In contrast, the use of drugs for the treatment of infected hosts is not a current practice. However, it might be helpful in closed systems, such as hatcheries facilities to treat broodstock, larvae and spat before commercialization.

The hypnospore is a life stage of *Perkinsus* parasites that develops from the trophozoite. It is believed that when the host dies, and tissue conditions are no longer favourable for parasite proliferation, trophozoites enlarge and become a resistant cell, with a thick wall. When hypnospores enter in contact with seawater a zoosporulation process starts, with successive intracellular divisions of cells to produce numerous biflagellate zoospores (Casas et al., 2002; Sunila et al., 2001). There are few studies focusing on this stage of the life cycle (Casas and La Peyre, 2013).

* Corresponding author. Laboratório de Imunologia e Patologia de Invertebrados, Departamento de Biologia Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba – UFPB, Campus I, CEP 58051-900, João Pessoa, PB, Brazil.

E-mail addresses: samiasduarte@gmail.com (S.S. Duarte), ricardo.olimpiodemoura@gmail.com (R.O. de Moura), mirella_dasilva@hotmail.com (P.M. da Silva).