

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

VALGRÍCIA MATIAS DE SOUSA

**Mecanismos de ação anticâncer colorretal *in vitro* e toxicidade em
modelo de peixe-zebra do derivado acridínico AMTAC-19**

JOÃO PESSOA - PB

2025

VALGRÍCIA MATIAS DE SOUSA

Mecanismos de ação anticâncer colorretal *in vitro* e toxicidade em modelo de peixe-zebra do derivado acridínico AMTAC-19

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

Orientadora: Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral

Coorientador: Prof. Dr. Juan Carlos Ramos Gonçalves

JOÃO PESSOA – PB

2025

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S725m Sousa, Valgrícia Matias de.

Mecanismos de ação anticâncer colorretal in vitro e toxicidade em modelo de peixe-zebra do derivado acridínico AMTAC-19 / Valgrícia Matias de Sousa. - João Pessoa, 2025.

185 f. : il.

Orientação: Marianna Vieira Sobral.

Coorientação: Juan Carlos Ramos Gonçalves.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Produtos Naturais - Atividade antitumoral. 2. Carcinoma colorretal. 3. Composto espiro-acridínico - Atividade antitumoral. 4. Composto espiro-acridínico - Toxicidade. 5. Estresse oxidativo. 6. Docking molecular. I. Sobral, Marianna Vieira. II. Gonçalves, Juan Carlos Ramos. III. Título.

UFPB/BC

CDU 547.9(043)



PgPNBSB

Pós Graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos

Ata da 383ª (trecentésima octogésima terceira) Tese de Doutorado do(a) aluno(a) do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos **Valgrícia Matias de Sousa**, candidato(a) ao Título de “Doutor(a)” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia.

Às nove horas (09h00) do dia vinte e nove de janeiro do ano dois mil e vinte e cinco (29/01/2025), em ambiente virtual de videoconferência através do aplicativo Google Meet, link: <https://meet.google.com/gei-hnhs-pks>, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar o(a) discente **Valgrícia Matias de Sousa**, candidato(a) ao Título de “DOUTOR(A)” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia. Foram componentes da Banca Examinadora os pesquisadores Teresinha Gonçalves da Silva, Ph.D em Ciências Biológicas; Claudio Roberto Bezerra dos Santos, Ph.D em Farmacologia; Felipe Queiroga Sarmiento Guerra, Ph.D em Farmacologia, Ricardo Dias de Castro, Ph.D em Farmacologia; Juan Carlos Ramos Gonçalves, Ph.D em Farmacologia; e Marianna Vieira Sobral, Ph.D em Farmacologia. Sendo a primeira, integrante do corpo docente da Universidade Federal de Pernambuco e os demais, integrantes do corpo docente da Universidade Federal da Paraíba. Dando início aos trabalhos, o(a) Presidente da Banca, professor(a) Marianna Vieira Sobral, após declarar os objetivos da reunião, apresentou o(a) candidato(a) **Valgrícia Matias de Sousa**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado “**Mecanismos de ação anticâncer colorretal *in vitro* e avaliação da toxicidade não clínica em modelo de peixe-zebra do derivado acridínico (E)-1'-((4-bromo-benzilideno)amino)5'-oxo-1'5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-19)**”. Após discorrer sobre o referido tema durante cerca de cinquenta minutos, o(a) candidato(a) foi arguido(a) pelos Examinadores na forma Regimental. Em seguida, passou a comissão, em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito **APROVADO(A)**. Em face da aprovação, declarou o(a) Presidente, achar-se o(a) examinado(a) **Valgrícia Matias de Sousa**, legalmente habilitado(a) a receber o Título de “DOUTOR(A)” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na Área de Concentração Farmacologia, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que o(a) mesmo(a) faz jus. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da Comissão e pelo(a) discente.

Prof.^a Dr.^a Marianna Vieira Sobral (Orientadora)

Prof. Dr. Juan Carlos Ramos Gonçalves (Coorientador)

Prof.^a Dr.^a Teresinha Gonçalves da Silva (Examinadora)

Prof. Dr. Claudio Roberto Bezerra dos Santos (Examinador)

Prof. Dr. Felipe Queiroga Sarmiento Guerra (Examinador)

Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro (Examinador)

Valgrícia Matias de Sousa (Discente)



Documento assinado digitalmente
VALGRÍCIA MATIAS DE SOUSA
Data: 14/02/2025 15:27:26-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>



Documento assinado digitalmente
MARIANNA VIEIRA SOBRAL
Data: 05/02/2025 09:33:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>
Documento assinado digitalmente



JUAN CARLOS RAMOS GONCALVES
Data: 05/02/2025 10:08:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>
Documento assinado digitalmente



TERESINHA GONCALVES DA SILVA
Data: 05/02/2025 10:48:23-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>



Documento assinado digitalmente
CLAUDIO ROBERTO BEZERRA DOS SANTOS
Data: 05/02/2025 15:49:28-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>



Documento assinado digitalmente
FELIPE QUEIROGA SARMENTO GUERRA
Data: 09/02/2025 14:59:42-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>



Documento assinado digitalmente
RICARDO DIAS DE CASTRO
Data: 12/02/2025 11:07:29-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>





MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

ATA Nº 1 / 2025 - PPGPN (11.01.37.17)

Nº do Protocolo: 23074.028049/2025-11

João Pessoa-PB, 25 de Março de 2025

**ERRATA DA ATA DA 383ª (TRECENTÉSIMA OCTOGÉSIMA TERCEIRA)
SOLENIDADE PÚBLICA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DA ALUNA
VALGRÍCIA MATIAS DE SOUSA**

No Título:

ONDE SE LÊ:

“Mecanismos de ação anticâncer colorretal in vitro e avaliação da toxicidade não clínica em modelo de peixe-zebra do derivado acridínico (E)-1'-((4-bromo-benzilideno)amino)5'-oxo-1'5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-19)”

LEIA-SE:

“Mecanismos de ação anticâncer colorretal in vitro e toxicidade em modelo de peixe-zebra do derivado acridínico AMTAC-19”

Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (Mestrado e Doutorado), em João Pessoa/ PB.

(Assinado digitalmente em 25/03/2025 10:42)
NILMAR NINIA NEVES DE MEDEIROS
ASSISTENTE EM ADMINISTRACAO
Matrícula: 1997322

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufpb.br/documentos/> informando seu número: **1**, ano: **2025**, documento(espécie): **ATA**, data de emissão: **25/03/2025** e o código de verificação: **76dbcfc7b1**

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

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, minha eterna gratidão por todas as conquistas alcançadas e por sua fidelidade e amor incondicionais, sempre me guiando pelos melhores caminhos e permanecendo ao meu lado em cada passo da jornada.

Aos meus pais, **José Agrício de Sousa Filho** e **Josivalda Matias de Sousa**, por serem minha força diária e meus alicerces. Pelos ensinamentos de amor, respeito e empatia que me inspiraram a ser uma pessoa melhor, e por compreenderem e apoiarem minhas escolhas, sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis, sendo meu consolo e porto seguro. Agradeço a Deus por me ter concedido pais maravilhosos e dedicados.

Aos meus irmãos, **Adiel Agrício Matias de Sousa** e **José Agrício de Sousa Neto**, que sempre estiveram ao meu lado, tanto nas conquistas quanto nas dificuldades. Pela amizade sincera, pela união constante, pelas palavras de carinho e pelo apoio incondicional. Obrigada por serem meus melhores amigos.

Aos meus queridos avós, **Maria do Livramento Santos de Souza** (*in memoriam*), **José Agrício de Souza** (*in memoriam*), **Joana Matias da Silva** e **Pedro Maia da Silva** (*in memoriam*), agradeço por serem verdadeiros exemplos de amor, fé e humildade. Vocês me ensinaram a valorizar cada conquista, e seus gestos de carinho e atenção permanecerão para sempre em meu coração. Sou grata pelos valiosos conselhos e pelas orações que tanto me fortaleceram.

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

Às minhas amigas, **Alzimary Cavalcante**, **Bianca Barros**, **Nayara Cristina**, **Namibia Kelly** e **Thaynara Amaral**, pelas conversas e momentos compartilhados.

Aos meus amigos do Laboratório de Oncofarmacologia (OncoFar), **Ana Paula**, **Renata**, **Mariana**, **Isione**, **Geovana**, **Heivila**, **Karinne**, **Paulo Bruno**, **Moisés**, **Ramon**, **Junior**, **Erika**, **Gabriela**, **Pablo**, **Isabela** e **Victor Hugo** pelo apoio e contribuição neste trabalho. E, em especial, aos meus amigos **Rafael** e **Sâmia**, por todas as conversas, pelo companheirismo e pelos ensinamentos, pelo carinho e pela dedicação. Agradeço por estarem ao meu lado em todos os momentos, segurando

minha mão e me apoiando. Sou imensamente grata a Deus pela bênção de ter a amizade de vocês.

Ao meu coorientador, **Dr. Juan Carlos Ramos Gonçalves** por todos os ensinamentos passados, pela paciência e dedicação.

À minha orientadora, **Dra. Marianna Vieira Sobral**, por todo o apoio e incentivo diários, por sempre me acolher e orientar meus passos ao longo de toda a jornada do doutorado. Agradeço imensamente a Deus pela sua vida e pelo dom de ensinar, pelos valiosos conhecimentos compartilhados e pelas discussões enriquecedoras que tanto contribuíram para o meu crescimento.

Aos professores **Dra. Teresinha Gonçalves da Silva, Dr. Claudio Roberto Bezerra dos Santos, Dr. Felipe Queiroga Sarmiento Guerra e Dr. Ricardo Dias de Castro** pela disponibilidade e gentileza de participar da avaliação deste trabalho. Tenho certeza de que as sugestões aqui sugeridas serão extremamente valiosas.

Agradeço aos professores **Dra. Luciana Scotti e Dr. Marcus Tullius Scotti**, e à **Me. Natália Ferreira de Sousa** do Laboratório de Quimioinformática (UFPB) pela parceria no *docking* molecular. Ao prof. **Dr. Davi Felipe Farias** do Laboratório de Avaliação de Risco de Novas Tecnologias (LabRisco/UFPB) pela parceria na avaliação da toxicidade. E ao prof. **Dr. Ricardo Olímpio de Moura** do Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM/UEPB) pelo fornecimento da molécula que foi testada durante o doutorado.

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

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

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

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

A **CAPES** pelo apoio financeiro.

Valgrícia Sousa

SOUSA, V. M. **Mecanismos de ação anticâncer colorretal *in vitro* e toxicidade em modelo de peixe-zebra do derivado acridínico AMTAC-19**. 2025. 187 f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB/ CCS, João Pessoa.

RESUMO

O câncer colorretal (CCR) é um importante problema de saúde pública mundial. Diante da necessidade de desenvolvimento de agentes mais efetivos e/ou com menor toxicidade, o derivado acridínico (E)-1'-((4-bromo-benzilideno)amino)5'-oxo-1'5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-19) foi previamente sintetizado e testado quanto ao seu potencial antitumoral *in vitro*. AMTAC-19 apresentou significativa citotoxicidade em linhagem de células de câncer colorretal humano HCT-116 (concentração inibitória média – $CI_{50} = 10,35 \pm 1,66 \mu M$). Diante disso, o presente trabalho objetivou caracterizar os mecanismos de ação anti-CCR do AMTAC-19 por meio de ensaios *in silico* e *in vitro*, e a sua embriotoxicidade em modelo de peixe-zebra. Os resultados do *docking* molecular evidenciaram interações favoráveis entre o AMTAC-19 e as estruturas cristalográficas da Proteína Cinase Regulada por Sinal Extracelular 1 (ERK1), da Proteína Cinase N-terminal c-Jun 1 (JNK1), da Proteína Cinase Ativada por Mitógeno p38 α (p38 α MAPK), da Proteína Cinase B (PKB/AKT), do Fator Nuclear κB (NF- κB ; p50/p65) e da Linfoma de Células B-2 (BCL-2). Nos ensaios *in vitro*, a marcação com anticorpos específicos permitiu observar que, após 48 h de tratamento com o AMTAC-19, houve aumento significativo do percentual de células marcadas com anticorpos anti-p-ERK1/2 e anti-p-JNK1/2, e redução significativa do percentual de células marcadas com anticorpos anti-p-BCL-2. O pré-tratamento com inibidores de ERK1/2 ou JNK preveniu significativamente a citotoxicidade do AMTAC-19 em células HCT-116. Na análise do estado redox, o AMTAC-19 estimulou a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) após 30 min e 1 h de tratamento, e o pré-tratamento com N-acetil-L-cisteína (NAC) preveniu significativamente a sua citotoxicidade. O uso do cloreto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) permitiu observar que o AMTAC-19 induz alteração no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi m$) de células HCT-116. O uso do corante Hoechst 34580, utilizado para analisar características morfológicas de apoptose por microscopia confocal a *laser*, demonstrou que o AMTAC-19 induziu aumento significativo do número de células fluorescentes após tratamento de 48 h, sendo observada condensação da cromatina, que corrobora o efeito pró-apoptótico induzido por esta molécula. Adicionalmente, o ensaio clonogênico foi utilizado para avaliar as alterações na sobrevivência e proliferação celular induzidas pelo AMTAC-19, mostrando que o composto teste, na concentração de 1,56 μM (correspondente a 1/8 da CI_{50}), induziu redução significativa na capacidade de formação de colônias de células HCT-116. Por fim, a avaliação da toxicidade não clínica em modelo de peixe-zebra, evidenciou que o tratamento de embriões e larvas com AMTAC-19 (100 μM – correspondente a aproximadamente 10 vezes a CI_{50} em células HCT-116) por 96 h de exposição, não causou morte dos animais, estimando que a Concentração Letal Média (CL_{50}) do composto foi maior que 100 μM . Em resumo, o AMTAC-19 apresenta efeito anti-CCR *in vitro* por indução de apoptose, estresse oxidativo e modulação das proteínas ERK1/2, JNK e BCL-2.

Palavras-chave: Composto espiro-acridínico; Carcinoma colorretal humano; Atividade antitumoral; Estresse oxidativo; Docking molecular; Toxicidade

SOUSA, V. M. ***In vitro* anticolorectal cancer action mechanisms and toxicity in a zebrafish model of the acridine derivative AMTAC-19.** 2025. 187 f. Thesis (Doctorate in Natural and Synthetic Bioactive Products) – UFPB/CCS, João Pessoa.

ABSTRACT

Colorectal Cancer (CRC) is a major global public health concern. In light of the need to develop more effective agents and/or those with lower toxicity, the acridine derivative (E)-1'-((4-bromobenzylidene)amino)-5'-oxo-1',5'-dihydro-10H-spiro[acridine-9,2'-pyrrol]-4'-carbonitrile (AMTAC-19) was previously synthesized and tested for its *in vitro* antitumor potential. AMTAC-19 exhibited significant cytotoxicity against the HCT-116 human colorectal cancer cell line (half-maximal inhibitory concentration – IC₅₀ = 10.35 ± 1.66 μM). Accordingly, this study aimed to characterize the anti-CRC mechanisms of action of AMTAC-19 through *in silico* and *in vitro* assays, as well as its embryotoxicity in a zebrafish model. The results of molecular docking demonstrated favorable interactions between AMTAC-19 and the crystallographic structures of Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 (ERK1), c-Jun N-terminal Kinase 1 (JNK1), p38α Mitogen-Activated Protein Kinase (p38α MAPK), Protein Kinase B (PKB/AKT), Nuclear Factor kappa B (NF-κB; p50/p65), and B-cell Lymphoma-2 (BCL-2). *In vitro* assays using specific antibody labeling revealed that, after 48 hours of treatment with AMTAC-19, there was a significant increase in the percentage of cells labeled with anti-p-ERK1/2 and anti-p-JNK1/2 antibodies, as well as a significant reduction in cells labeled with anti-p-BCL-2 antibodies. Pre-treatment with ERK1/2 or JNK inhibitors significantly prevented AMTAC-19-induced cytotoxicity in HCT-116 cells. In redox state analysis, AMTAC-19 stimulated the production of Reactive Oxygen Species (ROS) after 30 minutes and 1 hour of treatment, and pre-treatment with N-acetyl-L-cysteine (NAC) significantly prevented its cytotoxicity. Using the 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine chloride (JC-1) dye, it was observed that AMTAC-19 induces changes in the mitochondrial membrane potential (Δψ_m) of HCT-116 cells. Laser confocal microscopy analysis of apoptotic morphological characteristics using Hoechst 34580 dye showed that AMTAC-19 significantly increased the number of fluorescent cells after 48 hours of treatment, with chromatin condensation observed, supporting the pro-apoptotic effect induced by this molecule. Additionally, the clonogenic assay used to evaluate changes in cell survival and proliferation induced by AMTAC-19 demonstrated that the test compound, at a concentration of 1.56 μM (equivalent to 1/8 of the IC₅₀), significantly reduced the colony-forming ability of HCT-116 cells. Finally, non-clinical toxicity evaluation using a zebrafish model showed that treatment of embryos and larvae with AMTAC-19 (100 μM – approximately 10 times the IC₅₀ for HCT-116 cells) for 96 hours did not cause animal mortality, suggesting that the compound's median lethal concentration (LC₅₀) is greater than 100 μM. In summary, AMTAC-19 exhibits *in vitro* anti-CRC effects through apoptosis induction, oxidative stress, and modulation of ERK1/2, JNK, and BCL-2 proteins.

Keywords: Spiro-acridine compound; Human colorectal carcinoma; Antitumor activity; Oxidative stress; Molecular docking; Toxicity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas da carcinogênese	27
Figura 2. Características biológicas do câncer	28
Figura 3. Vias da apoptose	38
Figura 4. Via de sinalização intracelular da família de proteínas BCL-2 (linfoma/leucemia de células B-2)	42
Figura 5. A formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e os efeitos das alterações de seus níveis nas células	49
Figura 6. Vias das MAPKs.....	53
Figura 7. Cascata de sinalização das proteínas Cinases c-Jun N-terminal (JNK) na via extrínseca da apoptose	54
Figura 8. Cascata de sinalização das proteínas Cinases c-Jun N-terminal (JNK) na via intrínseca da apoptose	55
Figura 9. Substratos das proteínas Cinases c-Jun N-terminal (JNK) que regulam a via apoptótica mitocondria	56
Figura 10. Cascata de sinalização das Proteínas Cinases Reguladas por Sinais Extracelulares (ERK).....	58
Figura 11. Via de sinalização intracelular da Proteína Cinase B (PKB/AKT).....	62
Figura 12. Via de sinalização intracelular do Fator Nuclear <i>Kappa</i> B (NF- κ B)	64
Figura 13. Interações moleculares entre o AMTAC-19, a doxorrubicina ou o ligante do <i>Protein Data Bank</i> (PDB) e a Proteína Cinase Regulada por Sinal Extracelular 1 (ERK1)	90
Figura 14. Interações moleculares entre o AMTAC-19, a doxorrubicina ou o ligante do <i>Protein Data Bank</i> (PDB) e a Proteína Cinase N-terminal c-Jun 1 (JNK1).....	91
Figura 15. Interações moleculares entre o AMTAC-19, a doxorrubicina ou o ligante doramapimod—BIRB-796 e a Proteína Cinase Ativada por Mitógeno p38 α (p38 α MAPK).....	92
Figura 16. Interações moleculares entre o AMTAC-19, a doxorrubicina ou o ligante do <i>Protein Data Bank</i> (PDB) e a Linfoma de células B-2 (BCL-2-xL).....	93
Figura 17. Interações moleculares entre o AMTAC-19, a doxorrubicina ou o ligante dicloridrato MK-2206 e a Proteína Cinase B (PKB/AKT).....	94

Figura 18. Interações moleculares entre o AMTAC-19, a doxorubicina ou o ligante 4-metil-N1-(3-fenilpropil)benzeno-1,2-diamina e o Fator Nuclear <i>kappa</i> B (NF- κ B; p50/p65)	95
Figura 19. Modulação das Proteínas Cinases Reguladas por Sinal Extracelular 1 e 2 (ERK1/2) em células HCT-116 após tratamento com AMTAC-19 (10 ou 20 μ M) ou doxorubicina (DXR, 2,5 μ M)	96
Figura 20. Modulação das Proteínas Cinases N-terminal c-Jun 1 e 2 (JNK1/2) em células HCT-116 após tratamento com AMTAC-19 (10 ou 20 μ M) ou doxorubicina (DXR, 2,5 μ M)	97
Figura 21. Modulação das Proteína Cinase Ativada por Mitógeno p38 (p38 MAPK) em células HCT-116 após tratamento com AMTAC-19 (10 ou 20 μ M) ou doxorubicina (DXR, 2,5 μ M)	98
Figura 22. Efeito do AMTAC-19 ou doxorubicina (DXR), na presença ou ausência de inibidores de ERK1/2 (U0126), JNK (SP600125) ou p38 MAPK (PD 169316), sobre a viabilidade de células da linhagem de carcinoma colorretal humano HCT-116 após 72 h de tratamento	100
Figura 23. Modulação das proteínas BCL-2 em células HCT-116 após tratamento com AMTAC-19 (10 ou 20 μ M) ou doxorubicina (DXR, 2,5 μ M)	101
Figura 24. Modulação da Proteína Cinase B (PKB/AKT) em células HCT-116 após tratamento com AMTAC-19 (10 ou 20 μ M) ou doxorubicina (DXR, 2,5 μ M)	102
Figura 25. Modulação do Fator Nuclear <i>kappa</i> B (NF- κ B; p65) em células HCT-116 após tratamento com AMTAC-19 (10 ou 20 μ M) ou doxorubicina (DXR, 2,5 μ M)	103
Figura 26. Percentual de células fluorescentes após incubação com o 2'7-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) e o AMTAC-19 (10 ou 20 μ M) ou doxorubicina (DXR, 2,5 μ M) em diferentes tempos de tratamento	105
Figura 27. Citotoxicidade do AMTAC-19 (10 ou 20 μ M) ou doxorubicina (DXR, 2,5 μ M) na presença ou ausência N-acetilcisteína (NAC, 5 mM) após 72 h de tratamento	106
Figura 28. Efeito do AMTAC-19 (10 ou 20 μ M) na despolarização mitocondrial de células de carcinoma colorretal (HCT-116) após 48 h de tratamento	107
Figura 29. Imagens representativas da avaliação da despolarização mitocondrial por coloração do cloreto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) em células de carcinoma colorretal (HCT-116) incubadas com AMTAC-19 (10 ou 20 μ M)	108

Figura 30. Indução de apoptose pelo AMTAC-19 (10 ou 20 μ M) analisada por coloração com Hoechst 34580 em células de carcinoma colorretal humano HCT-116 após 48 h de tratamento	109
Figura 31. Imagens representativas da avaliação da apoptose por coloração com Hoechst 34580 em células de carcinoma colorretal humano HCT-116 incubadas com AMTAC-19 (10 ou 20 μ M) por 48 h	110
Figura 32. Ensaio de formação de colônias em células de carcinoma colorretal humano HCT-116 após o tratamento com AMTAC-19 (0,39, 0,78 ou 1,56 μ M)	112
Figura 33. Taxas de sobrevivência de embriões e larvas de peixe-zebra expostos a 100 μ M de AMTAC-19 ou amostras de controle (meio E3 e DMSO 0,1%) após 96 h	113
Figura 34. Imagens representativas de embriões e larvas de peixe-zebra após a exposição a AMTAC-19 (100 μ M) ou DMSO (0,1%) e controle de meio E3, durante 96 h	114

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Via sintética para obter composto espiro-acridínico AMTAC-19	74
--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Características biológicas do câncer	29
Quadro 2. Pontuação Moldock (unidades arbitrárias) e valores de probabilidade de interação (p) entre o (E)-1'-((4-bromobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-19), a doxorrubicina ou outros ligantes e a Proteína Cinase Regulada por Sinais Extracelulares 1 (ERK1), a Proteína Cinase c-Jun N-terminal 1 (JNK1), a Proteína Cinase Ativada por Mitógenos p38 α (p38 α MAPK), Linfoma de células B-2 (BCL-2-xL), Proteína Cinase B (PKB/AKT) e o Fator Nuclear <i>kappa</i> B (NF-kB; p50/p65)	88

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AMTAC-19	<i>E</i> -1'-((4-bromo-benzylidene)amino)5'-oxo-1'5'-dihydro-10 <i>H</i> -spiro[acridine-9,2'-pyrrol]-4'-carbonitrile
Ala	Alanina
ANOVA	Análise de variância
APAF1	Fator 1 ativador de protease apoptótica
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
ATF2	Fator de transcrição ativador-2
BCL-2	Proteínas do linfoma de células B2
CAT	Catalase
CBiotec	Centro de Biotecnologia
CCEN	Centro de Ciências Exatas e da Natureza
CCS	Centro de Ciências da Saúde
Cl₅₀	Concentração inibitória media
Cys	Cisteína
DATASUS	Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
DBM	Departamento de Biologia Molecular
DCFH-DA	2'7-dicloro dihidrofluoresceína diacetate
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERK	Proteína cinase regulada por sinal extracelular
EROs	Espécies reativas de oxigênio
DXR	Doxorrubicina
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
GDP	Difosfato de guanosine
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutâmico
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
GPx	Glutational peroxidase
GR	Glutational reductase
GSH	Glutational

GST	Glutathione transferase
GTP	Trifosfato de guanosine
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico
His	Histidina
Ile	Isoleucina
IκB	Inibidor de <i>kappa</i> B
IKK	Complexo IκB cinase
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IPeFarM	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
JC-1	Cloreto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolil-carbocianina
JNK	Proteína cinase c-Jun N-terminal
LabRisco	Laboratório de Avaliação de Risco de Novas Tecnologias
LDH	Lactato desidrogenase
Leu	Leucina
Lys	Lisina
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
MAPKKK	MAPK cinase cinase
MAPKK	MAPK cinase
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
Met	Metionina
mTORC	Complexo 2 do alvo da rapamicina em mamíferos
NAC	N-acetilcisteína
NIK	Proteína indutora de NF-κB
NF-κB	Fator Nuclear <i>kappa</i> B
NOS	Óxido nítrico sintase
NOX	NADPH oxidase
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
OncoFar	Laboratório de Oncofarmacologia
p38 MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno p38
PBS	Solução tampão fosfato
PDK1	Proteína cinase dependente de fosfoinosítideo-1
Phe	Fenilalanina

PI3K	Fosfoinosítídeo 3 cinase
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PI	Iodeto de propídeo
PKB/AKT	Proteína cinase B
PPgPNSB	Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Prx	Peroxirredoxina
PTEN	Homólogo de fosfatase e tensina
Rb	Retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucleico
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RTK	Receptor tirosina cinase
SBF	Soro fetal bovino
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Ser	Serina
SIH	Sistema de Informações Hospitalares
SOD	Superóxido dismutase
SOS	Proteína <i>son of sevenless</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
Thr	Treonina
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR	Receptor do fator de necrose tumoral
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
Trp	Triptofano
Trx	Tiorredoxina
Tyr	Tirosina
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
Val	Valina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	26
2.1 Aspectos gerais do câncer	26
2.2 Carcinoma colorretal: características gerais e tratamento.....	31
2.3 Apoptose	35
2.4 A sinalização das proteínas BCL-2 e o câncer.....	41
2.5 Estresse oxidativo e o câncer.....	45
2.6 Proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs)	50
2.7 Via de sinalização intracelular da Proteína Cinase B (PKB/AKT) e o câncer	60
2.8 Via de sinalização intracelular do Fator Nuclear Kappa B (NF-κB) e o câncer....	63
2.9 O uso do peixe-zebra como alternativa para avaliação da citotoxicidade de novas drogas com potencial antitumoral.....	66
2.10 Derivados acridínicos	67
3 OBJETIVOS.....	71
3.1 Objetivo geral	71
3.2 Objetivos específicos	71
4 MATERIAL E MÉTODOS	73
4.1 Locais da pesquisa.....	73
4.2 Material.....	73
4.2.1 Substância teste	73
4.2.2 Linhagem celular	74
4.2.3 Animais.....	75
4.2.4 Substâncias e equipamentos	76
4.3 Métodos.....	77
4.3.1 <i>Docking</i> molecular	77

4.3.2 Avaliação do efeito do AMTAC-19 sobre a modulação das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógeno (MAPKs)	79
4.3.2.1 Marcação de células HCT-116 com anticorpos anti-MAPKs e análise por citometria de fluxo	79
4.3.2.2 Avaliação da citotoxicidade do AMTAC-19 na presença ou ausência de inibidores de MAPKs (iMAPKs)	79
4.3.3 Marcação de células HCT-116 com anticorpos anti-BCL-2 e análise por citometria de fluxo	80
4.3.4 Marcação de células HCT-116 com anticorpos anti-PKB/AKT ou anti-NF- κ B/p65 e análise por citometria de fluxo	80
4.3.5 Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelo ensaio DCFH-DA81	
4.3.6 Avaliação do envolvimento do estresse oxidativo na citotoxicidade do AMTAC-19	81
4.3.7 Investigação do tipo de morte celular induzida pelo AMTAC-19	82
4.3.7.1 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial por coloração com JC-182	
4.3.7.2 Análise nuclear por coloração com Hoechst	83
4.3.8 Avaliação da sobrevivência de células HCT-116 através do ensaio clonogênico	83
4.3.9 Teste de toxicidade aguda em embriões e larvas de peixe-zebra.....	84
4.4 Análise estatística	85
5 RESULTADOS.....	87
5.1 Docking Molecular	87
5.2 Efeito do AMTAC-19 sobre a modulação das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógeno (MAPKs)	95
5.2.1 Marcação com anticorpos anti-MAPKs e análise por citometria de fluxo	95
5.2.2 Citotoxicidade do AMTAC-19 na presença ou ausência de inibidores de MAPKs (iMAPKs)	98
5.3 Marcação de células HCT-116 com anticorpos anti-BCL-2 e análise por citometria de fluxo.....	100

5.4 Marcação de células HCT-116 com anticorpos anti-PKB/AKT e análise por citometria de fluxo	101
5.5 Marcação de células HCT-116 com anticorpos anti-NF- κ B (p65) e análise por citometria de fluxo	102
5.6 Efeito do AMTAC-19 sobre o estado redox celular	103
5.6.1 Avaliação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) utilizando o 2'7-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA).....	103
5.6.2 Citotoxicidade do AMTAC-19 na presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC)	106
5.7 Morte celular induzida pelo AMTAC-19.....	107
5.7.1 Efeito do AMTAC-19 sobre a despolarização mitocondrial após marcação com JC-1.....	107
5.7.2 Efeito do AMTAC-19 sobre a morfologia de células HCT-116 após coloração com Hoechst 34580 por microscopia confocal.....	109
5.9 Efeito do AMTAC-19 na sobrevivência de células HCT-116 através do ensaio clonogênico	111
5.9 Avaliação da toxicidade aguda em embriões e larvas de peixe-zebra	113
6 DISCUSSÃO	116
7 CONCLUSÕES	132
REFERÊNCIAS.....	134
ANEXOS	181

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O câncer é designado como um conjunto de doenças causadas por fatores endógenos e exógenos, que atuam modificando as características intrínsecas das células e promovendo uma hiperproliferação celular desordenada, que resulta no acúmulo de alterações celulares genéticas e/ou epigenéticas (DE ALMEIDA et al., 2017; PARK et al., 2017). A aquisição destas capacidades específicas é responsável pela desregulação do ciclo celular e de mecanismos de morte celular, o que, por sua vez, contribuem para a sinalização proliferativa sustentada, sobrevivência celular e capacidade de disseminação para outros tecidos (BONELLI et al., 2019; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Mundialmente, o câncer é uma das principais causas de morte, apresentando a incidência de 20 milhões de novos casos diagnosticados e mais de 9,7 milhões de mortes registradas em 2022 (BRAY et al., 2024). Atualmente, o tratamento do câncer envolve terapias locais e/ou sistêmicas, como cirurgia, radioterapia, quimioterapia, imunoterapia, hormonioterapia, terapias-alvo, sendo a quimioterapia a abordagem predominante (YANG et al., 2023). Embora os tratamentos contra o câncer possam ser eficazes em diversos casos, eles frequentemente provocam efeitos colaterais debilitantes, que impactam de forma significativa a qualidade de vida dos pacientes (FERNANDO; JONES, 2015; SMITH; PREWETT, 2017).

No tratamento quimioterápico do câncer colorretal, por exemplo, incluem-se os agentes antimetabólitos: 5-fluorouracil (5-FU) e capecitabina (CAP), derivados de platina: oxaliplatina (OX) e o inibidor de topoisomerase: irinotecano (IRI), que podem ser usados isoladamente ou em combinações (HOSSAIN et al., 2022; SHIN; GIANCOTTI; RUSTGI, 2023). Entretanto, a quimioterapia enfrenta diversas limitações importantes, dentre esses obstáculos destacam-se a toxicidade sistêmica, taxas de resposta insatisfatórias, resistência inata e adquirida variável, além da baixa seletividade pelas células tumorais, o que pode gerar efeitos colaterais consideráveis, que limitam a qualidade de vida dos pacientes (ISLAM et al., 2022; LEOWATTANA; LEOWATTANA; LEOWATTANA, 2023; SHIN; GIANCOTTI; RUSTGI, 2023). Portanto, em virtude da alta prevalência dos casos de câncer e da necessidade de um tratamento eficaz e seguro, permanece a urgência na pesquisa e desenvolvimento de novos candidatos a fármacos antineoplásicos (KUMAR et al., 2017).

Nessa perspectiva, as acridinas são compostos heterocíclicos com estrutura planar, formados por dois anéis benzeno fundidos a um anel de piridina em uma posição central (GOUVEIA et al., 2018). Tem sido relatado na literatura que estes compostos apresentam atividades biológicas promissoras, incluindo anticâncer, a exemplo da amsacrina (m-AMSA), um protótipo do grupo que exerce atividade antitumoral em leucemias e linfomas (DE ALMEIDA et al., 2017; SALEM et al., 2017). Alterações na estrutura química da molécula de acridina levaram a síntese de uma nova série de compostos designada espiro-acridina, formada por um anel espiro de cinco ou seis membros ligado ao carbono C-9 da acridina, estrutura que favorece a intercalação entre os pares de bases de ácidos nucleicos no DNA e a inibição das enzimas topoisomerasas, moléculas cruciais no processo de replicação celular (ALMEIDA et al., 2016; MENEZES et al., 2019b).

Dados da literatura demonstram que os compostos espiro-acridínicos (*E*)-1'-((4-clorobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-diidro-10*H*-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-06) e (*E*)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxi-benzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10*H*-espiro [acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-17) induziram efeito antitumoral *in vivo* contra tumor de Ehrlich (DUARTE et al., 2020a; SILVA et al., 2019a) e *in vitro* contra células de carcinoma colorretal (HCT-116) (DUARTE et al., 2020b; SILVA et al., 2019b). Em adição, um novo composto espiro-acridínico, o (*E*)-1'-((4-bromo-benzilideno)amino)5'-oxo-1'5'-dihidro-10*H*-espiro [acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-19), foi avaliado por nosso grupo de pesquisa em estudos anteriores que investigaram o seu potencial antitumoral. O AMTAC-19 apresentou significativa citotoxicidade em células HCT-116 e efeito antitumoral associado à indução de alterações no ciclo celular, uma ação antioxidante e ativação de morte celular por apoptose (DE SOUSA et al., 2024).

Assim, considerando a relevância dos espiro-acridínicos como anteriormente relatado, em especial do AMTAC-19, o presente trabalho teve como objetivo aprofundar os estudos com o AMTAC-19, investigando a toxicidade e os prováveis mecanismos de ação envolvendo o efeito antitumoral deste novo composto.

Fundamentação teórica

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Aspectos gerais do câncer

O câncer é designado como um conjunto de doenças heterogêneas que envolvem sucessivas alterações genéticas e epigenéticas (SHANKAR; GUPTA; GUPTA, 2019), as quais promovem modificações nas características moleculares e fenotípicas das células, resultando no escape dos controles de homeostase habituais e em uma proliferação celular desregulada (CHATTERJEE; RODGER; ECCLES, 2018).

As células transformadas adquirem a capacidade de crescimento celular exacerbado e irreversível, que favorece o acúmulo de clones atípicos e a formação de uma massa tissular denominada tumor, que, por sua vez, podem ser classificados como benignos ou malignos (SINHA, 2018). Os tumores benignos exibem morfologia semelhante ao tecido de origem, crescimento lento, organização celular e não invasividade. São exemplos de tumores benignos os miomas, os lipomas e os adenomas, que originam-se no tecido muscular liso do miométrio, tecido adiposo e em glândulas, respectivamente (KOGURE et al., 2017).

Por outro lado, os tumores malignos são morfologicamente distintos em comparação ao tecido de origem e apresentam como características o crescimento rápido, a desorganização celular e a capacidade de se disseminar pela corrente sanguínea ou linfática, invadindo os tecidos adjacentes ou distantes, em uma sequência de eventos denominada de metástase (DE LA HOZ POLO et al., 2017; UMEKI et al., 2023). Os diferentes tipos de tumores malignos, ou câncer, podem ser classificados de acordo com seu tecido de origem em: I) carcinoma (originam-se em células do tecido epitelial de revestimento) (LIAO et al., 2021); (II) adenocarcinoma (originam-se em células do tecido epitelial glandular);(III) sarcomas (originam-se no tecido conjuntivo) (GIRVIN et al., 2023; SAMARA et al., 2024); IV) leucemias, linfomas e mielomas (originam-se em células do tecido hematopoiético); (V) gliomas, neuroblastomas e meduloblastomas (originam-se em células do sistema nervoso) (FISHER et al., 2022; SHEKOUHI; CHIM, 2023).

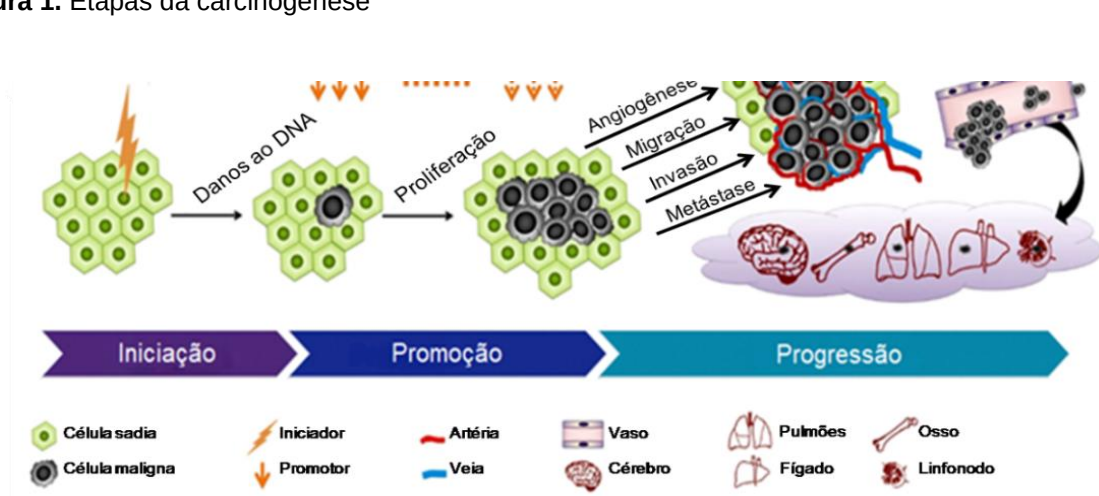
Em relação as características etiológicas do câncer, as células modificadas são provenientes de alterações genéticas e/ou epigenéticas, que levam ao acúmulo de mutações somáticas, resultando na hiperproliferação celular, seguidos de invasão e

metástase (SHANKAR; GUPTA; GUPTA, 2019). Essas alterações acumuladas podem ser causadas por fatores endógenos, tais como hormônios, condições imunológicas e distúrbios genéticos, as quais correspondem a causa de aproximadamente 10% dos casos de cânceres. Em contrapartida, cerca de 90% dos cânceres são causados por fatores exógenos, tais como o uso do tabaco, maus hábitos alimentares, infecções, envelhecimento, exposição aos raios ultravioleta e a inalação de poluentes (CHATTERJEE; RODGER; ECCLES, 2018).

Neste contexto, o processo de desenvolvimento do tumor, chamado de carcinogênese, ocorre em três fases distintas: iniciação, promoção e progressão (GRAY et al., 2017). A fase inicial envolve a exposição à fatores endógenos e/ou exógenos, que favorecem o desenvolvimento de células com características específicas capazes de ativar oncogênese inibir genes supressores de tumor, responsáveis pela transformação da célula sadia em uma célula tumoral (LIANG et al., 2019; NAPOLI; FLORES, 2020).

A fase seguinte, chamada de promoção, envolve um agente promotor que induz a expansão de clones celulares provenientes da célula transformada e impulsionam a transcrição de genes responsáveis pela proliferação e sobrevivência celular. Por último, a fase de progressão, consiste em uma etapa irreversível e agressiva, em que o câncer se encontra instalado, resultando na disseminação das células para locais distantes, estabelecendo metástases (Figura 1) (BESSOU et al., 2020; HYNDMAN, 2016; SIDDIQUI et al., 2015).

Figura 1. Etapas da carcinogênese



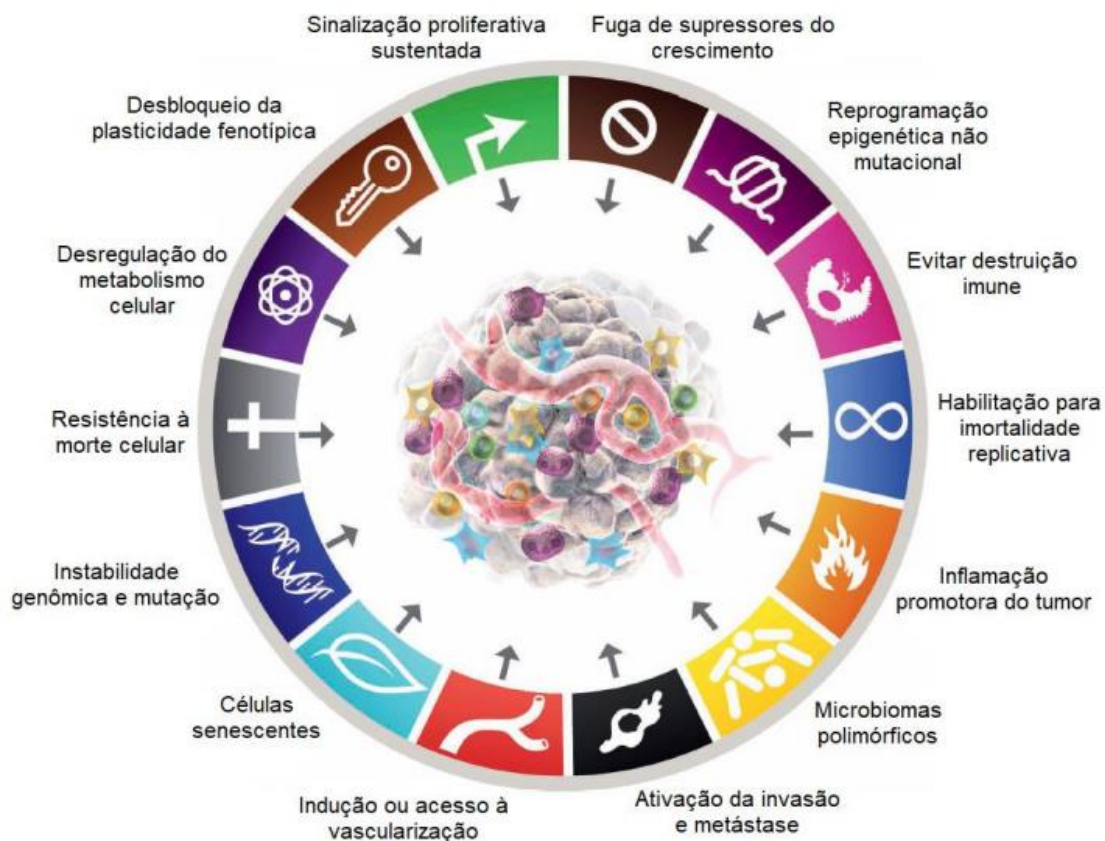
Legenda: A carcinogênese é dividida em três etapas. A **iniciação** envolve fatores endógenos e exógenos, responsáveis por promover alterações genéticas e/ou epigenéticas, que podem ativar proto-oncogenes e/ou inibir genes supressores de tumor, responsáveis pela transformação da célula sadia em uma célula modificada. A fase seguinte, a **promoção**, envolve um agente promotor que induz a proliferação das

células anteriormente transformadas. A última etapa, chamada de **progressão**, é irreversível e agressiva, resultando na instalação do câncer e na metástase.

Fonte: Adaptado de LIU et al., 2015.

Considerando os aspectos abordados, pode-se dizer que o desenvolvimento do câncer é de etiologia complexa (BRAY et al., 2018), envolvendo mecanismos rápidos de progressão, bem como alterações celulares diversas, responsáveis por um conjunto de características primordiais compartilhadas por diferentes tipos de cânceres. Essas características são designadas de “marcas” ou “*Hallmarks*” do câncer (Figura 2) (HANAHAHAN, 2022) e são capazes de proporcionar às células cancerígenas a capacidade de sobrevivência, proliferação descontrolada e disseminação (Quadro 1) (HANAHAHAN, 2022; ZEFFERINO et al., 2019).

Figura 2. Características biológicas do câncer



Fonte: Adaptado de Hanahan (2022).

Quadro 1. Características biológicas do câncer

Sinalização proliferativa sustentada	Capacidade da célula proliferar-se constitutivamente na ausência de ligante ou estímulo externo
Fuga de supressores do crescimento	Inativação de genes supressores de tumor, que regulam negativamente a proliferação celular persistente
Reprogramação epigenética não mutacional	Regulação genética em tumores. Pode ser governada por uma infinidade de mecanismos que são independentes da instabilidade do genoma e de mutações genéticas
Evasão da destruição imune	Mudança do microambiente pelas células tumorais altamente imunogênicas, que desativam os componentes do sistema imune designados para destruí-las, suprimindo o ataque imunológico
Habilitação para imortalidade replicativa	Associada a atividade da telomerase em células modificadas ou imortalizadas espontaneamente, que induzem à uma resistência da senescência ou apoptose
Inflamação promotora do tumor	Liberação de diversos mediadores inflamatórios, que interagem com outras moléculas presentes no microambiente tumoral, favorecendo a sobrevivência das células tumorais.
Microbiomas polimórficos	Capacidade de contribuir ou interferir na aquisição de outras capacidades marcantes, como sinalização proliferativa, modulação da supressão do crescimento e resistência à morte celular, além de induzir a angiogênese e estimular invasão e metástase, influenciando no desenvolvimento e na progressão do tumor.
Ativação da invasão e metástase	Envolve eventos celulares que culminam com a invasão de outros tecidos/órgãos, a exemplo da degradação da matriz extracelular (ECM), a transição epitélio-mesenquimal (EMT), desenvolvimento de um microambiente inflamatório tumoral e a desregulação da morte celular programada
Indução ou acesso à angiogênese	Processo que fornece o suprimento de nutrientes e oxigênio necessários para o desenvolvimento do tumor, além de favorecer metástases
Células senescentes	Subtipos heterogêneos de células cancerígenas, bem como tipos e subtipos de células estromais, que induzem mudanças na morfologia e no metabolismo celular, além da ativação de um fenótipo secretor associado à senescência (FSAS), que contribuem funcionalmente para a progressão do tumor
Instabilidade genômica e mutação	Promoção de defeitos na manutenção e reparo do genoma, o que favorece as mutações espontâneas e alterações no DNA
Resistência à morte celular	Mutações genéticas ou modificações epigenéticas nos reguladores e efetores pró-apoptóticos e antiapoptóticos

Desregulação do metabolismo celular	A célula tumoral induz uma reprogramação do metabolismo energético para sustentar a demanda de proliferação celular constante
Desbloqueio da plasticidade fenotípica	permite várias interrupções da diferenciação celular, incluindo (i) desdiferenciação de estados maduros para progenitores, (ii) diferenciação bloqueada (terminal) de estados de células progenitoras e (iii) transdiferenciação em diferentes linhagens celulares.

Em termos epidemiológicos, dados da GLOBOCAN, produzidos pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer, estimaram a incidência e a mortalidade por câncer no ano de 2022, observando um aumento constante nos índices globais, com cerca de 20 milhões de novos casos e 9,7 milhões de mortes por câncer para este ano. De acordo com os dados coletados, o câncer de pulmão apresentou a maior incidência (2,5 milhões de novos casos, representando 12,4% do total), seguidos dos cânceres de mama feminino (11,6%), colorretal (9,6%), próstata (7,3%) e estômago (4,9%). Quanto a mortalidade, o câncer de pulmão prevalece como a principal causa de morte por câncer (1,8 milhão de mortes, representando 18,7% do total), seguido pelo câncer colorretal (9,3%), fígado (7,8%), mama feminino (6,9%) e estômago (6,8%) (BRAY et al., 2024). Ainda, estima-se que serão diagnosticados 35 milhões de casos de câncer em 2050, sendo a maior incidência em países em desenvolvimento, em comparação com países desenvolvidos, baseado nos fatores sociais, socioeconômicos e no estilo de vida da população (BRAY et al., 2018; BRAY et al., 2024).

De acordo com os registros obtidos do Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde (SIS/SUS), da Plataforma DATASUS-NET do Ministério da Saúde, no Brasil, no período de janeiro à julho de 2024, foram realizadas 623.456 internações por câncer, destas correspondendo à 252.118 em homens e 371.338 em mulheres, destacando-se a região Sudeste com o maior índice de internações (cerca de 263.870, representando 42,32%) (DATASUS, 2024). Em relação ao número de óbitos por neoplasias no Brasil, durante o período de janeiro a julho de 2024, foram registrados 46.566 mortes, sendo 23.024 homens e 23.542 mulheres, destacando a região Nordeste em terceiro lugar com maior número de óbitos (9.310) (DATASUS, 2024).

Ainda, segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), o Brasil terá 704 mil novos casos de câncer a cada ano do triênio 2023-2025,

sendo o câncer de pele não melanoma (220 mil casos novos) o mais incidente na população, em seguida, separados por gênero, os mais frequentes entre os homens são: próstata (71.730), colorretal (21.970) e pulmão (18.020). Já nas mulheres, estima-se um aumento na incidência de câncer de mama (73.610), colorretal (23.660), colón do útero (17.010) e pulmão (14.540) (INCA, 2023).

Diante deste cenário, o conhecimento das características que possibilitam o desenvolvimento do câncer é fundamental para identificar diferentes alvos moleculares/farmacológicos para o tratamento deste problema de saúde pública mundial.

2.2 Carcinoma colorretal: características gerais e tratamento

O câncer colorretal (CCR) é uma neoplasia maligna de origem multifatorial, que ocorre no intestino grosso, principalmente nas regiões do colón e reto. O CCR é um dos tipos de câncer mais prevalentes, ocupando o terceiro lugar no ranking de novos casos, e o segundo lugar em termos de mortalidade (PIRES et al., 2021). Nos últimos anos, suas taxas de incidência e mortalidade têm apresentado crescimento significativo, um fenômeno associado, em grande parte, à alterações nos hábitos de vida da população, tais como a diminuição da prática de exercícios físicos e o aumento do consumo de alimentos com alto teor de gorduras (LEOWATTANA; LEOWATTANA; LEOWATTANA, 2023).

As causas do câncer colorretal (CCR) podem ser divididas em dois grupos principais: familiar e esporádico. O tipo familiar está relacionado a predisposições genéticas, frequentemente influenciadas por fatores ambientais, cuja probabilidade de desenvolvimento aumenta em pessoas com parentes de primeiro grau diagnosticados com CCR. Por outro lado, a forma esporádica, que corresponde à maioria dos casos, está atribuída ao acúmulo de mutações ao longo da vida, associada a fatores de risco como tabagismo, obesidade, dieta rica em carne vermelha, baixo consumo de frutas, vegetais e fibra dietética, atrelados ao estilo de vida sedentária (DA SILVA; ERRANTE, 2016; KAYA, 2019; MELLO et al., 2020; PACHECO-PÉREZ et al., 2019).

Em relação as características genéticas, o CCR é capaz de ativar diferentes vias moleculares que promovem a transformação do epitélio normal em uma variedade heterogênea de subtipos celulares que se desenvolvem a partir de lesões do epitélio intestinal, levando à formação de pólipos e, posteriormente, carcinomas. O

pólipo adenomatoso é primordial para a evolução do CCR, cujo processo envolve mutações genéticas e processos inflamatórios, que resultam na ativação de proto-oncogenes e na inativação de genes supressores de tumor, componentes essenciais no desenvolvimento desta doença (ANDERSON et al., 2019; LEIPHRAKPAM; ARE, 2024).

No Brasil, estimam-se 45.630 novos casos de câncer de cólon e reto para o triênio 2023-2025, sendo 21.970 destes em homens e 23.660 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 20,78 casos novos a cada 100 mil homens e 21,41 para cada 100 mil mulheres. O CCR é o terceiro tipo de câncer mais frequente em homens e o segundo tipo entre as mulheres. Com relação à mortalidade, dados do DATASUS ressaltam que em 2023 ocorreram 21.959 óbitos, sendo 11.061 em homens e 10.898 em mulheres (INCA 2024, DATASUS 2023).

Neste contexto, a detecção precoce do CCR através de exames como o teste de sangue oculto nas fezes, a sigmoidoscopia, a colonoscopia e a biópsia líquida são fundamentais na descoberta e na redução do risco de metástases, bem como no aumento das chances de sobrevivência. A maioria dos diagnósticos ocorre em pessoas acima de 50 anos, sendo que 12% dos casos são registrados em indivíduos mais jovens. O risco de desenvolver câncer colorretal ao longo da vida é estimado em cerca de 1 em 23 (4,3%) para homens e 1 em 25 (4,0%) para mulheres. Projeções indicam que, até 2040, as mortes relacionadas a essa doença podem ultrapassar 1,6 milhão por ano, com mais de 3,2 milhões de novos casos anuais (SIEGEL et al., 2022). Desta forma, a mudança de estilo de vida é primordial para reduzir o risco de CCR em toda a população, destacando-se o acometimento precoce da doença em pessoas cada vez mais jovens.

Em geral, o tratamento do câncer combina abordagens farmacológicas e não farmacológicas, definidas com base em diversos fatores, como o tipo e as características do tumor, sua localização, o histórico de tratamentos já realizados e o estado geral de saúde do paciente (NICULESCU; GRUMEZESCU, 2022). As opções mais utilizadas incluem terapias locais, como a cirurgia e a radioterapia, além de terapias sistêmicas, como a quimioterapia, terapias-alvo e a imunoterapia (WANG et al., 2023).

O tratamento cirúrgico do câncer colorretal inclui uma ampla gama de procedimentos e técnicas personalizadas, levando em consideração as características individuais de cada paciente, o estágio da doença e a localização do tumor. Em fases

iniciais, quando o câncer está limitado à mucosa ou submucosa do intestino, podem ser realizadas cirurgias menos invasivas, com abordagens laparoscópicas, robóticas e endoscópicas. Essas abordagens visam remover o tumor sem a necessidade de grandes incisões abdominais, proporcionando uma recuperação mais rápida, reduzindo a morbidade pós-operatória, além de fornecer uma maior segurança e redução de custos em comparação com a cirurgia convencional (MITSALA et al., 2021; SHAH; ITZKOWITZ, 2022). Nos casos mais avançados, em que o tumor já atingiu camadas mais profundas da parede intestinal ou se espalhou para os linfonodos regionais, são necessários procedimentos cirúrgicos mais abrangentes. A ressecção segmentar do intestino, por exemplo, que consiste na remoção da parte do intestino afetada juntamente com uma margem de tecido saudável, é amplamente utilizada. Dependendo da extensão da doença e da necessidade de preservar a função intestinal, essa cirurgia pode incluir a realização de uma anastomose para reconectar as partes saudáveis do intestino, ou a criação de uma colostomia ou ileostomia, temporária ou permanente (MITSALA et al., 2021; SANTOS et al., 2024).

A radioterapia utiliza radiação de alta energia, como raios-X e raios gama, para destruir as células tumorais. Esse método atua causando danos severos ao DNA das células cancerígenas, seja diretamente, ao atingir o material genético, ou indiretamente, por meio da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), que provocam danos irreparáveis no DNA, levando à morte celular (GONG et al., 2021). A radioterapia é empregada no tratamento de pacientes com câncer retal localmente avançado, podendo ser utilizada como terapia adjuvante após a cirurgia para evitar recidivas, ou antes do procedimento cirúrgico para reduzir o tamanho do tumor e/ou preservar a função do esfíncter anal. Além disso, esta abordagem também é indicada como cuidado paliativo, visando aliviar os sintomas e aumentar o tempo de sobrevivência em pacientes com câncer colorretal irresssecável, que apresentam lesões sintomáticas. Embora contribua para aumentar a taxa de sobrevivência em pacientes com câncer colorretal, a radioterapia ainda enfrenta limitações que podem comprometer sua eficácia (ABEDIZADEH et al., 2024; KRASTEVA; GEORGIEVA, 2022).

Por outro lado, o tratamento sistêmico do CCR desempenha um papel essencial, especialmente em estágios avançados da doença, quando a cirurgia já não é suficiente para eliminar completamente o tumor. A quimioterapia é principal método utilizado nesta abordagem, que atua destruindo células tumorais ao interferir em sua

capacidade de proliferação e divisão celular. Entre as principais classes de quimioterápicos empregados estão: (I) os agentes alquilantes, como a ciclofosfamida, que agem formando ligações cruzadas no DNA, comprometendo sua funcionalidade; (II) os antimetabólitos, como o 5-fluorouracil (5-FU), que interferem na síntese do DNA ao inibir a enzima timidilato sintase; e (III) os derivados de produtos naturais, como os alcaloides da vinca e os taxanos, que afetam a dinâmica dos microtúbulos, bloqueando a divisão celular e promovendo a apoptose (BAILLY; THURU; QUESNEL, 2020).

Atualmente, o tratamento quimioterápico do câncer colorretal envolve tanto o uso de agentes isolados, como a 5-fluorouracil (5-FU), quanto combinações de múltiplos fármacos, incluindo oxaliplatina (OX), irinotecano (IRI) e capecitabina (CAP) (HOSSAIN et al., 2022; SHIN; GIANCOTTI; RUSTGI, 2023). A quimioterapia enfrenta diversas limitações importantes, dentre esses obstáculos destacam-se a toxicidade sistêmica, taxas de resposta insatisfatórias, resistência inata e adquirida variável, além da baixa seletividade pelas células tumorais, o que pode gerar efeitos colaterais consideráveis, como náuseas, vômitos, fadiga, perda de cabelo e mielossupressão, fatores que em conjunto limitam a qualidade de vida dos pacientes (ISLAM et al., 2022; LEOWATTANA; LEOWATTANA; LEOWATTANA, 2023; SHIN; GIANCOTTI; RUSTGI, 2023).

Além da quimioterapia, as terapias direcionadas têm ganhado destaque no tratamento do CCR, principalmente no estágio metastático. Essas abordagens são projetadas para destruir de maneira precisa e específica as células tumorais, reduzindo os danos às células saudáveis. Além disso, mutações como KRAS, NRAS e BRAF influenciam diretamente na escolha terapêutica e no prognóstico, destacando a importância da avaliação molecular prévia para garantir uma abordagem personalizada do tratamento (CIARDIELLO et al., 2022; SHIN; GIANCOTTI; RUSTGI, 2023). Neste contexto, os representantes da classe incluem, os inibidores de EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico), como cetuximabe e panitumumabe, utilizados em pacientes com tumores que expressam esse receptor; e os inibidores de VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), como bevacizumabe, aplicados para bloquear a formação de novos vasos sanguíneos que sustentam o crescimento tumoral (ISLAM et al., 2022; LEOWATTANA; LEOWATTANA; LEOWATTANA, 2023; SHIN; GIANCOTTI; RUSTGI, 2023). Ainda, o mais recente avanço está no ipilimumabe, um anticorpo que atua contra a proteína PD-1 (proteína de morte celular

programada), que tem mostrado ser capaz de promover um aumento significativo na sobrevida global de pacientes com câncer colorretal (CCR), representando uma opção promissora no tratamento da doença (ABEDIZADEH et al., 2024).

Outra abordagem moderna direcionada inclui a imunoterapia, uma estratégia que estimula o sistema imunológico do paciente a identificar e combater as células tumorais específicas do microambiente. Inibidores de checkpoint imunológico, como pembrolizumabe e nivolumabe, têm demonstrado eficácia em pacientes com câncer colorretal metastático e tumores com alta expressão de PD-L1 (ISLAM et al., 2022; SHIN; GIANCOTTI; RUSTGI, 2023).

Apesar dos avanços no tratamento, o manejo do câncer colorretal pode ser desafiador devido aos efeitos colaterais e à necessidade de uma abordagem individualizada para cada paciente. Portanto, estudos estão sendo conduzidos para investigar o efeito de produtos sintéticos no tratamento do CCR, além de compreender os mecanismos antitumorais relacionados a diferentes processos celulares, como estado redox (TAKAC et al., 2020), apoptose (WANG, 2020) e as vias de sinalização celulares, como aquelas que envolvem as Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs) (PASHIRZAD et al., 2021), o Fator Nuclear kappa B (NF- κ B) (SOLEIMANI et al., 2020), a Proteína Cinase B (PKB/AKT) (ZHONG et al., 2023) e as Proteínas da família BCL-2 (BCL-2) (QIAN et al., 2022).

2.3 Apoptose

A apoptose é um tipo de morte celular programada altamente regulada, constituindo um mecanismo inato em organismos multicelulares (XU; LAI; HUA, 2019) que participa de processos fisiológicos cruciais para a manutenção da homeostase, tais como a diferenciação celular, eliminação de células indesejadas, regulação do crescimento e do desenvolvimento celular (NAGATA, 2018). A desregulação no processo de apoptose está diretamente associada ao desenvolvimento de várias doenças, incluindo distúrbios neurológicos, doenças bacterianas e virais, doenças cardiovasculares, doenças autoimunes e o câncer (XU; LAI; HUA, 2019; YU et al., 2019).

A apoptose envolve duas principais vias de sinalização, denominadas via intrínseca e extrínseca, que são orquestradas por proteases de cisteína chamadas de caspases (BALAJI et al., 2021; KUROWSKA; MLYCZYNSKA; RAK, 2019) (Figura 3).

Ambas as vias culminam para a ativação de caspases efetoras, responsáveis pela execução do processo de apoptose (MAJTNEROVÁ; ROUŠAR, 2018; PISTRITTO et al., 2016), que promove alterações morfológicas e bioquímicas, tais como o encolhimento celular, a formação de prolongamentos na membrana (*blebs*), fragmentação do DNA, condensação de cromatina, despolarização da membrana mitocondrial, externalização da fosfatidilserina e formação dos corpos apoptóticos (JAN; CHAUDHRY, 2019; XU; LAI; HUA, 2019). Esse processo depende da integração e equilíbrio entre as proteínas pró-apoptóticas e antiapoptóticas, que controlam a ativação das caspases e determinam se a célula sofre apoptose (GILMORE; KING, 2019).

A via intrínseca, também chamada de via mitocondrial, é ativada por estímulos extra e intracelulares, não mediada por receptores, como o estresse oxidativo, a irradiação, danos ao DNA, privação de fatores de crescimento ou tratamento com substâncias citotóxicas, que levam à ativação de membros de proteínas com domínio BH3 da família de proteínas do linfoma de células B2 (BCL-2). As proteínas pró-apoptóticas dessa família (Bax/Bak) são ativadas e translocadas do citoplasma para a mitocôndria, inserindo-se na membrana externa da mitocôndria e induzindo a formação de poros, que medeiam a permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP) (GIACOMELLO et al., 2020; KALKAVAN; GREEN, 2018). O processo de MOMP favorece a liberação de fatores apoptogênicos como o citocromo c, que associa-se com o fator 1 de ativação de protease apoptótica (APAF1) e a pró-caspase 9, formando o apoptossoma. Em seguida, a pró-caspase 9 sofre autoclivagem, o que dá origem a sua forma ativa, a caspase 9, que irá clivar as pró-caspases 3, 6 e 7, convertendo-as às caspases efetoras 3, 6 e 7, que desencadeiam o processo apoptótico (BOOTH; ROBERTS; DENT, 2020; HINZ; LAGARES, 2020).

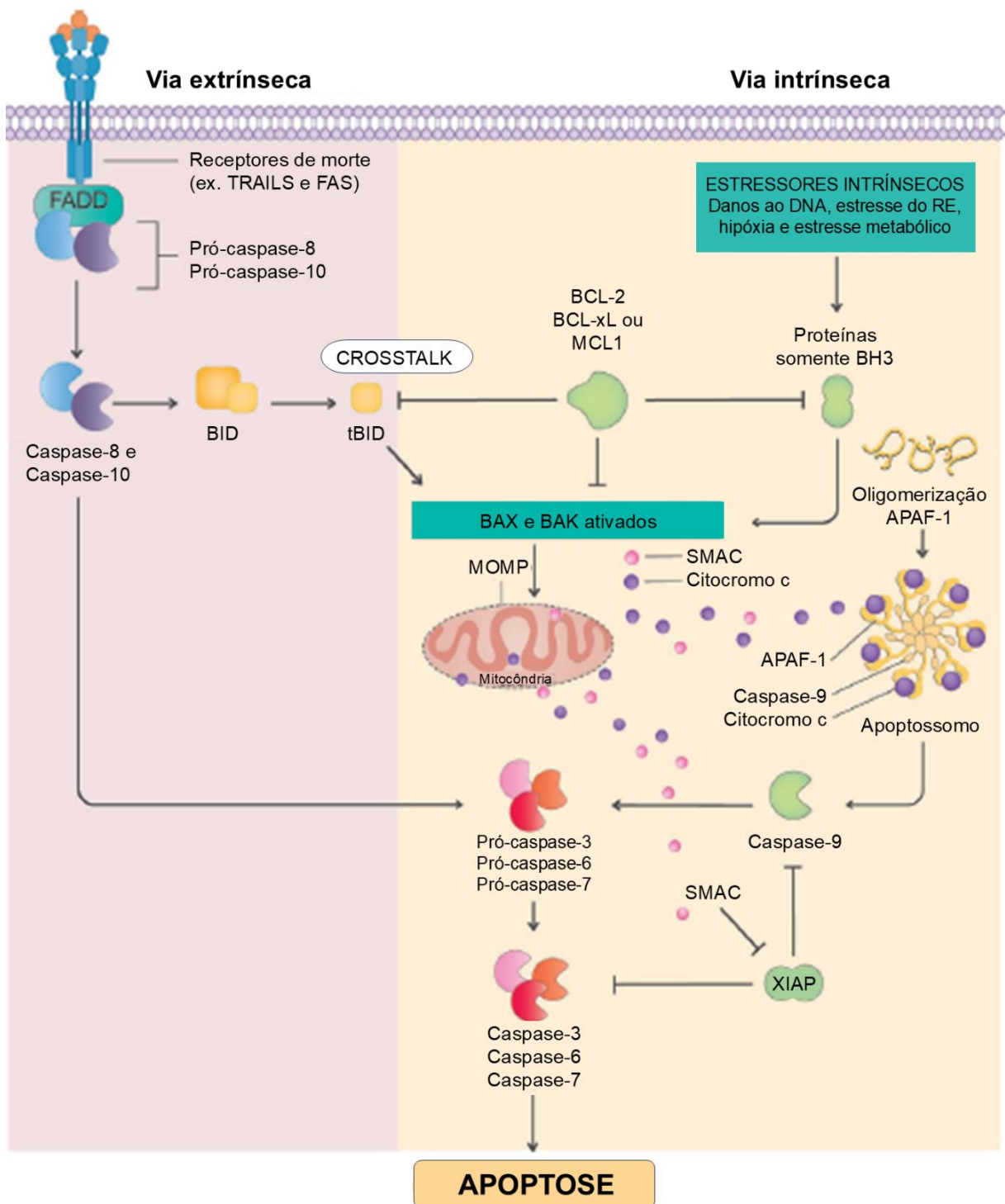
A regulação da via mitocondrial envolve membros da família BCL-2, que são divididos em proteínas pró-apoptóticas e antiapoptóticas, fundamentais no controle da apoptose. A ativação da via intrínseca envolve as proteínas pró-apoptóticas (Bim, Bid, Bad, Bmf, Bak, Bax, Puma e Noxa, por exemplo), que são sensíveis ao mecanismo de estresse celular e estimulam o processo apoptótico (WHITAKER; PLACZEK, 2019). Por outro lado, os membros antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w e A1, por exemplo) são proteínas pró-sobrevivência que controlam a permeabilização da membrana mitocondrial externa, inibindo a formação de poros, consequentemente

não possibilitando a liberação do citocromo c e, portanto, promovendo a inibição da apoptose (HINZ; LAGARES, 2020; SHARMA; BOISE; SHANMUGAM, 2019).

A via extrínseca é mediada por receptores de morte transmembranares, pertencentes à superfamília de receptores do fator de necrose tumoral (TNF) (XU; LAI; HUA, 2019), que são ativados por ligantes extracelulares que interagem com seus receptores de superfície específicos, como o ligante Fas (CD95), a família de ligantes do fator de necrose tumoral - TNF (TNFR1) e o ligante indutor de apoptose (TRAILR). A sinalização desencadeada pelo receptor é transmitida via domínio de morte associado a FAS (FADD), que promove a sua ligação com a caspase 8 (iniciadora), formando um complexo de sinalização indutor de morte (DISC). O complexo ativado promove a clivagem e ativação das caspases 3 e 7, que são designadas de caspases efetoras, responsáveis pela efetivação do processo apoptótico (BOOTH; ROBERTS; DENT, 2020; SHARMA; BOISE; SHANMUGAM, 2019).

Ainda, o *crostalk* entre as vias apoptóticas extrínseca e intrínseca envolve a caspase-8, que pode atuar diretamente sobre o substrato BID (CARNEIRO; EL-DEIRY, 2020), agonista de morte do domínio de interação BH3, e converter a proteína em BID truncado (tBID) (GALLUZZI et al., 2018). O tBID ativa BAK e BAX, que são ativadas e transcoladas para a membrana mitocondrial externa, produzindo MOMP e a ativação da via apoptótica intrínseca (BALAJI et al., 2021; GALLUZZI et al., 2018).

Figura 3. Vias da apoptose



Legenda: A apoptose é controlada por duas vias distintas, porém conectadas. A via intrínseca é desencadeada por estímulos de morte intracelulares, como danos no DNA, radiação, privação de nutrientes, estresse oxidativo ou ativação de oncogenes, que induzem a apoptose, promovendo a permeabilização da membrana externa mitocondrial (PMEM) e a liberação do citocromo c (cit. C), responsável pela ativação da caspase -9. Esta por sua vez cliva e ativa a caspase-3 e a caspase-7, que executam a apoptose. A via extrínseca é iniciada por ligantes extracelulares, como o ligante FAS (FASL), TNF ou TRAIL, que se ligam aos receptores de superfície celular FASR, TNFR TRAILR, respectivamente. A sinalização é transmitida via domínio de morte associado à FAS (FADD), que aciona a ativação da caspase-8 ou caspase-10, iniciando a apoptose por meio da clivagem e ativação

da caspase-3 ou caspase-7. BH3, homologia com BCL-2 domínio 3; BID, BCL-2, linfoma de células B 2; MCL1, leucemia de células mieloides 1; XIAP, inibidor da proteína de apoptose; APAF1, fator-1 de ativação de protease apoptótica.

Fonte: Adaptado de BALAJI et al., 2021.

A apoptose pode ser interrompida por inibidores de proteínas de apoptose (IAPs), como o Xiap, que podem regular negativamente as caspases, alterar a progressão do ciclo celular e modular a transdução de sinal mediada por receptor (Figura 3). As atividades das IAPs, podem ser suprimidas por proteínas mitocondriais produzidas endogenamente e liberadas para o citosol durante a apoptose, como as Smac/DIABLO, que atuam bloqueando os sítios de ligação das caspases aos IAPs, consequentemente estimulando a ativação de caspases e da apoptose (HINZ; LAGARES, 2020; PISTRITTO et al., 2016; QIN et al., 2016).

A apoptose é considerada uma importante estratégia terapêutica no tratamento de vários tipos de cânceres, pois constitui um dos principais mecanismos de morte induzidos por agentes com potencial anticâncer, os quais atuam promovendo alterações no DNA capazes de ativar moléculas pró-apoptóticas e desencadear a morte das células (CUI et al., 2018; PISTRITTO et al., 2016; REN et al., 2017; SUN et al., 2018).

Neste contexto, as proteínas antiapoptóticas BCL-2 (BCL-XL, BCL-W e BCL-2) com domínio BH3 exercem uma função importante no processo de promoção e sobrevivência celular em múltiplos tipos de neoplasias linfoides (BOSE; GANDHI; KONOPLEVA, 2017). Essas moléculas são alvos farmacológicos amplamente estudados em pesquisas clínicas e pré-clínicas, levando ao desenvolvimento de inibidores altamente seletivos, denominados de verdadeiros compostos BH3-miméticos (ASHKENAZI et al., 2017).

O primeiro inibidor BH3-mimético BCL-2, denominado ABT-737, apresentou afinidade para o sítio de ligação de BH3 de BCL-2, BCLXL e BCLW, e foi capaz de induzir apoptose em diferentes linhagens de células tumorais hematológicas. Para o uso oral na clínica, o ABT-737 foi transformado em ABT-263 ou navitoclax, aumentando sua biodisponibilidade, no entanto o composto induziu trombocitopenia e consequente apoptose plaquetária. Sendo assim, as limitações decorrentes da toxicidade do ABT-236 levaram a uma nova modificação para torná-lo específico, dando origem ao ABT-199 ou venetoclax (GUPTA et al., 2021). O venetoclax liga-se aos seus alvos e promove apoptose por meio da ativação das proteínas pro-

apoptóticas BAX/BAK e da liberação do citocromo c, componentes chaves envolvidos na via mitocondrial. Esse inibidor pode ser associado a outros fármacos, como por exemplo, dexametasona, bortezomibe e melfalano, sendo capazes de promover um sinergismo e induzir a morte celular (GUPTA et al., 2021; MATULIS et al., 2016).

Estudos pré-clínicos mostram o desenvolvimento de outros inibidores seletivos, como os inibidores MCL-1 (S64315 (MIK665), AZD5991, AMG176, AMG379, ABBV467) e inibidores BCL-XL (A-1155463 e A-1331852), que atuam de forma semelhante ao venetoclax no tratamento do mieloma múltiplo (MM) (GUPTA et al., 2021), da leucemia mieloide aguda (LMA) (ROBERTS; WEI; HUANG, 2021) e leucemia linfocítica crônica (LLC) (SAMRA et al., 2020). Entretanto, a literatura relata que alguns mecanismos de ação dos inibidores da família BCL-2 podem desencadear resistência às células tumorais, por aumentar a expressão de outras proteínas antiapoptóticas ou alterar o sequenciamento do gene BCL-2 (ROBERTS; WEI; HUANG, 2021).

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

No entanto, à exemplo dos inibidores miméticos BH3, os agentes quimioterápicos convencionais ainda apresentam alta toxicidade associada à sua baixa seletividade em células tumorais, o que influencia na aquisição de resistência associada ao tratamento (DICKENS; AHMED, 2018). Sendo assim, faz-se necessário aprofundar os estudos que conduzam ao desenvolvimento de fármacos mais eficazes, com baixa toxicidade, bem como reduzido potencial de resistência tumoral, com o objetivo de buscar alternativas terapêuticas aos fármacos usuais.

2.4 A sinalização das proteínas BCL-2 e o câncer

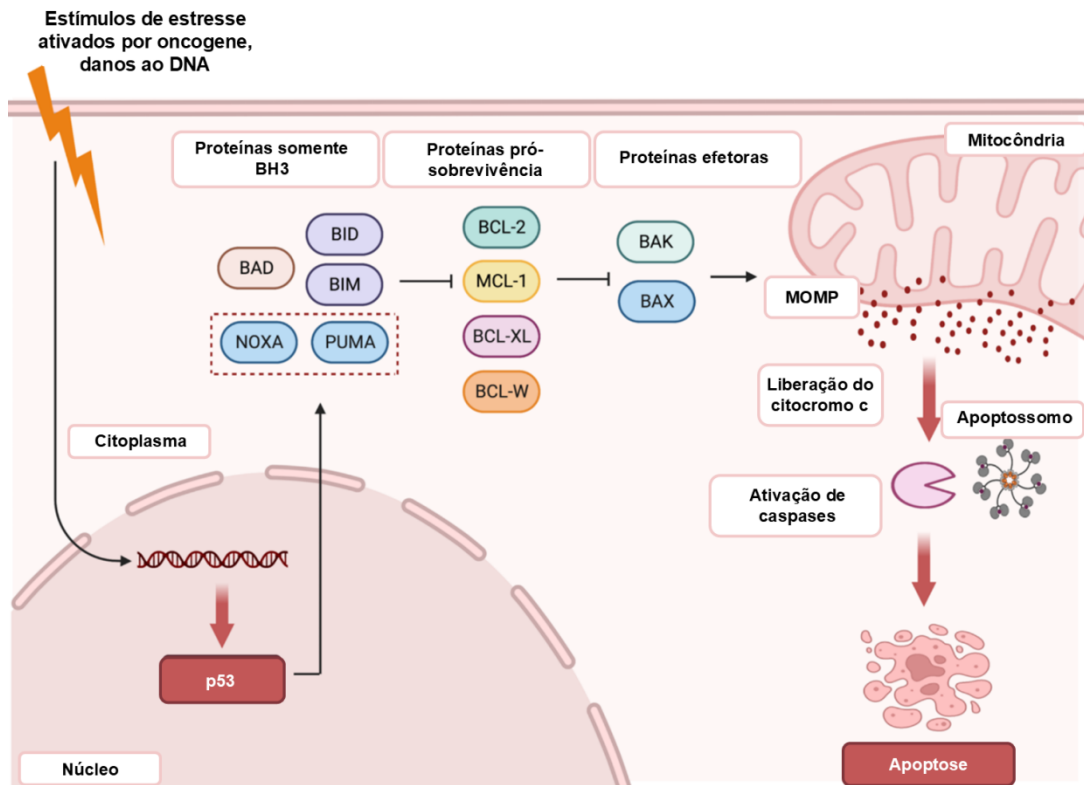
Como mencionado anteriormente, durante a apoptose diversas proteínas desempenham papéis fundamentais, atuando como reguladores centrais deste processo, a exemplo dos membros pertencentes à família BCL-2 (KALONI et al., 2023).

As proteínas da família BCL-2 foram identificadas e organizadas em três subgrupos com base nos domínios estruturais de aminoácidos e em suas principais funções, podendo ser divididas em: I) proteínas pró-apoptóticas somente BH3 (como exemplo BIM, BID, PUMA, BMF, NOXA, BIK, BAD e HRK) (ROUFAYEL et al., 2022); II) proteínas pró-sobrevivência ou antiapoptóticas (como exemplo, BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1 e A1/BFL-1) (LI et al., 2020); III) proteínas efetoras da apoptose (BAX, BAK e BOK) (FLORES-ROMERO et al., 2022). A interação dinâmica entre os membros desses subgrupos é o fator determinante para decidir se uma célula seguirá o caminho da apoptose ou permanecerá viável (QIAN et al., 2022).

Neste contexto, em células saudáveis as proteínas BCL-2 antiapoptóticas inibem os efetores da apoptose BAX e BAK, garantindo a manutenção da homeostase celular (KALONI et al., 2023). Diversos estímulos estressores, como a ausência de fatores de crescimento, privação de nutrientes, estresse oxidativo, radiação ultravioleta e exposição a medicamentos citotóxicos, por exemplo, podem atuar como agentes indutores que promovem o aumento nos níveis de proteínas pró-apoptóticas somente BH3 por meio de mecanismos regulatórios transcricionais e/ou pós-transcricionais (BRUMATTI et al., 2023). Essas proteínas possuem alta afinidade para se ligar às proteínas antiapoptóticas BCL-2, resultando na liberação de BAX e BAK (HUANG et al., 2019). Ainda, algumas proteínas somente BH3, como PUMA, BIM e tBID (forma ativada de BID) são capazes de se ligar e ativar diretamente BAX e BAK. Após serem ativados, BAX e BAK formam oligômeros que geram poros na membrana externa da mitocôndria, promovendo a sua permeabilização em um processo conhecido como MOMP (DADSENA; JENNER; GARCÍA-SÁEZ, 2021). Este permite a liberação de fatores pró-apoptóticos das mitocôndrias, como o citocromo c e SMAC/DIABLO (ativador de caspase derivado da mitocôndria) (COSENTINO; GARCÍA-SÁEZ, 2017; ROBERTS; WEI; HUANG, 2021; UREN; IYER; KLUCK, 2017). No citoplasma, o citocromo c interage com o fator de ativação da peptidase apoptótica 1 (APAF1) e a caspase-9, formando o apoptossomo, que desencadeia a cascata de ativação das

caspsases. Simultaneamente, o SMAC neutraliza a ação da proteína inibidora de apoptose (XIAP), permitindo a ativação das caspsases efetoras e morte celular (SHAKERI; KHEIROLLAHI; DAVOODI, 2021) (Figura 4).

Figura 4. Via de sinalização intracelular da família de proteínas BCL-2 (linfoma/leucemia de células B-2)



Legenda: A via intrínseca da apoptose é regulada pela família de proteínas BCL-2, ativada em resposta a diferentes tipos de estresse, como danos ao DNA ou ativação de oncogenes. Esses estímulos promovem o aumento dos níveis de proteínas somente BH3 (como PUMA, NOXA, BIM, BID e BAD) por meio de mecanismos transcricionais e pós-transcricionais. Os genes de PUMA e NOXA são ativados diretamente pelo supressor tumoral TP53/TRP53. As proteínas somente BH3 se ligam com alta afinidade às proteínas pró-sobrevivência da família BCL-2 (como BCL-2, BCL-XL e MCL-1), liberando as proteínas efetoras pró-apoptóticas BAX e BAK de sua inibição. Além disso, algumas proteínas somente BH3, como PUMA, BIM e t-BID (a forma ativada de BID), podem ativar diretamente BAX e BAK. Uma vez ativadas, essas proteínas efetoras se oligomerizam, formando poros na membrana mitocondrial externa. Esse processo resulta na permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP), permitindo a liberação do citocromo c do espaço intermembranas para o citoplasma. No citoplasma, o citocromo c associa-se com o fator de ativação da protease apoptótica 1 (APAF-1), formando o apoptossomo, que desencadeia a cascata de caspases, promovendo a apoptose.

Fonte: Adaptado de Kaloni et al., 2023.

A superexpressão ou ativação anormal das proteínas BCL-2 antiapoptóticas, principalmente BCL-2, MCL-1 e BCL-XL, juntamente com a expressão reduzida de membros da família BCL-2 pró-apoptótica, são frequentemente expressas em linfomas e leucemias, sendo diretamente associada à sobrevivência e proliferação de

células cancerosas, além de contribuir para a resistência à terapias (ZHANG; LU; ZHAO, 2021). Essa ativação desregulada promove impactos na progressão, metástase e recorrência de diversos tipos de cânceres (LEE et al., 2017a). Por essa razão, os níveis de Bcl-2 e sua atividade tornaram-se indicadores importantes para avaliar a eficácia de tratamentos clínicos e prever o prognóstico (MERINO et al., 2018).

Neste contexto a translocação cromossômica t (14;18) resulta na superexpressão desregulada da proteína BCL-2 no linfoma folicular humano (LF) (OISHI, 2023). Níveis elevados de BCL-2 também foram identificados em diversas outras malignidades hematológicas, como leucemia linfocítica crônica (LLC) (ALBUQUERQUE et al., 2024) e linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) (MATULIS; BOISE, 2020), além de alguns tumores sólidos, incluindo o câncer de cérebro (HE et al., 2022), mama (LUCANTONI et al., 2021) e pulmão (ALAM et al., 2022).

Cerca de 3% dos cânceres humanos de diferentes origens apresentam amplificação somática da região genômica que contém o gene BCL-XL (KALONI et al., 2023). A literatura relata que níveis elevados de BCL-XL desempenham um papel essencial na progressão de gliomas (RAHMAN et al., 2020), câncer de mama (BESSOU et al., 2020), mieloma múltiplo humano (MM) (PARRONDO; PAULUS; AILAWADHI, 2022), melanoma (LUCIANÒ et al., 2021), linfomas específicos (linfomas não-Hodgkin de células B e T) (MORALES-MARTÍNEZ; VEGA, 2022; SEJIC et al., 2020) e câncer colorretal (SCHERR et al., 2020). Logo, tumores que apresentam estas alterações constituem alvos para o tratamento com inibidores de BCL-XL, especialmente quando combinados com inibidores de cinases oncogênicas, podendo potencializar os efeitos das quimioterapias usuais (BHARTI et al., 2022).

A terapia direcionada para proteínas da família BCL-2 consiste em reduzir os níveis de BCL-2 ou inibir a sua atividade, aumentando significativamente a sensibilidade das células tumorais à apoptose (KALONI et al., 2023). Além disso, a inibição específica desta proteína mostrou ser eficaz na redução da resistência a múltiplos fármacos (MDR) em células cancerosas, facilitando a interrupção do ciclo celular, a indução de senescência e a morte celular (JONES et al., 2018; WANG et al., 2020). Assim, a inativação direcionada de BCL-2 se destaca como uma estratégia terapêutica promissora na terapia do câncer (DIEPSTRATEN et al., 2022).

Com relação aos tratamentos direcionados já estabelecidos, a primeira classe de fármacos desenvolvida foram os miméticos BH3, com base na sequência do

domínio dos membros pró-apoptóticos da família BCL-2 (SARASWATHY et al., 2023). Esses compostos têm demonstrado capacidade de se ligar de maneira eficaz e específica à proteína BCL-2, inibindo a sua atividade e induzindo a apoptose independentemente de p53 (DIEPSTRATEN et al., 2024; TOWNSEND et al., 2021). Dentre eles pode-se mencionar os: (I) compostos que atuam em BCL-2 e BCL-xL, como exemplo ABT-737, ABT-263, BM-1197 e AZD4320 (CHENG et al., 2021b; COOLEY et al., 2023; SUN et al., 2020; TAKIMOTO-SHIMOMURA et al., 2019); (II) compostos que têm como alvo BCL-2, Mcl-1, S1-6 (Inibidor específico 6) e Nap-1 (Proteína de montagem do nucleossomo 1) (WANG et al., 2019); (III) agentes específicos para Bcl-2, como exemplo ABT-199, Composto 4 e S55746 (CASARA et al., 2018; ELHINNAWI et al., 2018; WELLER et al., 2022).

Estudos realizados com o composto ABT-199, demonstraram eficácia significativa no tratamento de leucemia linfocítica crônica (LLC) (JAIN et al., 2019), leucemia mieloide aguda (LMA) e linfoma linfocítico de pequenas células (SLL) em casos refratários ou de recidivas (KAROL et al., 2020). Além disso, a pesquisa clínica de fase III revelou que o ABT-199 em associação com o rituximabe proporciona taxas superiores de sobrevida livre de progressão (SLP) de 2 anos, em comparação com a combinação de bendamustina e rituximabe, para pacientes com LLC recidivada ou refratária (SEYMOUR et al., 2018). Adicionalmente, a combinação do ABT-199 com a ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona, foi capaz de promover efeitos antitumorais significativos contra linfoma não-Hodgkin de células B (DE JONG et al., 2019; ROBAK et al., 2019).

Ainda, os inibidores pan-BCL-2 são considerados drogas multi-alvo, caracterizados por uma estrutura de polipirrol/polifenol aprimorada, com a capacidade de direcionar e inibir concomitantemente BCL-2 e outras proteínas antiapoptóticas, como BCL-xL e Mcl-1 (ZHANG; LU; ZHAO, 2021). A exemplo da classe, o AT-101 é um isômero de gossipol (polifenol), que demonstrou potencial terapêutico para LLC, câncer de cabeça e pescoço, além de tumores sólidos avançados, como câncer de próstata resistente (ZHANG et al., 2017). Em contraste, a toxicidade induzida pelo composto tem limitado a sua utilização clínica (SUVARNA; SINGH; MURAHARI, 2019), estimulando a síntese de um novo fármaco, o Apogossypol, que mostrou ter maior eficácia e menor toxicidade do que o gossipol contra as células de linfoma de células B e leucemia (IKSEN et al., 2024; ZHANG; LU; ZHAO, 2021).

Por fim, os produtos naturais também têm demonstrado significativa atividade antitumoral, associado à baixa citotoxicidade e reduzida resistência a múltiplos medicamentos, atuando especificamente nas proteínas da família BCL-2 (GUO et al., 2022). Como exemplo pode-se citar a: I) Cerberina, extraída de *Cerbera odollam*, regula negativamente BCL-2 e Mcl-1, inibindo a via PI3K/Akt/mTOR e induzindo a apoptose em células de câncer de mama, pâncreas e cólon (HOSSAN et al., 2019); II) Tetrandrina, derivada de *Stephania tetrandra*, que induz o aumento da expressão de Bax e subsequente ativação das caspases 3 e 8, promovendo a parada do ciclo celular e a apoptose em células de câncer de cólon (LI et al., 2019); e a III) Saponina VII de Paris, derivada de *Trillium tschonoskii*, que ativa a apoptose em células de câncer colorretal, por meio da redução da expressão de BCL-2 e aumento de Bax (ZHOU et al., 2019).

O uso desses agentes terapêuticos, representantes das diferentes classes de drogas BCL-2 específicas, tem demonstrado um promissor efeito antitumoral quando empregados isoladamente ou em combinação com a radioterapia e/ou outros quimioterápicos (ALHOSHANI et al., 2020; LE GOUILL et al., 2021; XU et al., 2023). Contudo, a família de proteínas BCL-2 é extensamente expressa em células sadias do corpo humano, envolvidas no desenvolvimento e na homeostase celular (CZABOTAR; GARCIA-SAEZ, 2023). Assim, o desenvolvimento de inibidores de Bcl-2 altamente específicos para as células tumorais e com baixa toxicidade em células não tumorais, permanece um desafio, sendo incessante a busca de novas drogas seletivas (ZHANG; LU; ZHAO, 2021).

2.5 Estresse oxidativo e o câncer

O estresse oxidativo é caracterizado pela geração excessiva de moléculas altamente reativas, como as espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), resultando em um desequilíbrio que reduz a eficiência dos sistemas antioxidantes celulares (MOLONEY; COTTER, 2018). Esse processo compromete a sinalização e o controle redox, sendo capaz de promover danos moleculares em diferentes macromoléculas, como proteínas, lipídios e DNA, a partir do processo de oxidação. O aumento dos níveis das espécies reativas tem sido associado ao desenvolvimento de diversos tipos de cânceres por desencadear uma

instabilidade genética e sustentar a tumorigênese (HUANG; NAN, 2019; KLIESER et al., 2019).

Neste contexto, as espécies reativas de oxigênio (EROs) constituem um grupo de compostos intracelulares que possuem elétrons desemparelhados na camada mais externa, formado pela redução parcial do oxigênio. Entre elas estão as moléculas radicais como o ânion superóxido e o radical hidroxila, e as moléculas não radicais como o peróxido de hidrogênio, ambos com alta reatividade e instabilidade química (KLIESER et al., 2019; MILKOVIC et al., 2019; MOLONEY; COTTER, 2018).

As EROs celular são provenientes de duas fontes distintas: I) endógenas, quando produzidas a partir do metabolismo oxidativo de organelas como as mitocôndrias, retículo endoplasmático e peroxissomos (SNEZHKINA et al., 2019, 2020); e II) exógenas, quando produzidas em resposta celular a xenobióticos, bactérias e citocinas, bem como em decorrência da exposição à fatores externos, como a radiação ultravioleta e os poluentes químicos, por exemplo (CHEN; XIE, 2018; ZHANG et al., 2016) (Figura 5).

Em concentrações fisiológicas, a produção e eliminação de EROs são equilibradas. Níveis baixos e moderados de EROs desempenham papéis benéficos em diversos processos importantes, como a sinalização celular, a regulação da expressão gênica, a defesa contra microorganismos, a cicatrização de feridas e o reparo de tecidos (HUANG; NAN, 2019; KIRTONIA; SETHI; GARG, 2020; SRINIVAS et al., 2019). Contudo, o desequilíbrio entre os níveis de oxidantes e antioxidantes, provocado por alterações na homeostase celular, contribui para o desenvolvimento de diversas patologias, incluindo doenças neurodegenerativas, aterosclerose e câncer (KLIESER et al., 2019; LIU et al., 2017b; MILKOVIC et al., 2019). Neste sentido, as células desenvolveram vários sistemas de defesa antioxidantes para combater e limitar os danos causados pelo aumento nos níveis de EROs. Estes incluem moléculas não enzimáticas, como vitaminas C, E e A (BODEGA et al., 2019), bem como componentes enzimáticos, como por exemplo a superóxido dismutase (SOD), tioredoxina (Trx), glutatona redutase (GR), glutatona peroxidase (GPx), peroxirredoxina (Prx) e catalases, que equilibram e previnem a produção de EROs (CHEN; XIE, 2018; SNEZHKINA et al., 2020; YANG; CHEN; SHI, 2019a) (Figura 5).

Apesar disso, os níveis de EROs podem se sobrepor aos mecanismos de controle antioxidantes das células, resultando em estresse oxidativo e no desenvolvimento de patologias como o câncer. Neste contexto, as espécies reativas

de oxigênio desempenham um papel dual nas células tumorais: os baixos níveis de EROs podem estar associadas à iniciação e progressão de tumores, enquanto o seu aumento pode ativar vias de sinalização que sustentam a sobrevivência celular, por ativar oncogenes, inibir genes supressores de tumor, inativar a apoptose, assim como estimular o aumento da proliferação celular, angiogênese e metástase (HUANG; NAN, 2019; KUMARI et al., 2018; MILKOVIC et al., 2019; SAJADIMAJD; KHAZAEI, 2018). Em contrapartida, alguns agentes quimioterápicos podem induzir o aumento excessivo dos níveis de ROS intracelulares, promovendo danos teciduais irreversíveis que conduzem as células tumorais à morte (KIRTONIA; SETHI; GARG, 2020; YANG; CHEN; SHI, 2019a).

No câncer colorretal (CCR), as EROs são originadas principalmente por células da mucosa e pelo sistema imunológico inato (MOLL et al., 2018). Durante o processo inflamatório, células de defesa como leucócitos polimorfonucleares (PMN), neutrófilos e monócitos, produzem quantidades excessivas de EROs por meio da fagocitose (ANDRÉS et al., 2022). Ademais, a NADPH oxidase 1 (NOX1) apresenta um papel crucial no CRC, pois é responsável por produzir altos níveis de EROs, que regulam processos como proliferação, sobrevivência e diferenciação celular. Embora contribua para a homeostase intestinal em condições fisiológicas normais, sua superexpressão ou desregulação está ligada ao desenvolvimento e progressão do tumor (YAMAMOTO et al., 2018).

A produção de EROs mediada pela NOX1 é fundamental para ativar as vias de sinalização Wnt/ β -catenina, Notch, das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógeno (MAPKs) e do Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B) (PENG et al., 2020a; STEINHART; ANGERS, 2018; TACIAK et al., 2018). A desregulação dessas vias pode levar a uma aumento significativo da proliferação celular, interrupção do ciclo celular, alterações na diferenciação das células e apoptose (PENG et al., 2020b; PRANTEDA et al., 2020; TAKATA et al., 2020; ZHU; LI, 2023).

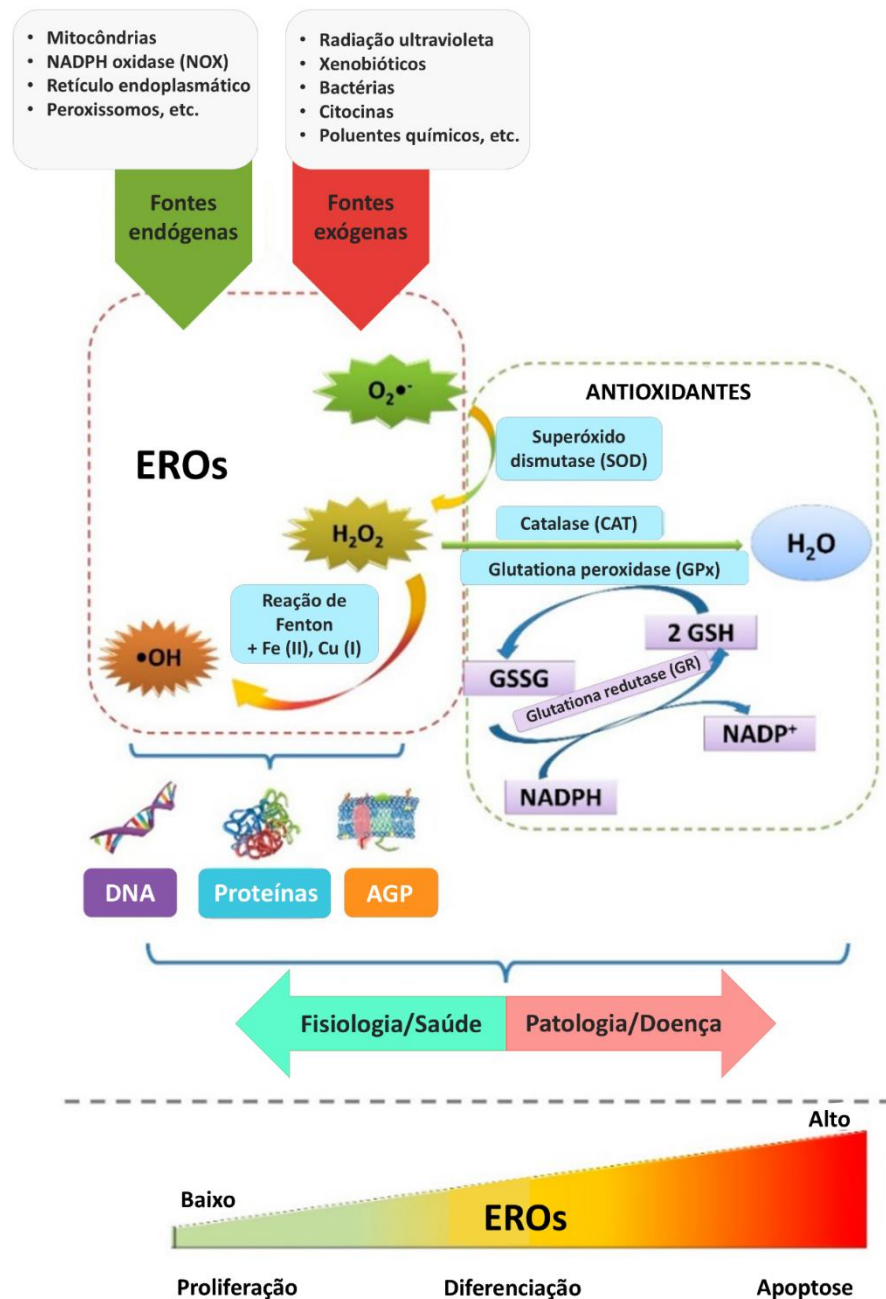
Embora muitos estudos demonstrem que o estresse oxidativo pode promover a iniciação, a promoção e a progressão do câncer, a produção exacerbada de EROs em células tumorais também pode induzir a apoptose como resposta terapêutica (YANG; CHEN; SHI, 2019b). Vários medicamentos induzem o estresse oxidativo celular, aumentando diretamente os níveis intracelulares de EROs, através da ativação de diferentes vias de sinalização, como por exemplo a via das MAPKs (Proteínas Quinase Ativadas por Mitógenos). As Proteínas Cinases Reguladas por

Sinais Extracelulares 1 e 2 (ERK 1/2), Proteínas Cinase c-Jun N-terminal (JNK) e Proteínas Cinases Ativadas por Mitógeno p38 (DHANASEKARAN; REDDY, 2017; ZHANG et al., 2019b), pertencentes a esta família de proteínas, uma vez fosforiladas e ativas podem atuar sobre moléculas antioxidantes (GSH) e fosfatases (DUSP), levando à perda da homeostase redox e subsequentemente à apoptose (MOLONEY; COTTER, 2018; ZHANG et al., 2016).

Drogas antitumorais da classe antraciclina, como a epirrubicina e a doxorubicina, atuam inibindo a síntese de DNA e a atividade da topoisomerase II, resultando no aumento de EROs, danos no DNA e consequente atividade antitumoral (GARG et al., 2017; MIKUŁA-PIETRASIĆ et al., 2019). Além disso, drogas à base de platina, como a cisplatina, são eficazes por induzirem altos níveis de EROs, promovendo um efeito anticâncer em células HCT-116 (câncer de cólon) e A549 (câncer de pulmão), atuando por meio da redução de antioxidantes como GSH e GPX, bem como pela ativação da apoptose (GUO et al., 2018; KIRTONIA; SETHI; GARG, 2020).

Nesse contexto, as terapias anticâncer colorretal geralmente adotam duas estratégias principais: inibir o crescimento das células tumorais e/ou modificar o microambiente tumoral (KIM et al., 2017; PEDROSA et al., 2019). O aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) tem sido relacionado à indução da morte celular e à modulação do microambiente tumoral, contudo é relatado na literatura que este mesmo efeito também pode estar associado ao desenvolvimento de resistência aos quimioterápicos, devido à capacidade das células cancerígenas se adaptarem a níveis elevados de EROs (FIOCCHETTI et al., 2019). Portanto, diante do exposto, esse cenário tem impulsionado a busca por novos agentes terapêuticos que promovam a morte das células tumorais por meio do estresse oxidativo, constituindo uma abordagem promissora no tratamento do CCR.

Figura 5. A formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e os efeitos das alterações de seus níveis nas células



Legenda: O esquema ilustra as fontes endógenas (como a cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias, oxidases dependentes de NADPH, peroxissomos e retículo endoplasmático) e exógenas (como luz ultravioleta, xenobióticos, bactérias, citocinas, poluentes químicos, entre outras) responsáveis pela geração de EROs. Para manter o equilíbrio redox e o funcionamento celular adequado, as células possuem sistemas enzimáticos antioxidantes, tais como a glutathione (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX), que controlam os níveis de EROs. A SOD catalisa a conversão de ânions superóxido em peróxido de hidrogênio, que pode ser posteriormente reduzido a água por meio de uma reação catalisada pela CAT ou pela GPX. A reação envolvendo a GPX requer a oxidação da GSH e a formação de dissulfeto de glutathione (GSSG), que é regenerado em GSH pela ação da glutathione redutase. No entanto, a presença de metais catalisa a formação de radicais hidroxila, a partir do peróxido de hidrogênio por meio da reação de Fenton. Em

concentrações moderadas, as EROs modulam fatores de transcrição, enzimas e outras proteínas, ativando vias de sinalização essenciais para a manutenção das funções celulares e da saúde geral. Contudo, níveis excessivos destas espécies podem causar danos permanentes a macromoléculas, contribuindo para o desenvolvimento de doenças. Dependendo de sua concentração, as EROs também influenciam processos celulares como a proliferação, diferenciação e apoptose.

Fonte: Adaptado de Milkovic et al., 2019.

2.6 Proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs)

A super família de proteínas quinases ativadas por mitógenos, conhecida como MAPKs, é composta por um conjunto de serina/treonina cinases envolvidas na transdução de sinais fisiológicos extracelulares (como hormônios, citocinas e fatores de crescimento, por exemplo) em cascatas de sinalização intracelular (LEE; RAUCH; KOLCH, 2020a). Por meio da ligação e fosforilação de diferentes alvos proteicos as MAPKs são capazes de modular diferentes vias de sinalização relacionadas à processos biológicos cruciais como a proliferação celular, diferenciação, sobrevivência, inflamação e apoptose (WEI et al., 2021).

As MAPKs podem ser classificadas em três subfamílias, denominadas Proteínas Cinases Reguladas por Sinais Extracelulares (ERK), Proteínas Cinase c-Jun N-terminal (JNK) e Proteínas Cinases Ativadas por Mitógeno p38 (OLIVEIRA et al., 2019; YUE; LÓPEZ, 2020a). As proteínas ERKs são ativadas por fatores de crescimento e/ou mitógenos, promovendo a proliferação, crescimento e diferenciação celular, enquanto as JNKs e a p38 MAPK respondem à sinais de estresse (extracelular e intracelular) e/ou citocinas, estando envolvidas na regulação dos processos de apoptose, inflamação, ciclo celular e do metabolismo (DONOHOE et al., 2020).

A cascata de sinalização das vias das MAPKs é ativada por meio da fosforilação de proteínas quinases em três etapas distintas e sequenciadas, que incluem uma MAPK, uma MAPK quinase (MAPKK ou MAP2K) e uma MAPK quinase quinase (MAPKKK ou MAP3K) (LEE; RAUCH; KOLCH, 2020a). Já a inativação de MAPKs envolve a ação de fosfatases de tirosina ou fosfatases de especificidade dupla (DUSPs), que executam a desfosforilação de resíduos de treonina e/ou tirosina em resposta a sinais extra ou intracelulares (YUE; LÓPEZ, 2020b).

A ERK apresenta duas isoformas clássicas, ERK1 e ERK2, ativadas por fatores de crescimento que se ligam ao receptor tirosina quinase (RTK) na membrana plasmática e realizam a dimerização e transfosforilação do receptor, culminando com

a ativação e recrutamento de proteínas adaptadoras, a exemplo do fator de crescimento ligado a proteína 2 (GRB2). O fator de troca do nucleotídeo de guanina (SOS) induz a troca do difosfato de guanosina (GDP) ligado por trifosfato de guanosina (GTP) (GUO, YAN-JUN et al., 2020), ativando a proteína Ras. As proteínas Ras são membros de uma superfamília de pequenas proteínas de ligação e hidrólise de GTP (GTPases), que funcionam como comutadores binários GDP/GTP regulados (SHAH et al., 2019; SIMANSHU; NISSLEY; MCCORMICK, 2017). Uma vez ativa, adquire a forma Ras-GTP, que estimula diversas proteínas quinases citoplasmáticas, tais como Raf (MAP3K), MEK (MAP2K) e ERK1/2 (MAPK), as quais são translocadas para o núcleo e fosforilam diversas moléculas alvo, responsáveis pela transcrição de genes que promovem a proliferação celular (MAIK-RACHLINE; HACHOEN-LEV-RAN; SEGER, 2019) (Figura 6).

A proteína cinase JNK possui três principais isoformas: JNK1, JNK2 e JNK3, codificadas por genes distintos localizados em diferentes cromossomos. Essas isoformas desempenham um papel importante na regulação da expressão gênica, que envolve a ativação da proteína c-Jun por meio da fosforilação de resíduos de serina na extremidade N-terminal (MAIK-RACHLINE; WORTZEL; SEGER, 2021; WU et al., 2019). As JNKs, são predominantemente ativadas em resposta a estímulos de estresse (YUE; LÓPEZ, 2020b), que desencadeiam a ativação de MAPKKs, incluindo as Cinases Ativadoras de MAP Cinase 1 a 4 (MEKK1-4) e as Cinases Reguladoras de Apoptose 1 e 2 (ASK1/2). Essas MAPKKs ativam as MAPKKs 4 e 7 (MKK4 e MKK7), que, por sua vez, promovem a ativação das JNKs por meio da fosforilação de resíduos de treonina (Thr) e tirosina (Tyr) (PARK; BAEK, 2022; XU; HU, 2020).

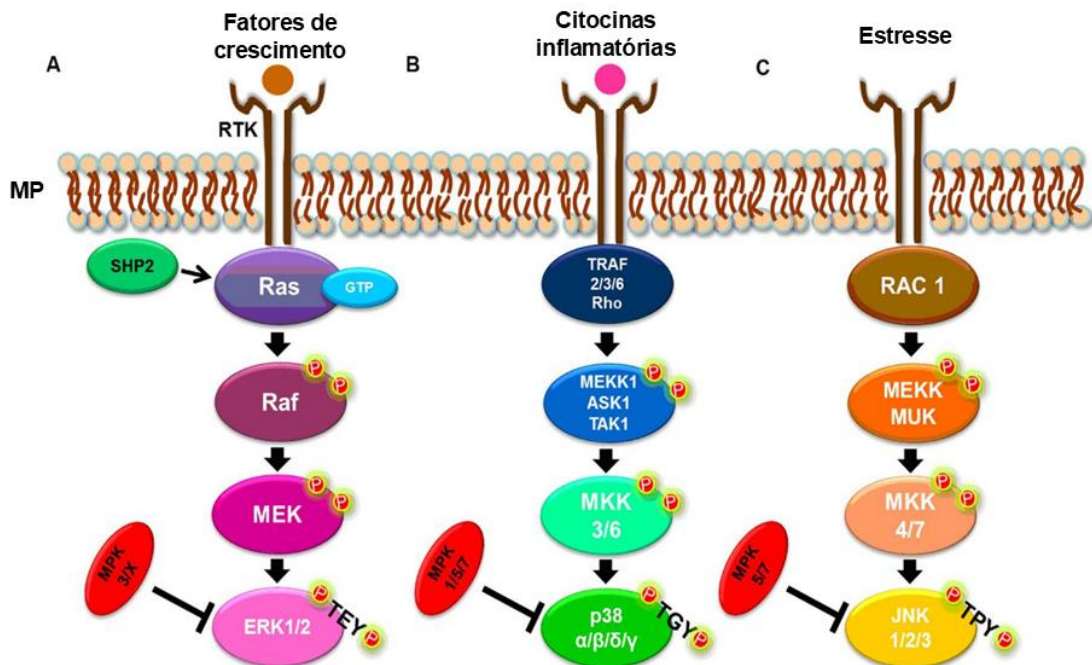
Uma vez ativadas, as JNKs promovem a fosforilação de proteínas Jun (JunB, JunD e c-Jun), facilitando sua interação com proteínas Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 e Fra-2). Essa interação resulta na formação do fator de transcrição AP-1 (Proteína Ativadora-1), que ativa a transcrição de genes-alvo (GKOUVERIS; NIKITAKIS, 2017; HAMMOUDA et al., 2020). Além disso, a ativação da JNK regula outros fatores de transcrição, incluindo o fator de transcrição ativador 2 (ATF-2), o gene supressor tumoral p53, o transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT), além de proteínas associadas à apoptose mitocondrial, como os membros da família Bcl-2, incluindo Bcl-2, Bad, Bim e Bax (LEE; RAUCH; KOLCH, 2020a; XU; HU, 2020).

As proteínas p38 MAPK são codificadas por genes distintos e possuem quatro isoformas: p38 α , p38 β , p38 γ e p38 δ (KUDARAVALLI; DEN HOLLANDER; MANI, 2022). Entre elas, a p38 α MAPK apresenta ampla expressão em diversos tipos celulares, enquanto as demais isoformas são predominantemente restritas a tecidos específicos (MARTÍNEZ-LIMÓN et al., 2020). Por exemplo, a p38 β MAPK é mais expressa no cérebro, a p38 γ MAPK é encontrada principalmente nos músculos esqueléticos, e a p38 δ MAPK está presente em órgãos como os rins, pâncreas, intestino delgado e testículos (GARCÍA-HERNÁNDEZ et al., 2021).

De forma semelhante a JNK, a via p38 MAPK é ativada principalmente em resposta a sinais de estresse e estímulos inflamatórios associados à exposição à radiação UV, situações hipóxicas e episódios de isquemia (GARCÍA-HERNÁNDEZ et al., 2021; LEE; RAUCH; KOLCH, 2020b). Essas proteínas possuem um papel dual, podendo tanto favorecer a sobrevivência celular quanto induzir a morte celular, dependendo dos mecanismos e contextos fisiológicos ou patológicos envolvidos (STEFANI et al., 2021).

Nesse contexto, a ativação dessa via tem início com a ativação de proteínas da família Rho GTPase, como Rac e Cdc42, que atuam como reguladores upstream da cascata de sinalização. Essas proteínas ativam as MAPKKKs, incluindo MEKK3, MEKK4, ASK1 (cinase 1 reguladora do sinal de apoptose) e TAK1 (cinase 1 ativada por TGF β). As MAPKKKs, por sua vez, ativam as MAPKKs, MKK3 e MKK6, que fosforilam os resíduos de treonina e tirosina da p38 MAPK, ativando-a (GARCÍA-HERNÁNDEZ et al., 2021; LIU et al., 2018) (Figura 6). A p38 MAPK ativa pode modular outras proteínas cinases ou ativar fatores de transcrição, como o transdutor de sinal e ativador de transcrição 1 (STAT1). A regulação dessa via é mediada por fosfatases, como DUSP1, DUSP10 e DUSP16 (GAO et al., 2021), sendo que sua desregulação está associada ao desenvolvimento de várias doenças, a exemplo do câncer (KUDARAVALLI; DEN HOLLANDER; MANI, 2022).

Figura 6. Vias das MAPKs



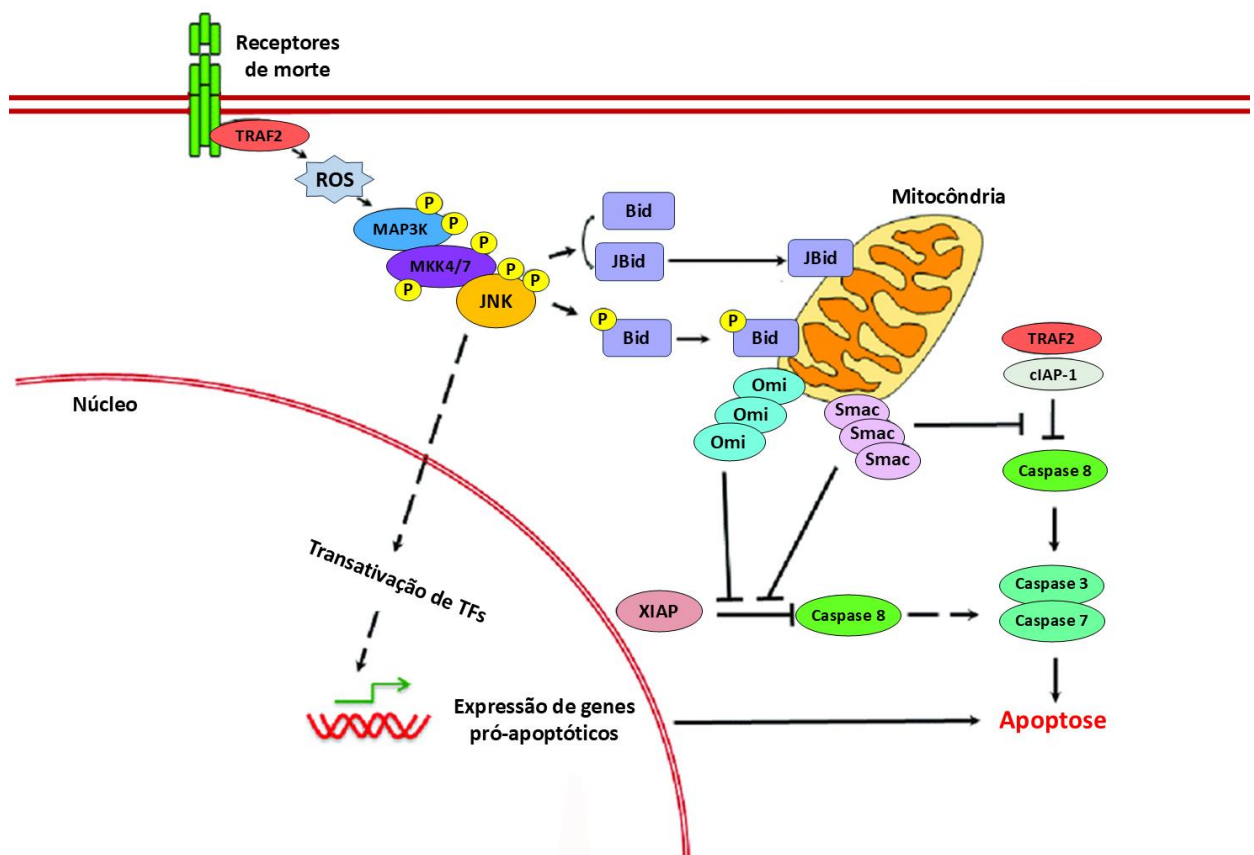
Legenda: Organização das vias das MAPKs. O núcleo MAPK consiste em três quinases (MAPKKK, MAPKK e MAPK), que formam uma cascata de sinalização que transduzem a sinais fisiológicos (hormônios, citocinas, fatores de crescimento e estresse) capazes de ativar diferentes vias por meio da ligação e fosforilação de alvos proteicos envolvidos em diferentes processos biológicos. **Fonte:** Adaptado de Silva et al., 2016.

As proteínas da família BCL-2 (pró e antiapoptóticas) são ativadas ou inativadas em resposta ao controle da sinalização das vias de JNK e/ou p38 MAPK, em nível transcricional e/ou pós-transcricional (GREEN; LLAMBI, 2015). Assim, a regulação de diferentes fatores de transcrição podem promover o aumento de proteínas pró- apoptóticas, bem como a redução da expressão de proteínas antiapoptóticas. O fator de transcrição AP-1 (proteína ativadora 1), representado pelos membros Jun e Fos, estão sob o controle das cascatas de JNK e p38 por exemplo, em que c-Jun pode ser fosforilado e ativado por JNK e/ou p38, resultando na autorregulação da sua expressão (feedback positivo). A ativação de AP-1 tem um papel dual (pró ou anti-apoptótico), promovendo respostas a vários processos celulares, como proliferação, diferenciação, sobrevivência e apoptose (SOARES-SILVA et al., 2016).

Semelhante ao AP-1, proteína supressora de tumor p53 pode ser regulada em condições de estresse por meio da fosforilação dependente de JNK e, uma vez ativada pode desencadear a morte celular por apoptose (CHO et al., 2020). Ainda, as

MAPKs JNK e p38 podem atuar diretamente nas vias apoptóticas extrínseca e intrínseca (Figuras 7 e 8). Na via extrínseca (Figura 7), induzem a ativação da caspase-8, que cliva a proteína Bid pró-apoptótica em sua forma truncada C-terminal (tBid), que por sua vez induz a liberação do citocromo c na mitocôndria, responsável por ativar a caspase 9 e sequencialmente as caspases efetoras 3, 6 e 7, promovendo a apoptose. A ubiquitina proteína ligase E3 (iTCH) é um importante alvo de JNK, pois uma vez fosforilada promove a degradação do inibidor de caspase-8, o c-FLIP (proteína inibitória celular FLICE), levando à ativação da caspase-8 e de Bid, e consequentemente à morte celular programada (Figura 9) (YUE; LÓPEZ, 2020a).

Figura 7. Cascata de sinalização das proteínas Cinases c-Jun N-terminal (JNK) na via extrínseca da apoptose

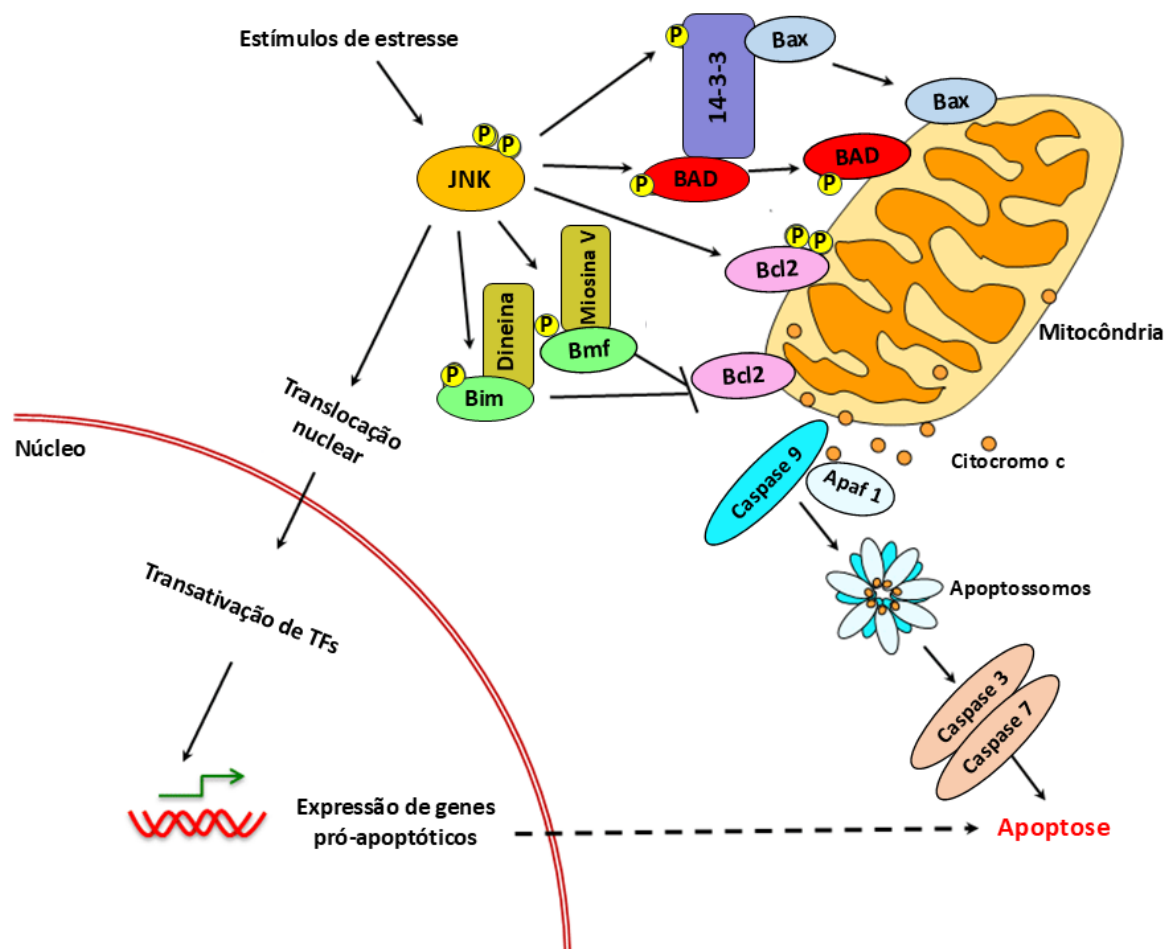


Legenda: JNK, ativada por receptores de morte, desempenha um papel central na indução da via extrínseca da apoptose ao estimular a expressão de receptores de morte, ligantes e proteínas pró-apoptóticas, bem como por meio da fosforilação direta da proteína Bid. A fosforilação de Bid resulta em sua clivagem, gerando a forma truncada jBid, que se transloca para as mitocôndrias. Nas mitocôndrias, tanto o Bid fosforilado em sua forma completa quanto o jBid promovem a liberação das proteínas Smac e Omi (proteína regulada por oxigênio com atividade inibidora mitocondrial). Essas proteínas antagonizam a ação do XIAP, permitindo a ativação das caspases executoras 3 e 7, culminando no processo apoptótico.

Fonte: Adaptado de Dhanasekaran et al., 2017.

Já na via intrínseca (Figura 8), a fosforilação da proteína 14-3-3 (proteína citoplasmática) mediada por JNK induz a ativação de proteínas pró-apoptóticas como Bax e Bad, bem como JNK pode atuar sobre Bim e Bmf (proteínas apenas BH3), que interagem diretamente com a Bax e Bak, tanto potencializando a ação dessas proteínas, quanto neutralizando as proteínas antiapoptóticas (BCL-2) (DHANASEKARAN; REDDY, 2017).

Figura 8. Cascata de sinalização das proteínas Cinases c-Jun N-terminal (JNK) na via intrínseca da apoptose

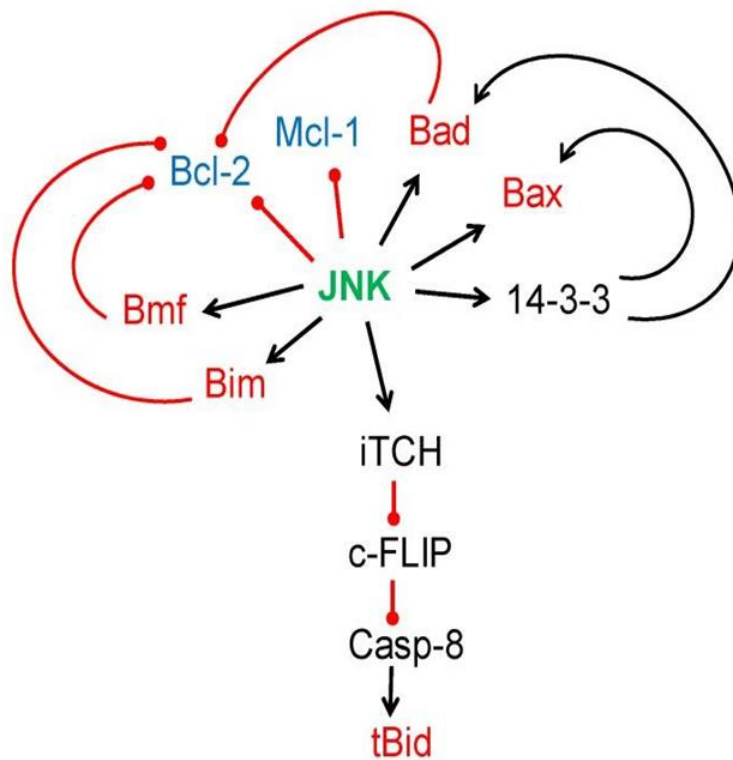


Legenda: JNK promove a apoptose pela via intrínseca por diferentes mecanismos. Ela ativa a expressão de genes pró-apoptóticos por meio de fatores de transcrição como o c-Jun e, fosforila proteínas como Bim e Bmf, reduzindo a atividade antiapoptótica de BCL-2. Além disso, a JNK fosforila Bad e Bax, o que promove sua liberação dos complexos sequestrantes mediados por 14-3-3, facilitando a liberação do citocromo C da mitocôndria. Este, em combinação com o Apaf-1 e a caspase-9 formam o apoptossomo, complexo que ativa caspases executoras como as caspase-3 e -7, resultando na apoptose.

Fonte: Adaptado de Dhanasekaran et al., 2017.

Além disso, JNK e p38 podem fosforilar diretamente Bcl-2 e Mcl-1 (leucemia de células mieloides 1) inibindo a sua ação antiapoptótica (Figura 9) (AGHAZADEH; PAPADOPOULOS, 2016; WENG et al., 2016).

Figura 9. Substratos das proteínas Cinases c-Jun N-terminal (JNK) que regulam a via apoptótica mitocondria



Legenda: JNK pode ter efeitos pró-apoptóticos através da fosforilação direta de membros da família BCL-2 (linfoma de células B2). A fosforilação de Bax (proteína X associada a BCL-2) ativará a atividade pró-apoptótica de BCL-2, enquanto a fosforilação de BCL-2 e Mcl-1 (leucemia de células mieloides 1) suprimirá sua função antiapoptótica. De fato, a fosforilação direta e a ativação de Bad (BCL-2-antagonista da morte celular), Bim (Proteína semelhante a BCL-2) ou Bmf (Fator modificador de BCL-2) inibirão o efeito antiapoptótico de BCL-2. Além disso, JNK fosforila a proteína 14-3-3, que induz a liberação das proteínas pró-apoptóticas Bax e Bad. JNK fosforila a iTCH, que por sua vez promove a degradação do inibidor de caspase-8, o c-FLIP (proteína inibitória celular FLICE), promovendo assim a ativação de caspase-8, que cliva a proteína BID, originando o fragmento BID truncado (tBID), (tBid). Todas essas modificações nos membros da família BCL-2 induzem a liberação do citocromo c da mitocôndria e a subsequente ativação da caspase. Símbolos usados: ativação (→), inibição (→•). **Fonte:** Adaptado de Yue et al., 2020.

Apesar de JNK e p38 estarem envolvidos majoritariamente em processos pró-apoptóticos, eles podem também promover mecanismos antiapoptóticos. Por exemplo, a ação de JNK retarda a ativação da caspase-9 transitoriamente por meio da interação direta de JNK com a Apaf-1 e o citocromo c, impedindo a formação do complexo apoptossoma, que permeia a ativação das caspases efetoras da apoptose

(HOLLVILLE; ROMERO; DESHMUKH, 2019; YUE; LÓPEZ, 2020a). A sinalização de *crosstalk* entre JNK e p38 MAPK em respostas ao estresse envolve reguladores a montante, que respondem a diferentes estímulos ativando simultaneamente ambas as vias. Todavia, há indicativos sugerindo que a via p38 MAPK pode regular negativamente a atividade de JNK em vários contextos, dependendo do tipo celular e do estímulo, sendo assim a ativação ou a inibição das vias de MAPKs controlam o destino celular, uma vez que a célula pode ser direcionada para a morte ou sobrevivência (YUE; LÓPEZ, 2020a).

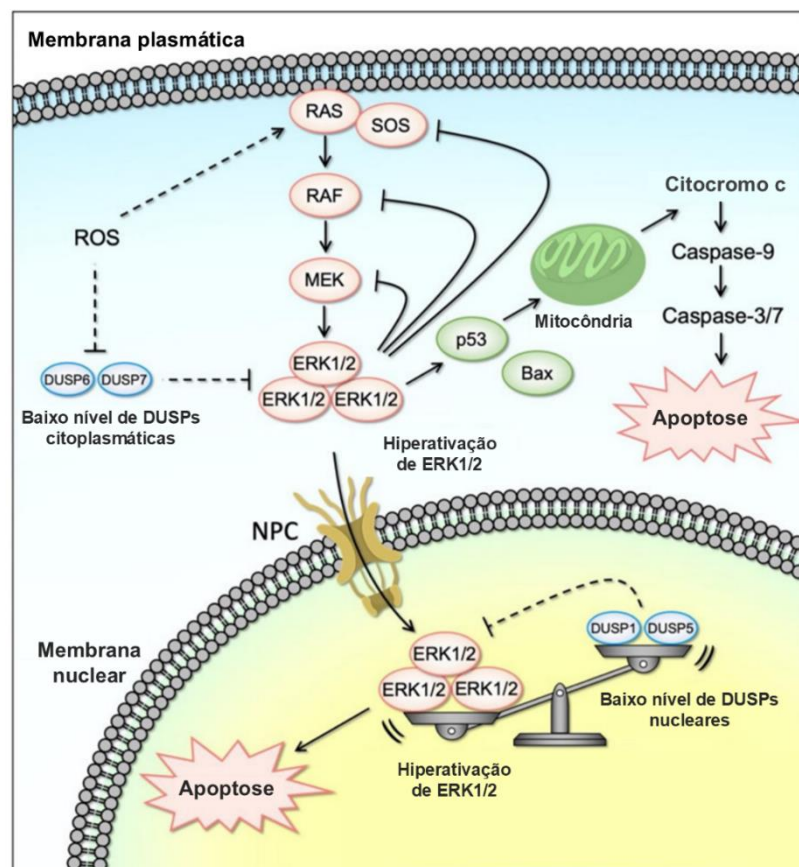
A sinalização de ERK, outro membro da família MAPK, envolve a ativação e translocação de ERK1/2 para o núcleo, exercendo as suas funções por meio da fosforilação de proteínas alvo citoplasmáticas ou através da regulação da atividade de outras proteínas quinases que regulam o crescimento, desenvolvimento e divisão celular (YANG; LIU, 2017). A ativação de ERK1/2 está predominantemente associada à ações antiapoptóticas, pela regulação negativa de proteínas pró-apoptóticas e regulação positiva de proteínas antiapoptóticas, por meio de mecanismos transcricionais e pós-traducionais. Entretanto, existem estudos que demonstram que a sinalização de ERK1/2 também apresenta um papel dual no câncer, podendo ser pró-apoptótica (YUE; LÓPEZ, 2020a).

A via de sinalização de ERK (Figura 10) pode ser estimulada por diferentes fatores, como citocinas, vírus, ligantes de receptores acoplados à proteína G e oncogenes. A cascata ERK ativa a transcrição de moléculas proliferativas, mediada por estímulos de fatores de transcrição da família FOS, Jun e Myc (GUO, YAN-JUN et al., 2020). Esses fatores ativados de forma contínua promovem a proliferação celular exacerbada, levando à alterações no ciclo celular, a angiogênese e a sobrevivência de células cancerígenas. A ocorrência de alterações na cascata MAPK constitui um fator oncogênico presente em alguns cânceres humanos, sendo que a ativação persistente de qualquer proteína que funcione como efetor a jusante de ERK1/2 culmina em sua ativação constitutiva, levando à tumorigênese (SUGIURA; SATOH; TAKASAKI, 2021).

A atividade de ERK pode estar envolvida nos mecanismos de apoptose induzida por fármacos quimioterápicos que promovem danos ao DNA, como por exemplo, a cisplatina, o etoposídeo e a doxorubicina (LEE et al., 2016). A proteína ERK ativa pode desencadear a ativação da via apoptótica intrínseca mediante a liberação do citocromo c da mitocôndria, responsável pela ativação da caspase-9, ou

atuar sobre a via apoptótica extrínseca, envolvendo a ativação da caspase-8 iniciadora (SATO et al., 2020; SUGIURA; SATO; TAKASAKI, 2021). Além disso, os mecanismos moleculares pelos quais ERK medeia a apoptose podem estar envolvidos com o aumento de EROs. Os estímulos ou compostos capazes de induzir a apoptose via ERK mimetizam a ação de EROs nas células, assim o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), os doadores de óxido nítrico ou fármacos que induzem danos ao DNA (por exemplo etoposídeo e doxorubicina), podem desencadear a apoptose em células tumorais (KUMARI et al., 2017; LEE et al., 2016). As EROs também podem estimular a sinalização de ERK ativando-a ou inibindo as fosfatases de MAPK, como a DUSPs, o que resulta na ativação sustentada de ERK pela ausência de respostas de feedback negativo promovida por DUSPs, e consequentemente a ativação de mecanismos direcionados à apoptose (KANDA et al., 2021) (Figura 10).

Figura 10. Cascata de sinalização das Proteínas Cinasas Reguladas por Sinais Extracelulares (ERK)



Legenda: A ativação de ERK1/2 no citoplasma pode ser induzida por estímulos como a exposição a EROs, que reduzem a expressão de DUSP6/7. Uma vez ativado, ERK1/2 promove a apoptose mitocondrial ou migra para o núcleo pelo complexo do poro nuclear (NPC). Além disso, a diminuição na expressão de DUSP1/5, também induzida por estímulos como EROs, contribui para a ativação de ERK1/2 no núcleo. Assim, a redução das DUSPs, tanto no citoplasma quanto no núcleo, resulta na acumulação de ERK1/2

ativado no núcleo. Quando a ativação de ERK1/2 é sustentada acima de um nível crítico, alvos pró-apoptóticos específicos são ativados, desencadeando o processo de apoptose.

Fonte: Adaptado de Sugiura et al., 2021.

Em relação aos aspectos oncogênicos associados ao desenvolvimento do câncer e à terapia, sabe-se que a sinalização constitutiva das vias das MAPKs promove alterações genéticas e consequentemente mutações nos seus efetores/ativadores, responsáveis por mais de 40% dos casos de câncer. A via Ras/RAF/MEK/ERK, por exemplo, apresenta múltiplas mutações em RTKs, Ras e Raf, sendo a proteína RAS o principal alvo, presente em 1/3 dos tipos de câncer, como pâncreas, colón, tireoide e pulmão. As mutações oncogênicas em Ras induzem uma codificação diferente nas proteínas, que impossibilita a sua inativação pelas proteínas ativadoras de GTPase (GAPs), favorecendo o status ligado ao GTP, ou seja, uma ativação persistente, que dificulta a atuação de inibidores Ras específicos (LIU et al., 2018). Dentre as isoformas de Ras, a K-ras está majoritariamente presente nos cânceres, principalmente cânceres pancreáticos (85%), seguido por N-ras em mieloma e melanomas (12%), e H-ras no câncer de glândula adrenal (3%) (TESSOULIN et al., 2018; YUAN et al., 2020).

As formas oncogênicas em RAF ocorrem pela conversão de dois aminoácidos, valina em glutamina, dando origem às isoformas BRAF, CRAF e ARAF, sendo as mutações prevalentes na BRAF, acometendo mais de 90% dos casos de câncer, com destaque em melanoma maligno metastático, que corresponde entre 50 a 60% dos casos diagnosticados (YUAN et al., 2020). Em relação aos inibidores de Raf, pode-se citar o fármaco sorafenibe, uma pequena molécula sintética que atua inibindo quinases de superfície (a exemplo do receptor de VEGF – fator de crescimento de endotélio vascular) por bloquear a ligação competitiva do ATP ao RTK, bem como quinases intracelulares (a exemplo da isoforma CRAF), sendo usado nos casos de carcinoma renal e hepatocelular. Já a isoforma BRAF possui inibidores seletivos como o vemurafenibe e dabrafenibe, que atuam em melanomas metastáticos com mutações BRAF-V600E e BRAF-V600K, respectivamente (LIU et al., 2018).

E por último, existem os inibidores da MEK, como o trametinibe, específico para melanomas com mutação BRAF. No entanto seu uso ainda é limitado, pois apresentou baixa potência, sendo utilizado atualmente em associação com outros inibidores, tais como os de fosfoinositídeo 3 cinase (PI3K) (HEINZERLING et al., 2019).

2.7 Via de sinalização intracelular da Proteína Cinase B (PKB/AKT) e o câncer

As proteínas PKB (Proteína Cinase B), também chamadas de AKT, são membros da superfamília de cinases proteína serina/treonina que possuem três diferentes isoformas, cada uma com diferentes funções celulares: I) AKT1, envolvida na sobrevivência celular; II) AKT2, envolvida na homeostase da glicose e; III) AKT3, que participa do desenvolvimento cerebral (ABDULLAH et al., 2021). Essas proteínas são responsáveis pelo controle de processos fisiológicos cruciais como o crescimento, a proliferação, sobrevivência e o metabolismo celular (STEFANI et al., 2021; SU; PENG; LIU, 2024).

A ativação das diferentes isoformas de AKT envolve estímulos extracelulares como fatores de crescimento, citocinas, hormônios e sinais de estresse, os quais se ligam aos receptores acoplados a proteína G (GPCRs) presentes na membrana celular. Uma vez ativados, estes receptores modificam a sua conformação e desencadeiam uma cascata de autofosforilação que resulta na produção de segundos mensageiros, como o fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3), que traduz sinais e estímulos responsáveis por promover a ativação da serina/treonina AKT (JIANG; JI, 2019; TRUEBESTEIN et al., 2021; YUAN et al., 2023) (Figura 11).

Os estímulos extracelulares podem interagir de forma semelhante com os receptores de tirosina quinase (RTKs), promovendo a ativação do fosfoinosítideo 3 cinase (PI3K), que fosforila o fosfolípido de membrana fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2), gerando o PIP3 (TARIQ; LUIKART, 2021). Este interage com a proteína quinase B (PKB)/AKT por meio do domínio homólogo de pleckstrina, o que permite o deslocamento de AKT para a membrana plasmática e a sua subsequente fosforilação e ativação pela quinase 1 dependente de fosfoinosítideo (PDK1) e o complexo 2 do alvo da rapamicina em mamíferos (mTORC2), proteínas recrutadas à membrana (FU; HALL, 2020). Por fim, a proteína AKT ativada transloca-se para o citoplasma e núcleo, onde fosforila diversos alvos proteicos específicos que estão envolvidos nos processos de sobrevivência, crescimento e metabolismo celular. O equilíbrio dessa via é mantido pela proteína PTEN (fosfatase homóloga à tensina), que desfosforila o PIP3, revertendo-o para PIP2, e assim regula negativamente a sinalização da via PI3K/AKT (SU; PENG; LIU, 2024) (Figura 11).

A desregulação na via de sinalização PI3K/Akt é amplamente envolvida em diversas patologias, como diabetes mellitus tipo 2 (GUAN et al., 2024), doenças

neurodegenerativas (RAI et al., 2019), distúrbios imunológicos (WANG et al., 2021), doenças cardiovasculares (LIAO et al., 2021) e no câncer (SU; PENG; LIU, 2024). As principais alterações nessa via são originadas por: I) mutações genéticas em proteínas essenciais, tais como a PTEN, que como mencionado anteriormente atua como supressora de tumor, regulando negativamente os níveis de PI3K, ou II) por meio da hiperexpressão de PI3K, o que resulta na proliferação celular descontrolada e progressão do câncer (JANG et al., 2021).

Neste contexto, a ocorrência de alterações inativadoras ou a perda de heterozigose no gene PTEN, por meio do silenciamento epigenético, constitui um mecanismo para a regulação da atividade da PI3K no CCR. Além disso, mutações somáticas no gene STK11/LKB1, responsável por codificar uma quinase serina/treonina que regula indiretamente o complexo mTORC1 por meio da ativação da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK), estão presentes em uma pequena porcentagem dos casos de câncer colorretal (CCR) (PROSSOMARITI et al., 2020).

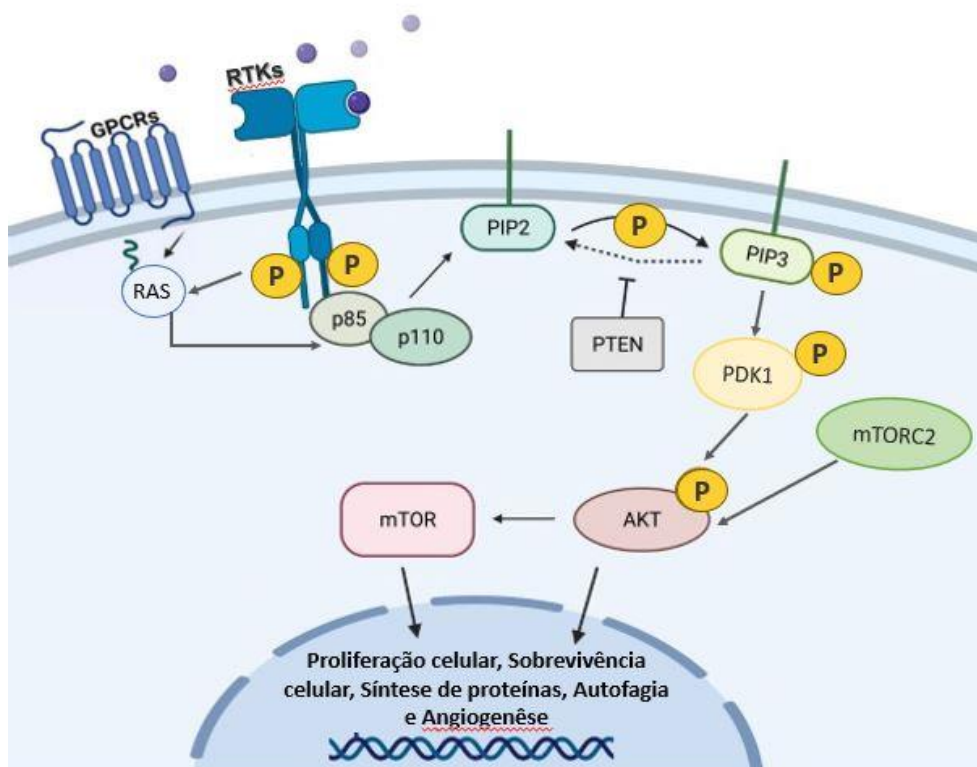
Pesquisas têm demonstrado o potencial antitumoral de compostos baseados na inibição das vias PI3K/AKT/mTOR. Em um estudo conduzido por Cheng e colaboradores, ao investigar o efeito inibitório da Naringina em linhagem de células de câncer colorretal (HCT e SW620) *in vitro*, demonstraram que este composto interrompeu a proliferação e promoveu a apoptose das células tumorais, efeitos associados à inibição da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR (CHENG et al., 2020). De maneira semelhante, Wang e colaboradores estudaram o inibidor W922, que foi capaz de reduzir o crescimento tumoral, desfosforilar proteínas da via PI3K/AKT/mTOR e, em combinação com a cloroquina, induzir a apoptose de células HCT-116 *in vitro*, destacando-se como uma estratégia terapêutica para o CCR (WANG et al., 2021).

Em relação ao câncer colorretal metastático (mCRC), estudos realizados por Han e colaboradores investigaram o efeito da betulina em células de câncer colorretal (HCT e SW620) *in vitro*. O composto foi capaz de induzir apoptose, autofagia e parada do ciclo celular por meio da inativação das vias PI3K/AKT/mTOR e MAPK (HAN et al., 2019). Adicionalmente, Nan e colaboradores demonstraram que a nobiletina, um flavonoide polimetilado derivado de *Citrus reticulata blanco*, aumenta a sensibilidade das células HT29 e SW480 à oxaliplatina, promovendo a apoptose por meio do

aumento de proteínas pró-apoptóticas e da regulação negativa de Bcl-2 e da via PI3K/AKT/mTOR (ZHANG, 2019).

Portanto, a via PI3K/Akt torna-se um alvo molecular importante na investigação de novas drogas antitumorais, destacando a necessidade de estudos envolvendo terapias específicas que modulem esta via de sinalização (RASCIO et al., 2021; YANG et al., 2019a).

Figura 11. Via de sinalização intracelular da Proteína Cinase B (PKB/AKT)



Legenda: A ativação de receptores acoplados à proteína G (GPCRs) ou de receptores tirosina-quinase (RTKs) desencadeia a ativação da enzima fosfoinosítídeo 3-quinase (PI3K), formada pelas subunidades p85 (reguladora) e p110 (catalítica). A PI3K, ao ser ativada, fosforila o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2), transformando-o em fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3). O PIP3 funciona como um segundo mensageiro que se liga à AKT (quinase de serina/treonina), promovendo sua ativação por fosforilação, um processo mediado pela PDK1 (quinase dependente de fosfoinosítídeo-1) e pelo complexo mTORC2 (complexo 2 da mTOR). Após ser ativada, a AKT transloca-se para o núcleo e o citoplasma, onde fosforila proteínas que controlam processos cruciais, como proliferação celular, sobrevivência, síntese de proteínas, autofagia e angiogênese. O equilíbrio dessa via é mantido pela proteína PTEN (fosfatase homóloga à tensina), que desfosforila o PIP3, revertendo-o para PIP2, e assim regula negativamente a sinalização da via PI3K/AKT.

Fonte: Adaptado de Ploeg et al., 2021.

2.8 Via de sinalização intracelular do Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B) e o câncer

O NF- κ B (Fator Nuclear Kappa B) desempenha um papel fundamental nos processos de regulação, diferenciação e ativação das células B. Em mamíferos, essa família de fatores de transcrição é composta por cinco membros, incluindo RelB, c-Rel, RelA (p65), NF- κ B1 (p105/p50) e NF- κ B2 (p100/p52) (JIMI; HUANG; NAKATOMI, 2019; LIU et al., 2024).

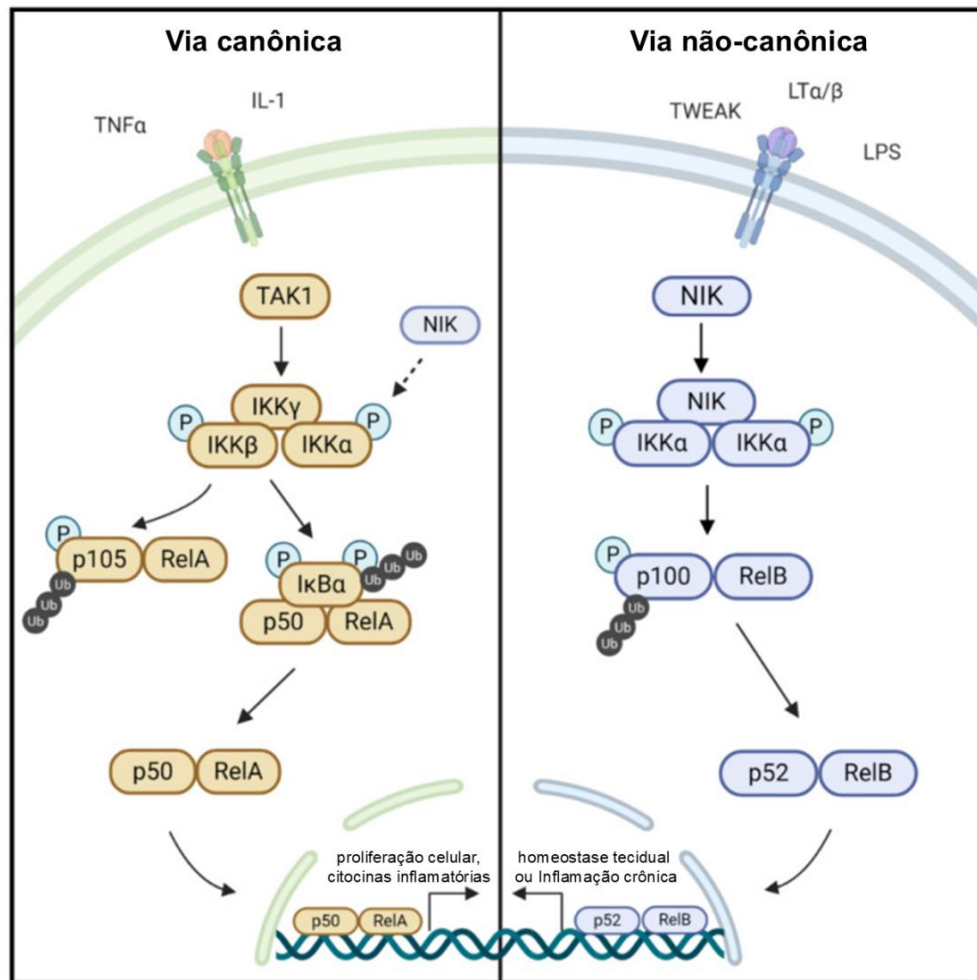
A ativação do NF- κ B promove a transcrição de genes alvo majoritariamente com características de estímulos pró-inflamatórios, que pode ser orquestrada através de duas vias de sinalização distintas: a via canônica e a via não canônica (SUN et al., 2022) (Figura 12). A via canônica, também conhecida como tradicional, é amplamente estudada pelo seu envolvimento em respostas inflamatórias. Em um estado inativo, o NF- κ B é sequestrado no citoplasma por um inibidor chamado de I κ B (YU 2020). Essa classe de proteínas é dividida em três subgrupos: I κ Bs típicas (I κ B α , I κ B β e I κ B ϵ), I κ Bs atípicas (I κ B ζ , BCL-3 e I κ BNS) e proteínas precursoras (p100 e p105) (WU; SUN; XU, 2023).

Esta via é mediada pela subunidade IKK β , ativada pela fosforilação de moléculas do complexo I κ B cinase (IKKs), formado por duas subunidades catalíticas (IKK α e IKK β), bem como por uma subunidade reguladora (IKK γ), denominada NEMO (modulador essencial de NF- κ B) (YU et al., 2020). A subunidade IKK β é indispensável para a iniciação da via canônica, que é ativada após a exposição à estímulos pró-inflamatórios, como as citocinas, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), lipopolissacarídeos (LPS) e interleucina-1 β (IL-1 β) (JIMI; HUANG; NAKATOMI, 2019). Tais estímulos ativam receptores específicos (por exemplo, receptores do fator de necrose tumoral α (TNFR), receptores de interleucina-1 (IL-1R) e receptores Toll-like (TLR), que modulam diferentes processos relacionados à inflamação, imunidade, proliferação celular, sobrevivência e morte (PFLUG; SITCHERAN, 2020; ZHANG; LENARDO; BALTIMORE, 2017).

Os receptores ativados promovem o recrutamento de proteínas acessórias, o que resulta na autofosforilação e ativação da cinase 1 ativada pelo fator de crescimento transformante β (TAK1) (AASHAQ; BATOOL; ANDRABI, 2019). Em seguida, a TAK1 fosforila e ativa o complexo de I κ B cinase (IKK) (MOHAMMAD REZA et al., 2018), que por sua vez promove a fosforilação das proteínas I κ B α (kappa B alfa inibitório), o que desencadeia a sua ubiquitinação e degradação por proteassomas.

Esse processo libera os dímeros de NF- κ B que estavam inativados no citoplasma, permitindo que eles se transloquem para o núcleo e iniciem a transcrição de genes-alvo (EBRAHIMI et al., 2024) (Figura 12).

Figura 12. Via de sinalização intracelular do Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B)



Legenda: O Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B) atua como um potencializador em várias vias celulares. Essas vias são ativadas por estímulos como citocinas, bactérias ou vírus, que interagem com diferentes receptores. Na via canônica, a ativação do NF- κ B envolve múltiplas cinases, incluindo a cinase ativada por fator de crescimento transformador beta (TAK1) e a fosforilação do complexo da cinase inibitória kappa B (IKK), com preferência pela ativação de IKK β . A IKK β fosforila a proteína p105 ligada a RelA, promovendo sua degradação parcial no proteassoma, gerando p50. Além disso, a IKK β também fosforila a I κ B α , direcionando-a para degradação no proteassoma e permitindo a translocação do complexo p50-RelA para o núcleo, onde regula a transcrição gênica. Por outro lado, a via não canônica do NF- κ B envolve a ativação da cinase indutora de NF- κ B (NIK), que leva à fosforilação de IKK α . A IKK α , por sua vez, fosforila p100, marcando-a para uma degradação parcial no proteassoma, resultando em p52. O complexo formado por p52 e RelB transloca-se para o núcleo, onde controla a expressão de genes específicos.

Fonte: Adaptado de Pfluet al., 2020.

Por outro lado, a via não canônica do NF- κ B resulta na ativação dos dímeros RelB-p52 e é desencadeada por um grupo específico de receptores da superfamília do fator de necrose tumoral (TNFSFRs) (SUN, 2017). Entre eles estão envolvidos diversos receptores, que induzem a ativação da proteína cinase indutora de NF- κ B (NIK), entre eles: TNFSFR12A/Fn14 (membro 12A da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral); LT β R (receptor de linfotóxina β); BAFF-R (receptor de ativação de células B); RANK (receptor ativador de NF- κ B) e CD40 (cluster de diferenciação 40) (PFLUG; SITCHERAN, 2020) .

Em seu estado inativo, a serina/treonina quinase NIK encontra-se associada ao complexo formado por TRAF2, TRAF3, cIAP1 e cIAP2, onde sofre continuamente ubiquitinação e degradação (MORGAN et al., 2020). No entanto, uma vez que um receptor é ativado, ocorre desestabilização do complexo TRAF2/TRAF3/cIAP1/cIAP2, o que inibe a degradação de NIK e favorece o seu acúmulo dentro da célula (ZINATIZADEH et al., 2021). Desta forma, a NIK fosforila e ativa a IKK α , que por sua vez, fosforila o heterodímero p100/RelB e induz a clivagem proteolítica do precursor p100 gerando a p52 que, na forma de dímero com a RelB, transloca-se para o núcleo onde regula a expressão de diversos genes alvo (CHENG et al., 2021a; GUO et al., 2024) (Figura 12).

O NF- κ B é um fator transcricional que está envolvido na sinalização citoplasmática e nuclear, sendo fundamental na regulação da expressão gênica de moléculas e receptores associados à resposta imune e inflamatória (EBRAHIMI et al., 2024). No entanto, a desregulação nas vias de sinalização do NF- κ B podem desencadear inflamação crônica e doenças autoimunes, bem como alterações na divisão e morte celular, resultando em tumorigênese. Mutações nessa via estão presentes em diversos tipos de cânceres (ZHANG et al., 2021a), incluindo próstata (THOMAS-JARDIN et al., 2020), mama (LIANG et al., 2023), ovário (KAMDAR et al., 2023), gástrico (SHEN et al., 2019) e colorretal (SOLEIMANI et al., 2020).

De fato, ao analisar 27 pacientes com tumores colorretais, Negi e colaboradores (2018) detectaram pela técnica de PCR *real time* um aumento na expressão de NF- κ B/RelA nos tecidos tumorais em comparação aos tecidos saudáveis adjacentes, evidenciando o envolvimento dessa via de sinalização na tumorigênese do câncer colorretal (NEGI et al., 2018). Ainda, Allen e colaboradores (2012) investigaram um subgrupo de proteínas chamada NLR (repetição rica em leucina), incluindo NLRP12, que inibem o fator de transcrição NF- κ B e estão

envolvidos no processo de inflamação do cólon. O estudo relatou que camundongos deficientes em NLRP12A mostraram maior sensibilidade ao desenvolvimento de colite e CCR associado à colite, demonstrando que a NLRP12A apresentou uma ação anti-inflamatória ao inibir a ativação da via do NF- κ B (ALLEN et al., 2012).

Por fim, Wu e colaboradores (2024) estudaram o efeito antitumoral do composto Atractylenolides-II (AT-II) em conjunto com o Interferon (IFN)- γ . Esta associação foi capaz de suprimir significativamente o crescimento e a migração das células de CRC *in vitro* e *in vivo*, através do mecanismo de inibição da via de sinalização NF- κ B p65/PD-L1. Portanto, estes resultados sugerem o potencial destes compostos como estratégia na imunoterapia do CCR (WU et al., 2024).

Dessa forma, a via NF- κ B destaca-se como um alvo promissor para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas no tratamento do câncer.

2.9 O uso do peixe-zebra como alternativa para avaliação da citotoxicidade de novas drogas com potencial antitumoral

Um pequeno peixe tropical de água doce, conhecido popularmente como peixe-zebra (*Danio rerio*) tem sido utilizado como um modelo experimental alternativo para estudos em diversas áreas, incluindo biologia molecular, embriologia, toxicologia, oncologia, genética, patologia e farmacologia (BAMBINO; CHU, 2017; GEHRIG; PANDEY; WESTHOFF, 2018; NAKAYAMA; MAKINOSHIMA, 2020; SALEEM; KANNAN, 2018; VAZ; OUTEIRO; FERREIRA, 2018).

Este vertebrado pertence à família Cyprinidae, classe Actinopterygii, e é encontrado nos rios e lagoas da Índia, Bangladesh, Mianmar e Nepal (KULLANDER et al., 2018; LIN 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; KATOCH; PATIAL, 2021; TEAME et al., 2019).

O embrião do peixe-zebra apresenta homologia de muitas vias moleculares com os humanos, compartilhando aspectos fisiológicos e anatômicos que podem refletir as respostas em humanos, justificando, portanto, a utilização deste modelo

experimental em estudos envolvendo diversas doenças humanas, como câncer, obesidade, estresse, diabetes, problemas cardiovasculares, entre outros distúrbios (LEBEDEVA et al., 2020). Ademais, estes organismos tem sido empregados em bioensaios para avaliar a toxicidade de novas drogas (FARGHALI et al., 2016) (FARGHALI et al., 2016), sendo fundamentais nos estudos pré-clínicos *in vivo* para detectar neuro, geno, cardio e hepatotoxicidade de compostos com potencial terapêutico, além de exibir uma vantagem em garantir o conceito dos '3Rs' (substituição, redução e refinamento) em comparação com outros modelos animais correspondentes (YUAN et al., 2015). Neste contexto, o peixe-zebra possui sistemas de órgãos e vias metabólicas evoluídas que permitem a avaliação da toxicocinética e toxicodinâmica de xenobióticos análogos aos modelos de mamíferos. Os embriões são opticamente translúcidos nos estágios iniciais de desenvolvimento e possuem os principais órgãos e sistemas formados no decorrer de 72 horas pós-fertilização (hpf), período em que os animais podem ser expostos a xenobióticos ou produtos químicos em diferentes concentrações, e a toxicidade avaliada por meio da visualização de indícios sugestivos de letalidade, teratogenicidade ou alterações fenotípicas (HORZMANN; FREEMAN, 2018). Assim, o ensaio de avaliação da toxicidade em peixe-zebra envolve a observação de diferentes *endpoints* do desenvolvimento embrionário, a saber: mortalidade, frequência cardíaca, formação de somitos, alterações morfológicas (comprimento e/ou curvatura corporal), taxa de eclosão, locomoção e formação de edemas, por exemplo (LIN et al., 2019).

2.10 Derivados acridínicos

A magnitude do câncer, considerando os dados epidemiológicos e as limitações associadas aos tratamentos atuais (toxicidade e quimiorresistência), estimulam o desenvolvimento de novos medicamentos com maior eficiência antitumoral (GENSICKA-KOWALEWSKA et al., 2019; KOVVURI et al., 2018).

Neste cenário inserem-se os derivados acridínicos, que são compostos aromáticos policíclicos formados por dois anéis fundidos a um anel de piridina em uma posição central, caracterizando uma estrutura planar que confere a capacidade de diferentes substituições no anel heterocíclico. Consequentemente, são sintetizadas novas moléculas responsáveis por uma variedade de atividades biológicas já

relatadas na literatura, como antitumoral, antibacteriana, antiparasitária, antioxidante, anticonvulsivante e anti-inflamatória (DE M. SILVA et al., 2018; GOUVEIA et al., 2018).

As atividades biológicas dos compostos acridínicos são associadas à sua estrutura, que apresenta a capacidade de se intercalarem entre os pares de bases do DNA, interferindo nas funções de enzimas com papéis essenciais, como as topoisomerases I e II (GENSICKA-KOWALEWSKA; CHOLEWIŃSKI; DZIERZBICKA, 2017; KUKOWSKA, 2017). As topoisomerases são responsáveis por regular as alterações topológicas no processo de desenovelamento da dupla hélice do DNA durante os mecanismos de reparo, replicação e transcrição (SALEM et al., 2017). Essas enzimas são elementos alvo de drogas antineoplásicas, que ao interagirem formam complexos que podem induzir danos ao DNA e, conseqüentemente, morte celular (SZAFRAN et al., 2018; ZHANG; QU; NIU, 2016).

Alguns fármacos derivados da acridina foram aprovados como quimioterápicos em ensaios clínicos devido à sua significativa atividade, dentre estes destaca-se a amsacrina (m-AMSA), o primeiro derivado sintético utilizado clinicamente em vários países para o tratamento de leucemias e linfomas (CHEN et al., 2019; LEE et al., 2017b). Todavia, determinados efeitos adversos da m-AMSA, como alta toxicidade, o desenvolvimento de resistência por parte das células tumorais e a baixa biodisponibilidade, limitam o seu uso na terapêutica. Sendo assim, esses fatores impulsionam os pesquisadores a modificarem estruturalmente a molécula de acridina e produzirem novos derivados acridínicos, com o objetivo de maximizar a atividade antitumoral e minimizar a toxicidade e o desenvolvimento de resistência (FU et al., 2017; GENSICKA-KOWALEWSKA; CHOLEWIŃSKI; DZIERZBICKA, 2017).

Vislumbrando o potencial farmacológico de compostos acridínicos no tratamento do câncer, foi sintetizado um novo grupo de acridínicos designado espiro-acridínicos (ZHOU et al., 2018), caracterizado por um anel espiro de cinco ou seis membros ligado ao carbono C-9 da acridina, estrutura que favorece a intercalação entre os pares de bases de ácidos nucleicos no DNA, a inibição das enzimas topoisomerases e a atividade antitumoral destes novos compostos (ALMEIDA et al., 2016; MENEZES et al., 2019a).

Resultados anteriores obtidos pelo nosso grupo 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 – UFPB), mostraram derivados acridínicos com potente atividade

antitumoral *in vivo* em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich, como exemplo o ACS-AZ10 (N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil) acrilohidrazida) (MANGUEIRA et al., 2017), ACS-AZ (n'-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-il)-2-cianoacetohidrazide) (MANGUEIRA, 2019), ACS-03 (2-((6-Cloro-2-metoxiacridina-9-il)amino)-5,6,7,8-tetra-hidro-4*H*-ciclo-hepta[b]-tiofeno-3-carbonitrila) (LISBOA et al., 2019), bem como os derivados espiro-acridínicos ACMD (5'-oxo-1'-fenil-1',5'-diidro-10*H*-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila) (SOUSA, 2019), AMTAC-07 ((*E*)-1'-{(4-flúorbenzilideno)-amino}-5'oxo-1,5'diidro-10*H*espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'carbonitrila) (BATISTA, 2019), 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., 2019a) e (*E*)-1'-((4-clorobenzilideno) amino) - 5'- oxo 1',5'- diidro - 10*H* - espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-06) (DUARTE et al., 2020a).

Dentre os compostos estudados, o ACS-03 (LISBOA et al., 2019), ACMD (SOUSA, 2019), AMTAC-07 (BATISTA, 2019), AMTAC-17 (SILVA, 2020) e AMTAC-06 (DUARTE et al., 2022), também exibiram potente atividade antitumoral *in vitro*, em diferentes linhagens de células tumorais humanas, corroborando com os dados obtidos *in vivo*.

Nesse sentido, a síntese de novos derivados espiro-acridínicos permitiu a caracterização de diferentes compostos, dentre estes, o (*E*)-1'-((4-bromobenzilideno)amino)5'-oxo-1'5'-dihidro-10*H*-espiro [acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-19), o qual demonstrou potente atividade antitumoral *in vitro* na linhagem de carcinoma colorretal HCT-116, envolvendo alterações no ciclo celular, indução de apoptose e efeito antioxidante (DE SOUSA et al., 2024).

Assim, em virtude desses resultados previamente obtidos, e considerando o potencial antitumoral deste grupo de moléculas, o presente trabalho propôs investigar os prováveis mecanismos de ação antitumoral do AMTAC-19, avaliando seu efeito em diferentes proteínas de vias de sinalização molecular cruciais, como as MAPKs (Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos), o NF-κB (Fator Nuclear kappa B), BCL-2 (linfoma/leucemia de células B-2) e a PKB/AKT (Proteína Cinase B), bem como avaliar a sua toxicidade em modelo experimental de peixe-zebra (*Danio rerio*).

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os mecanismos de ação antitumorais *in vitro* do (E)-1'-((4-bromo-benzilideno)amino)5'-oxo-1'5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-19) em células de carcinoma colorretal humano (HCT-116) e a toxicidade em modelo de peixe-zebra (*Danio rerio*).

3.2 Objetivos específicos

- Realizar simulações de *docking* molecular e determinar os valores de energia de ligação e os encaixes 2D e 3D entre o composto AMTAC-19 e as estruturas cristalográficas das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs), da Proteína Cinase B (PKB/AKT), do Fator Nuclear kappa B (NF-κB) e das Proteínas da família BCL-2;
- Avaliar o efeito do AMTAC-19 na modulação das vias de MAPKs (ERK, JNK, p38), BCL-2, PKB/AKT e NF-κB em células HCT-116;
- Investigar o efeito do AMTAC-19 sobre o estado redox celular em células HCT-116;
- Avaliar o tipo de morte celular induzido pelo AMTAC-19 em células HCT-116;
- Avaliar a capacidade proliferativa de células HCT-116 tratadas com AMTAC-19 através do ensaio clonogênico;
- Avaliar a toxicidade aguda do AMTAC-19 em embriões e larvas de peixe-zebra.

Material e métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Locais da pesquisa

A avaliação da atividade antitumoral *in vitro* do AMTAC-19 foi realizada no Laboratório de OncoFarmacologia (OncoFar), localizado no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM), onde funciona o Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFPB.

O *docking* molecular foi realizado no Laboratório de Quimioinformática localizado no IPeFarM/UFPB em colaboração com a profa. Dra. Luciana Scotti, prof. Dr. Marcus Tullius Scotti e a Me. Natália Ferreira de Sousa.

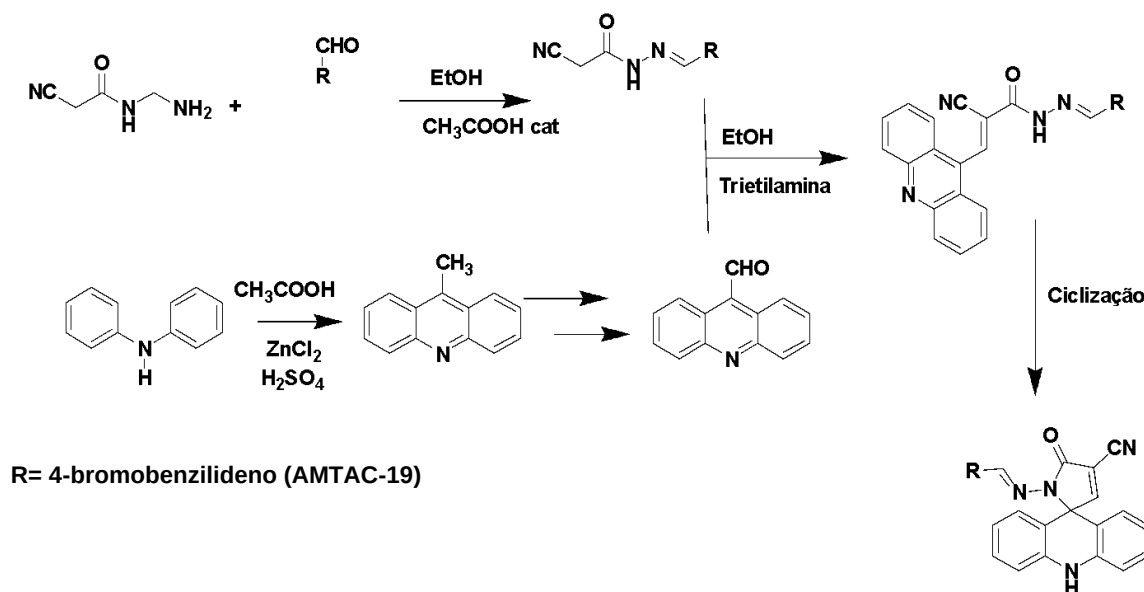
A avaliação da toxicidade do AMTAC-19 em peixe-zebra, foi realizada no Laboratório de Avaliação de Risco de Novas Tecnologias (LabRisco) localizado no Departamento de Biologia Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN) da UFPB, em colaboração com o Prof. Dr. Davi Felipe Farias.

4.2 Material

4.2.1 Substância teste

A amostra teste, composto espiro-acridínico AMTAC-19, foi fornecida pelo professor Dr. Ricardo Olímpio de Moura do Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM) da Universidade Estadual da Paraíba, sintetizada de acordo com metodologia já descritas (ALMEIDA et al., 2016; SILVA et al., 2019b).

A via sintética usada para obter o composto espiro-acridínico foi paralela e convergente, sendo realizada a síntese de 2-ciano-N'-(benzilideno)-aceto-hidrazida (JRs) substituídos como intermediários e em paralelo com o aldeído acridínico (Esquema 1).

Esquema 1. Via sintética para obter composto espiro-acridínico AMTAC-19

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

Fonte: Pinheiro Segundo; Moura, 2020.

4.2.2 Linhagem celular

Para avaliação da indução de apoptose pelo derivado espiro-acridínico foi utilizada a linhagem de carcinoma colorretal humano HCT-116. As células foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro, BCRJ, RJ, Brasil e cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A linhagem celular foi cultivada (5×10^4 células/mL) em frascos de cultivo utilizando o meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, (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). As células foram manipuladas em fluxo laminar, para garantir que não houvesse contaminações, e mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂. O crescimento celular foi acompanhado a cada 24 horas e, ao atingirem 80% de confluência, normalmente após 48 horas de cultivo, foi feita a adição 2 mL de solução de tripsina (Sigma Aldrich), por 5-10 minutos, para o deslocamento da monocamada das células aderentes da parede do frasco. Após esse período, adicionou-se meio suplementado com SBF, na mesma proporção de tripsina, para interromper a ação

desta. As células foram centrifugadas a 500 g por 5 minutos e ressuspensas em meio suplementado para a contagem em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi avaliada por meio da utilização do corante azul de Tripan (Sigma Aldrich) (BABAKHANOVA et al., 2022).

4.2.3 Animais

Para realização do ensaio utilizando o modelo de peixe-zebra (*Danio rerio*), foram utilizados embriões com até 1 horas pós-fertilização, fornecidos pela Unidade de Produção de Organismos Não Convencionais (UniPOM) do Departamento de Biologia Molecular (DBM/CCEN/UFPB). Os embriões foram acondicionados no Laboratório de Avaliação de Risco de Novas Tecnologias (LabRisco/CCEN/UFPB), que compartilha estrutura experimental com a UniPOM, de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), até o momento dos experimentos. Os genitores foram mantidos em sistema de recirculação com monitoramento regular dos parâmetros de qualidade da água (pH, amônia e nitrito), temperatura da sala ambiente (26 ± 1 °C) e fotoperíodo (ciclo claro-escuro 14:10) controlados. A qualidade da água foi mantida por filtração com carvão ativado, condutividade a 750 ± 50 μ S e oxigênio dissolvido acima de 95% de saturação. Os peixes foram alimentados diariamente com ração comercial (Color Bits Tetra, Melle, Alemanha) e espirulina liofilizada (Fazenda Tamanduá, Patos, Brasil), sendo também monitorados quanto a comportamento anormal ou desenvolvimento de doenças. 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) contendo 0,005% de azul de metileno. Somente desovas com taxa de fertilização $\geq 90\%$ foram utilizadas. Embriões viáveis (padrão de clivagem normal e sem alterações morfológicas) foram selecionados em microscópio de luz invertida (Televal 31, Zeiss, Alemanha), com aumento de 50x para uso no teste de Toxicidade Aguda em Peixes (FET).

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

larvas congeladas foram conduzidas para incineração pela empresa SIM Engenharia Ambiental (Campina Grande - PB), que possui convênio para descarte de resíduos químicos e biológicos da UFPB.

Todos os procedimentos experimentais foram analisados e previamente aprovados pela CEUA/UFPB, sob a certidão nº 5900310718 (Anexo 1).

4.2.4 Substâncias e equipamentos

Foram utilizadas as seguintes substâncias: azul de tripan (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), solução fosfato tamponada (PBS) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), dimetilsulfóxido (DMSO) (Dinâmica®, Indaiatuba, São Paulo, Brasil), brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (SigmaAldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico (HEPES) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), Lglutamina (Nutricell®, Campinas, São Paulo, Brasil), soro fetal bovino (SBF) (GIBCO®, 69 Grand Island, New York, EUA), solução estabilizada de penicilina (100 UI/mL) - estreptomicina (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), dodecil sulfato de sódio (SDS) (Êxodo Científica®, Sumaré, São Paulo, Brasil), doxorubicina (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) (SigmaAldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), N-acetilcisteína (NAC) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA), cloreto de sódio (NaCl) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA), cloreto de potássio (KCl) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA), cloreto de cálcio (CaCl₂) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA), sulfato de magnésio (MgSO₄) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA), sulfato de sódio (Na₂SO₄) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA), azul de metileno (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA), hexano (Biograde®, Anápolis, Goiás, Brasil), fitohemaglutinina (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA), tripsina 0,25% com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA). Os medicamentos e soluções reagentes foram preparados imediatamente antes do uso. A ração para o peixe-zebra foi adquirida da Tetra® (Niedersachsen, Melle, Alemanha).

Foram utilizados os seguintes equipamentos: centrífuga Rotina 380R (Hettich®, North Rhine-Westphalia, Alemanha), microscópio invertido Nikon eclipse TS100 (Olympus®, Tóquio, Japão), balança analítica eletrônica SHI-AUW220D (Shimadzu®, São Paulo, Brasil), cabina de fluxo de ar laminar vertical Aeolus V (Telstar®, São Paulo, Brasil), incubadora de CO₂ MCO-18ACL-PA (Panasonic®, Osaka, Japão), leitor de multidetecção Synergy HT (BioTek®, Vermont, EUA), autoclave vertical linha CS-A (Primatec®, São Paulo, Brasil), estufa de secagem (DeLeo® equipamentos laboratoriais, Rio Grande do Sul, Brasil), citômetro de fluxo FacsCanto II (Becton Dickinson®, New Jersey, EUA), estereomicroscópio Televal 31 (Zeiss®, Baden Württemberg, Alemanha), câmera fotográfica OverShot A2500 (Canon®, São Paulo, Brasil), microscópio confocal de varredura a laser (Leica®, Hesse, Alemanha), banho-maria AQUAline (LAUDA®, São Paulo, Brasil), geladeira DFN49 (Eletrolux®, Paraná, Brasil) e agitador MS 3 digital (IKA®, Baden-Württemberg, Alemanha).

4.3 Métodos

4.3.1 *Docking* molecular

A simulação de *docking* molecular foi utilizada para prever a interação entre o composto AMTAC-19 e as seguintes proteínas: Cinase Regulada por Sinalização Extracelular 1 (ERK1) (*Protein Data Bank* (PDB): 5LCJ) em complexo com o inibidor de piridina carbamato, com resolução de 1,78 Å (Ferreira et al., 2023; Lebraud et al., 2016); Cinase c-Jun N-terminal1 (JNK1) (PDB: 2G01) em complexo com o inibidor de pirazoloquinolona, com resolução de 3,50 Å (LIU et al., 2006); Linfoma de células B-2 (BCL-2-xL) em complexo com inibidor fenil tetrahidroisoquinolina amida (PDB: 2W3L) (PORTER et al., 2009) com resolução de 2.10 Å; Cinases Ativadas por Mitógenos p38α (p38α MAPK; PDB ID: 1R39) com resolução de 2,30 Å (PATEL et al., 2004), Proteína Cinase B (PKB/AKT; PDB: 1GZN) (YANG et al., 2002) com resolução de 2.50 Å; Fator Nuclear *kappa* B (NF-kB; p50/p65; PDB: 1VKX) (CHEN et al., 1998) com resolução de 2.90 Å obtidos via difração de raios X, foram usados ligantes controles como Doramapimod (BIRB-796) (SUPLATOV et al., 2019), dicloridrato MK-2206 (LAI et al., 2012) e 4-Metil-N1-(3-fenilpropil)benzeno-1,2-diamina (JSH-23) (FAN et al., 2018) para as proteínas p38α MAPK, PKB/AKT e NF-kB respectivamente. As

estruturas tridimensionais (3D) das proteínas estudadas foram obtidas do PDB (<https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> — acessado em 24 de novembro de 2023).

Antes do início da simulação computacional, as estruturas químicas dos compostos foram projetadas usando Marvin Sketch v.23.10, ChemAxon (<https://chemaxon.com/marvin> , acessado em 1 de julho de 2024), seguido pela padronização das estruturas químicas em 3D e a minimização energética dos compostos usando métodos de mecânica molecular e o método semi-empírico Austin Model 1 (AM1), através do software Spartan 14, WaveFunction (<https://www.wavefun.com/>). Todas as moléculas de água foram removidas da estrutura cristalina, e um molde entre a enzima e o ligante co-cristalizado foi criado para marcar o sítio ativo da macromolécula. Em seguida, a molécula de teste foi inserida no sítio ativo da enzima, e a simulação de docking molecular foi realizada.

A técnica de redocking foi aplicada, portanto o Root Mean Square Deviation (RMSD) das poses de *docking* do ligante co-cristalizado foi calculado, indicando o grau de confiabilidade do ajuste. O RMSD fornece o modo de conexão próximo à estrutura experimental e é considerado bem-sucedido se o valor for abaixo de 2,0 Å.

Para os mecanismos p38 α MAPK (PDB ID: 1R39), PKB/AKT (PDB: 1GZN) e NF- κ B; p50/p65 (PDB: 1VKX) que não tinham um ligante co-cristalizado, o sítio ativo foi identificado pela visualização dos resíduos correspondentes ao sítio ativo dos artigos relacionados ao PDB, bem como pelo uso de previsões de bolso molecular. Foi usada a plataforma Bite Net—Skoltech I Molecule (<https://sites.skoltech.ru/imolecule/tools/bitenet> — acessada em 1º de julho de 2024). Para a proteína p38 α MAPK (PDB ID: 1R39), as coordenadas do sítio ativo X = 55,93; Y = 33,48 e Z = 39,84; PKB/AKT (PDB: 1GZN) as coordenadas do sítio ativo X= -15,25; Y= 99,33 e Z= -57,97; e NF- κ B; p50/p65 (PDB: 1VKX) as coordenadas do sítio ativo X= 1,40; Y= 25,80 e Z= 61,20.

O software Molegro Virtual Docker v.6.0.1 (MVD) foi usado com parâmetros predefinidos. O ligante co-cristalizado foi usado para definir o sítio ativo. Os compostos foram então inseridos para analisar a estabilidade do sistema por meio das interações identificadas com os sítios ativos das enzimas, referenciando o valor de energia do MolDock Score. O algoritmo MolDock SE (Simplex Evolution) foi empregado com os seguintes parâmetros: Um total de 30 execuções com um máximo de 3000 interações usando uma população de 50 indivíduos, 2000 etapas de minimização para cada resíduo flexível e 2000 etapas de minimização global por simulação. A função de

pontuação MolDock Score (GRID) foi usada para calcular os valores de energia de encaixe. Um GRID foi definido em 0,3 Å, e a esfera de busca foi fixada em um raio de 15 Å. Para a análise da energia do ligante, interações eletrostáticas internas, ligações de hidrogênio internas e torções sp²-sp² foram avaliadas (DE AZEVEDO JR., 2010; THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

4.3.2 Avaliação do efeito do AMTAC-19 sobre a modulação das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógeno (MAPKs)

4.3.2.1 Marcação de células HCT-116 com anticorpos anti-MAPKs e análise por citometria de fluxo

Neste experimento, a cultura celular foi realizada usando células HCT-116 (1×10^6 células/mL) em placas de 24 poços, após 24 hs as células foram tratadas com o composto AMTAC-19 em concentrações de 10 e 20 µM por 48 h. Doxorrubicina (DXR) a 2,5 µM foi usada como droga padrão. Após o período de tratamento, as células foram destacadas da placa usando uma solução de tripsina/EDTA e centrifugadas ($500 \times g$, 5 min, 20 °C), em seguida ressuspensas em tampão e fixadas por 10 min a 37 °C. As amostras tratadas foram lavadas, permeabilizadas com tampão de lise e ressuspensas com anticorpos anti-p-ERK1/2, anti-p-JNK ou anti-p-p38 MAPK e incubadas por 30 min a 25 °C no escuro. Posteriormente, as células foram lavadas, centrifugadas ($300 \times g$, 5 min, 4 °C), e o sobrenadante foi removido de acordo com as instruções do fabricante. As células foram então ressuspensas em tampão e analisadas por citometria de fluxo (10.000 eventos por amostra). Os experimentos foram conduzidos independentemente em triplicata, e os dados obtidos foram analisados usando o software DIVA 6.0 (Ferreira et al., 2023b).

4.3.2.2 Avaliação da citotoxicidade do AMTAC-19 na presença ou ausência de inibidores de MAPKs (iMAPKs)

O ensaio MTT foi utilizado para avaliar a citotoxicidade induzida por AMTAC-19. Células HCT-116 (3×10^5 células/mL) foram cultivadas em placas de 96 poços e tratadas na presença ou ausência de inibidores de MAPK: 5 µM do inibidor de ERK (U0126), 20 µM do inibidor de JNK (SP600125) ou 20 µM do inibidor de p38 MAPK

(PD 169316) por 3 h. Após o tratamento, as células foram centrifugadas ($500 \times g$, 20 °C, 5 minutos), e o sobrenadante foi removido, após o que 10 μ L de solução de MTT (5 mg/mL) foram adicionados a cada poço e incubados por 4 h em 5% de CO₂ a 37 °C. Posteriormente, SDS (100 μ L por poço) foi adicionado para dissolver os cristais de formazan formados. A análise foi realizada medindo a densidade óptica usando um leitor de microplacas (Synergy HT, BioTek®, Winooski, VT, EUA) a 570 nm. Três experimentos independentes foram conduzidos em duplicata (Ferreira et al., 2023b).

4.3.3 Marcação de células HCT-116 com anticorpos anti-BCL-2 e análise por citometria de fluxo

Para investigar o efeito do AMTAC-19 na modulação desta via de sinalização, as células HCT-116 foram plaqueadas (1×10^6 células/mL) em placas de 24 poços. Após 24 hs as células foram tratadas com o composto AMTAC-19 em concentrações de 10 e 20 μ M por 48 h. Doxorrubicina (DXR) a 2,5 μ M foi usada como droga padrão. Após o período de tratamento, as células foram destacadas da placa usando uma solução de tripsina/EDTA e centrifugadas ($500 \times g$, 20 °C, 5 minutos), em seguida foram fixadas por 30 min a 4° C. As amostras tratadas foram lavadas, permeabilizadas com tampão de lise (30 minutos, no gelo), ressuspensas e marcadas com anticorpo anti-BCL-2 ou controle isotópico, seguindo as recomendações do fabricante. Após 30 minutos de incubação com os anticorpos (25 °C, no escuro), as células foram lavadas, centrifugadas ($300 \times g$, 4°C, 5 minutos) e o sobrenadante removido. Em seguida, as células foram ressuspensas em tampão e analisadas por citometria de fluxo (10.000 eventos por amostra). Os experimentos foram conduzidos independentemente em triplicata, e os dados obtidos foram analisados usando o software DIVA 6.0.

4.3.4 Marcação de células HCT-116 com anticorpos anti-PKB/AKT ou anti-NF- κ B/p65 e análise por citometria de fluxo

Para investigar o efeito do AMTAC-19 na modulação destas vias de sinalização, as células HCT-116 foram plaqueadas (1×10^6 células/mL) em placas de 24 poços. Após 24 hs as células foram tratadas com o composto AMTAC-19 em concentrações de 10 e 20 μ M por 48 h. Doxorrubicina (DXR) a 2,5 μ M foi usada como droga padrão.

Após o período de tratamento, as células foram destacadas da placa usando uma solução de tripsina/EDTA e centrifugadas ($500 \times g$, 20°C , 5 minutos), em seguida foram fixadas por 30 min a 4°C . As amostras tratadas foram lavadas, permeabilizadas com tampão de lise (30 minutos, no gelo), ressuspensas e marcadas com anticorpos anti-NF- κB /p65 ou anti-PKB/AKT, seguindo as recomendações do fabricante. Após 30 minutos de incubação com os anticorpos (25°C , no escuro), as células foram lavadas, centrifugadas ($300 \times g$, 4°C , 5 minutos) e o sobrenadante removido. Em seguida, as células foram ressuspensas em tampão e analisadas por citometria de fluxo (10.000 eventos por amostra). Os experimentos foram conduzidos independentemente em triplicata, e os dados obtidos foram analisados usando o software DIVA 6.0 (Ferreira et al., 2023b).

4.3.5 Quantificação de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelo ensaio DCFH-DA

2,7-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) é um reagente fluorogênico que foi usado para avaliar espécies reativas de oxigênio (EROs) em células HCT-116 após tratamento com AMTAC-19. As células HCT-116 foram semeadas em placas de 24 poços (1×10^6 células/mL) e incubadas por 24 h (5% CO_2 a 37°C). Em seguida, as células foram tratadas com AMTAC-19 (10 ou $20\ \mu\text{M}$), DXR ($2,5\ \mu\text{M}$) ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ($500\ \mu\text{M}$) na presença de DCFH-DA ($10\ \mu\text{M}$) e incubadas por 30 min, 1 h, 6 h, 12 h ou 24 h em 5% CO_2 a 37°C . Após esse período, as células foram coletadas e ressuspensas em PBS. A porcentagem de células fluorescentes foi determinada por citometria de fluxo, analisando 10.000 eventos adquiridos em comprimentos de onda de excitação de 485 nm e comprimentos de onda de fluorescência de 530 nm. Três experimentos independentes foram conduzidos em duplicata (FERREIRA et al., 2023a).

4.3.6 Avaliação do envolvimento do estresse oxidativo na citotoxicidade do AMTAC-19

A avaliação do envolvimento de ROS na citotoxicidade de AMTAC-19 foi realizada usando o ensaio MTT na presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC),

um composto antioxidante. As células HCT-116 foram semeadas em placas de 96 poços (100 µL/poço) a uma densidade de 3×10^5 células/mL e incubadas por 24 h (37 °C, 5% CO₂). Após esse período, as células foram incubadas por mais 3 h (37 °C, 5% CO₂) na presença ou ausência de 5 µM NAC. As células foram então tratadas com AMTAC-19 (10 ou 20 µM, 100 µL por poço) ou DXR (2,5 µM, 100 µL por poço) e incubadas por 72 h em uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Após a incubação, as placas foram centrifugadas (500 × g, 20 °C, 5 minutos) e 110 µL do sobrenadante foram removidos. Posteriormente, a solução de MTT (5 mg/mL, 10 µL por poço) foi adicionada e as células foram incubadas por 4 h a 37 °C em 5% de CO₂. Os cristais de formazan foram dissolvidos em 100 µL de SDS e as densidades ópticas foram medidas usando um leitor de microplacas (Synergy HT, BioTek[®]) em um comprimento de onda de 570 nm. Três experimentos independentes foram conduzidos em triplicata (FERREIRA et al., 2023b).

4.3.7 Investigação do tipo de morte celular induzida pelo AMTAC-19

4.3.7.1 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial por coloração com JC-1

Um corante cloreto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolil-carbocianina (JC-1) foi usado para detectar o MMP ($\Delta\Psi_m$) de células HCT-116. Em mitocôndrias saudáveis, o JC-1 está presente na matriz mitocondrial e forma oligômeros (agregados) resultando na emissão de fluorescência vermelha (590 nm). No entanto, em mitocôndrias danificadas ou disfuncionais, o JC-1 se apresenta na forma de monômeros, emitindo fluorescência verde (529 nm). Assim, a mudança da cor da fluorescência JC-1 de vermelho para verde pode ser utilizada para identificar uma redução em MMP celular, e a transição da cor da fluorescência JC-1 é resultante de uma despolarização, sendo um sinal característico de células em apoptose (Sivandzade; Bhalerao; Cucullo, 2019). Para este ensaio, as células HCT-116 foram plaqueadas (2×10^5) em placas de 24 poços e incubadas por 24 h em estufa (37 °C, 5% CO₂). Em seguida, foram tratadas com o AMTAC-19 (10 ou 20 µM) e a doxorubicina (2,5 µM), e incubadas por um período de 48h. Após o período de tratamento, as células foram coletadas e centrifugadas (500 × g, 20°C, 5 minutos), ressuspensas em PBS e marcadas com 20 µL de uma solução contendo JC-1 (2,5

μM), e posteriormente incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente no escuro. As células marcadas foram observadas sob um microscópio confocal de varredura a laser. A análise dos resultados foi realizada utilizando o software ImageJ (NIH, EUA) e a porcentagem da intensidade de fluorescência foi obtida pela normalização dos dados, considerando a média do controle como 100%. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata (ELEFANTOVA et al., 2018).

4.3.7.2 Análise nuclear por coloração com Hoechst

O Hoechst é um corante fluorescente que apresenta permeabilidade à membrana celular e se liga especificamente ao DNA, emitindo uma coloração azul. Esse corante é amplamente utilizado na identificação de alterações nucleares características de células em apoptose, como a condensação da cromatina e a fragmentação do DNA. Para este ensaio, as células da linhagem HCT-116 foram plaqueadas (2×10^5) em placas de 24 poços e incubadas por 24 h em estufa (37°C , 5% CO_2). Em seguida, foram tratadas com o AMTAC-19 (10 ou 20 μM) e a doxorrubicina (2,5 μM), e incubadas por um período de 48h. Após o período de tratamento, as células foram coletadas e centrifugadas ($500 \times g$, 20°C , 5 minutos), ressuspensas em PBS e marcadas com 20 μL de Hoechst (10 $\mu\text{g/mL}$), e posteriormente incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente no escuro. As células marcadas foram observadas sob um microscópio confocal de varredura a laser. A análise dos resultados foi realizada utilizando o software ImageJ (NIH, EUA) e a porcentagem da intensidade de fluorescência foi obtida pela normalização dos dados, considerando a média do controle como 100%. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata (NASR et al., 2020).

4.3.8 Avaliação da sobrevivência de células HCT-116 através do ensaio clonogênico

A perda da capacidade reprodutiva e a incapacidade das células de proliferarem indefinidamente podem ser avaliadas por meio do ensaio clonogênico. Este método é amplamente utilizado para a avaliação da toxicidade *in vitro*, diferenciando-se de outros testes de viabilidade que medem efeitos biológicos específicos (FRANKEN et al., 2006). O ensaio baseia-se na capacidade das células

de formar colônias após o tratamento com o composto teste, as quais são posteriormente contadas para análise. Para este ensaio, as células da linhagem HCT-116 foram plaqueadas na concentração de 1000 células por poço em placas de 24 poços, tratadas com diferentes concentrações não citotóxicas AMTAC-19 (0,39, 0,78 e 1,56 μM) incubadas por 48 horas e mantidas por 7 dias em estufa a 37°C com 5% de CO_2 . Durante esse período, o meio de cultura será substituído em dias alternados para assegurar a manutenção adequada das células. Após o período de incubação, os poços serão lavados com PBS e as células fixadas com metanol a 100% e coradas com solução de violeta genciana (FRANKEN et al., 2006). A análise das placas será conduzida por meio de microscopia óptica e estereoscópica. Os poços serão fotografados, e as colônias formadas, contendo no mínimo 50 células, serão quantificadas utilizando o software ImageJ. (NIH, EUA).

4.3.9 Teste de toxicidade aguda em embriões e larvas de peixe-zebra

A toxicidade aguda do AMTAC-19 foi avaliada no modelo de peixe-zebra, de acordo com o teste de toxicidade aguda de embrião de peixe (FET), diretriz nº 236 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), com algumas modificações (OCDE, 2013). Embriões de peixe-zebra com até 3 h pós-fertilização foram semeados em placa de 96 poços ($n = 20$, 1 embrião por poço) e expostos ao meio E3 (NaCl 5 mM, KCl 0,17 mM, CaCl_2 0,33 mM e MgSO_4 0,33 mM), DMSO (0,1%) e AMTAC-19 (100 μM), por 96 h. Efeitos letais e não letais foram observados diariamente por 96 h. Os embriões/larvas que apresentaram desfechos de letalidade (coagulação do ovo, ausência de formação de somitos, não desprendimento do broto da cauda e ausência de batimentos cardíacos) foram considerados mortos. Este número foi usado para determinar a taxa de sobrevivência % (número de organismos vivos/número total de organismos x 100) por amostra testada. As exposições estavam em condições estáticas (sem renovação da solução de exposição). As observações foram realizadas em estereomicroscópio (Olympus SZX7, Japão), com aumento de 56x, e fotografadas (Moticam 5+, China). A CL_{50} (concentração letal mediana) foi estimada a partir do número de óbitos. Após 96 h, as larvas sobreviventes foram eutanasiadas com eugenol e devidamente descartadas. Todos os procedimentos utilizados foram previamente aprovados pelo CEUA / UFPB, cód. Nº 5900310718.

4.4 Análise estatística

Para a análise estatística dos ensaios antitumorais *in vitro* foram utilizados testes matemáticos paramétricos e não-paramétricos definidos de acordo com a característica de cada experimento, bem como a normalidade dos dados. Os demais resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e analisados pelo teste de Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguido do teste de Tukey. Os valores foram considerados significativos, quando apresentarem um nível de significância (p) menor que 0,05. Para o ensaio de embriotoxicidade, os valores médios de concentração letal (LC₅₀) foram calculados por análise de regressão probit.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Docking Molecular

As previsões de encaixe molecular entre os ligantes AMTAC-19, DXR, ligantes do *Protein Data Bank* (PDB) ou de referências bibliográficas com a Proteína Cinase Regulada por Sinal Extracelular 1 (ERK1), Proteína Cinase N-terminal c-Jun 1 (JNK1), Proteína Cinase Ativada por Mitógeno p38 α (p38 α MAPK), Proteína Cinase B (PKB/AKT), Fator Nuclear kappa B (NF- κ B; p50/p65) e a Proteína linfoma de células B-2 (BCL-2) estão expressos na tabela 1, que exibe as energias médias (MolDock score) associadas às interações intermoleculares, juntamente com os valores de probabilidade de afinidade (p).

O valor RMSD foi de 0,9715 para o ligante carbamato de piridina co-cristalizado da ERK1, de 0,1129 para o ligante pirazoloquinolona da proteína JNK1, 0,2589 para o ligante co-cristalizado fenil tetrahidroisoquinolina de BCL-2-xL, indicando que as poses geradas posicionaram corretamente o ligante no sítio ativo, e que o programa forneceu valores satisfatórios para a validação do docking.

AMTAC-19 apresentou valores de probabilidade de afinidade superiores a 0,6 com ERK1 (0,793), JNK1 (0,781), p38 α MAPK (0,824), BCL-2-xL (0,603), PKB/AKT (0,756) e NF- κ B (p50/p65) (0,899) indicando interações favoráveis entre essa molécula e o sítio ativo das proteínas analisadas.

Quadro 2. Pontuação Moldock (unidades arbitrárias) e valores de probabilidade de interação (p) entre o (E)-1'-((4-bromobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-19), a doxorubicina ou outros ligantes e a Proteína Cinase Regulada por Sinais Extracelulares 1 (ERK1), a Proteína Cinase c-Jun N-terminal 1 (JNK1), a Proteína Cinase Ativada por Mitógenos p38 α (p38 α MAPK), Linfoma de células B-2 (BCL-2-xL), Proteína Cinase B (PKB/AKT) e o Fator Nuclear kappa B (NF-kB; p50/p65)

Proteína	Ligante	MolDock score*	(p)** MolDock score	Resíduo crítico	Distância das interações de ligações de hidrogênio (Å)
ERK1	AMTAC-19	-84,735	0,793	Leu156, Ala52, Ile31 e Thr110 (interações hidrofóbicas); Asp111 (ligação de hidrogênio).	Val39 (2,86Å).
	Doxorrubicina	-83,988	0,786		Leu107 (2,38Å); Met 108 (2,15Å); Ile31 (2,50Å); Glu109 (2,32Å); Lys114 (2,80Å).
	Inibidor carbamato de piridina ^a	-106,816	1		Lys114 (2,29Å); Met108 (1,96Å, 1,29Å); Asp106 (2,41Å).
JNK1	AMTAC-19	-74,978	0,781	Ile32, Val158, Ala53, Met108, Val40 e Lys55 (interações hidrofóbicas); Met108 (interações estéricas).	-
	Doxorrubicina	-96,058	1		Ile32 (2,26Å); Met111 (1,89Å, 2,95Å); Leu110 (2,54Å).
	inibidor pirazoloquinolona ^b	-68,224	0,710		Met111 (2,20Å, 2,99Å).
P38 α MAPK	AMTAC-19	-107,433	0,824	Ile116 (interações hidrofóbicas).	Ile116 (3,36Å); Gly110 (2,16Å); Ala111 (2,62Å);
	Doxorrubicina	-108,908	0,835		His126 (2,74 Å); Glu160 (2,37 Å), Val158 (3,75 Å); Asn159 (2,73 Å); Cys162 (2,23 Å); Gln120 (2,24 Å)

	BIRB-796 ^c	-130,409	1		Met109 (2,29Å); Val158 (2,33Å, 2,70Å, 2.80Å).
BCL-2-xL	AMTAC-19	-86,422	0,602	Leu96 (Interação hidrofóbica).	-
	Doxorrubicina	-89,486	0,624		Tyr67 (3,14 Å); Arg88 (2,27 Å).
	Inibidor fenil tetrahydroisoquinolina ^d	-143,364	1		-
PKB/AKT	AMTAC-19	-111,440	0,755	-	Tyr231 (1,73Å); Lys156 (5,20Å, 2,19Å); Asp441 (2,43Å).
	Doxorrubicina	-145,194	0,984		Asp293 (1,51Å); Asp275 (2,60Å); Phe294 (2,16Å, 2,46Å); Gly295 (2,77Å); Asn280 (2,55Å); Glu200 (1,76Å); Thr199 (2,31Å, 2,48Å); Arg274 (2,47Å).
	dicloridrato MK-2206 ^e	-147,481	1		Tyr327 (2,05Å); Tyr316 (3,10Å); Lys277 (2,76Å).
NF-κB	AMTAC-19	-94,355	0,899	Lys218 (Interação hidrofóbica).	Arg187 (1,98 Å); Arg33 (5,96 Å).
	Doxorrubicina	-99,320	0,946		Arg605 (1,98Å, 2,05Å); Lys218 (2,06Å); Asn186 (2,06Å, 2,54Å); Arg33 (2,33Å, 3,51Å); Arg187 (2,87Å).
	4-Metil-N1-(3- fenilpropil)benzeno- 1,2-diamina (controle positivo) ^f	-104,894	1		Lys218 (1,88Å); Glu193 (2,05Å).

Legenda: ^aPDBL (Ligante do *Protein Data Bank*): inibidor carbamato de piridina; ^bPDBL (Ligante do *Protein Data Bank*): inibidor pirazoloquinolona; ^cCTL (Ligante controle da p38α MAPK): doramapimod—BIRB-796; ^dPDBL (Ligante do *Protein Data Bank*): Inibidor fenil tetrahydroisoquinolina; ^eCTL (Ligante controle da PKB/AKT): dicloridrato MK-2206; ^fCTL (Ligante controle do NF-κB (p50/p65)): 4-Metil-N1-(3-fenilpropil)benzeno-1,2-diamina—JSH-23.

*Valores de energia expressos em kJ/mol.

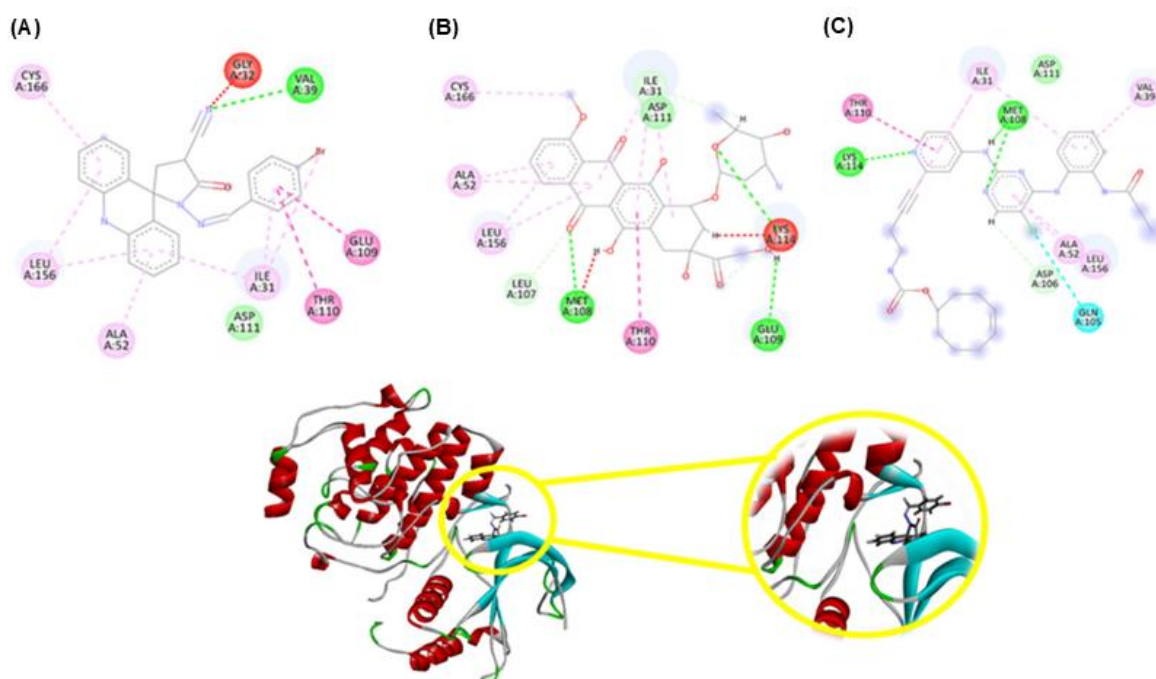
**Valor de probabilidade de afinidade.

Fonte: elaborado pela autora

Conforme observado na Figura 13, o AMTAC-19 interage com o sítio ativo correspondente ao domínio N-Terminal referente à região de ligação do ATP (Adenosina Trifosfato) da ERK1 por meio de interações hidrofóbicas (linhas tracejadas em rosa e azul), interações estéricas (linhas tracejadas em vermelho) e ligações de

hidrogênio (linha tracejada em verde). As interações hidrofóbicas corresponderam aos tipos empilhados alquil, π -alquil e π - π e foram observadas principalmente nos anéis aromáticos da estrutura e no sítio bromo (Br) por meio dos resíduos cisteína 166 (Cys166 - 1 interação), leucina 156 (Leu156 - 2 interações), alanina 52 (Ala52 - 1 interação), isoleucina 31 (Ile31 - 3 interações), treonina 110 (Thr110 - 1 interação) e glutamato 109 (Glu109 - 1 interação). As interações de ligação de hidrogênio foram observadas no grupo nitrila e outros átomos de nitrogênio (N) na estrutura por meio dos resíduos aspartato 111 (Asp111 - 1 interação) e valina 39 (Val39 - 1 interação). Além disso, uma interação desfavorável foi observada no grupo nitrila através do resíduo glicina 32 (Gly32). AMTAC-19 exibiu interações semelhantes às estabelecidas pelos compostos doxorrubicina (DXR) e o ligante PDB (interações hidrofóbicas: Leu156, Ala52, Ile31 e Thr110; ligação de hidrogênio: Asp111).

Figura 13. Interações moleculares entre o AMTAC-19, a doxorrubicina ou o ligante do *Protein Data Bank* (PDB) e a Proteína Cinase Regulada por Sinal Extracelular 1 (ERK1)

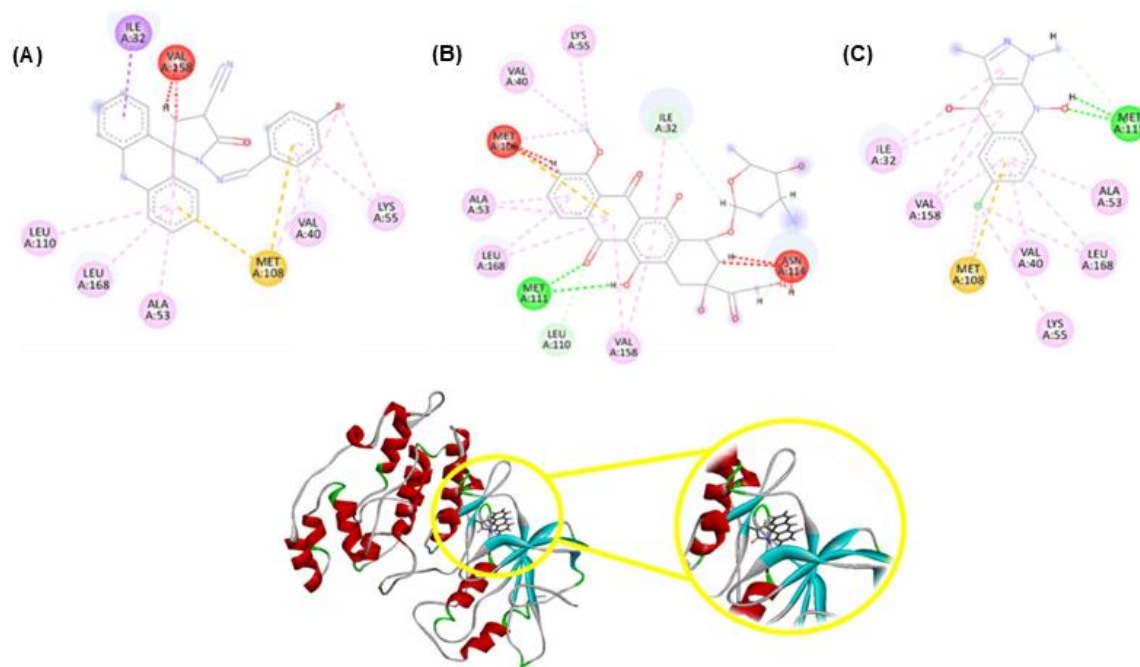


Interações 2D e 3D entre (A) AMTAC-19, (B) doxorrubicina (DXR), (C) Ligante PDB (inibidor de carbamato de piridina) e ERK1 (PDB: 5LCJ). **Legenda:** rosa e azul: interações hidrofóbicas; vermelho: interações estéricas; verde: interações de ligação de hidrogênio; CYS: cisteína; GLY: glicina; VAL: valina; LEU: leucina; ALA: alanina; ASP: ácido aspártico; ILE: isoleucina; THR: treonina; GLU: ácido glutâmico; MET: metionina; e GLN: glutamina.

Fonte: elaborado pela autora

A interação molecular entre AMTAC-19 e JNK1 envolveu interações hidrofóbicas (linhas tracejadas em rosa) correspondentes aos tipos alquila, π -alquila e π - σ , relacionadas a interações nos anéis aromáticos da estrutura e no sítio bromo (Br), através dos resíduos Ile32 (1 interação), Val158 (1 interação), Leu110 (1 interação), Leu168 (1 interação), Ala53 (1 interação), metionina 108 (Met108 - 1 interação), Val40 (1 interação) e lisina 55 (Lys55 - 2 interações). Além disso, interações estéricas também foram observadas entre AMTAC-19 e o sítio ativo JNK1 (interações desfavoráveis (linhas tracejadas em vermelho) e interações π -ânion (linha tracejada em laranja)), através dos resíduos Met108 (2 interações) e Val158 (1 interação). Além disso, o composto AMTAC-19 exibiu interações semelhantes às estabelecidas pelos compostos DXR e o ligante PDB nos resíduos Ile32, Val158, Leu168, Ala53, Met108, Val40 e Lys55 (interações hidrofóbicas) e Met108 (interações estéricas) (Figura 14).

Figura 14. Interações moleculares entre o AMTAC-19, a doxorrubicina ou o ligante do *Protein Data Bank* (PDB) e a Proteína Cinase N-terminal c-Jun 1 (JNK1)

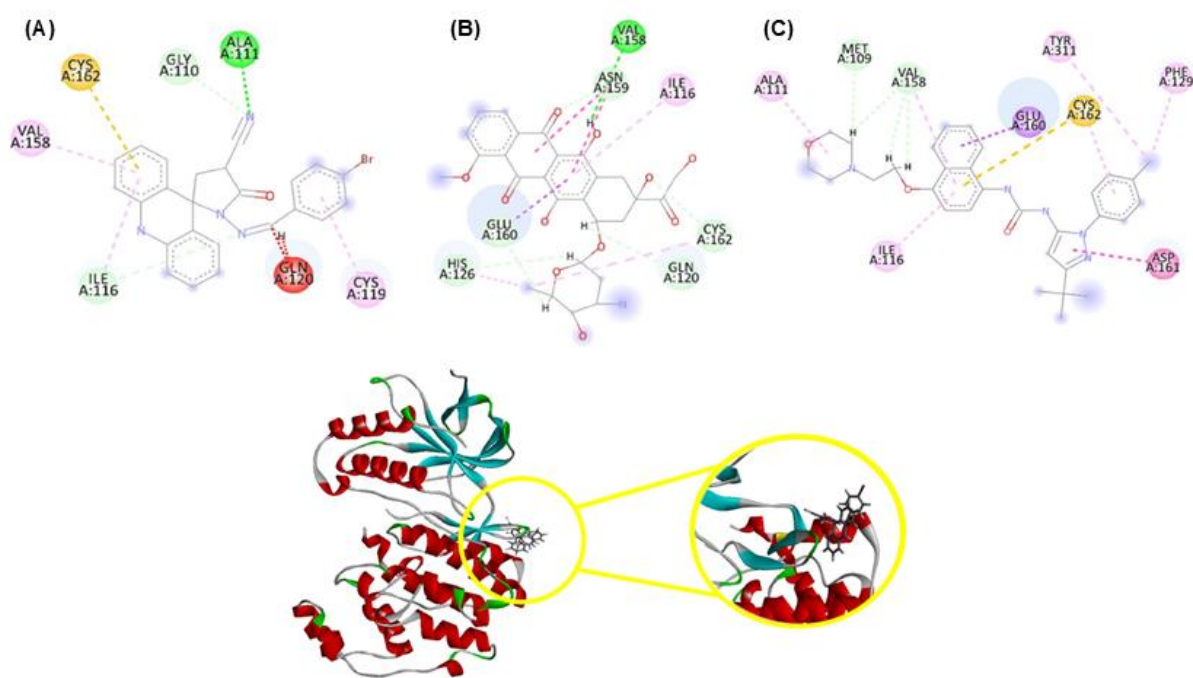


Interações 2D e 3D entre (A) AMTAC-19, (B) doxorrubicina (DXR), (C) Ligante PDB (inibidor de pirazoloquinolona) e JNK1 (PDB: 2G01). **Legenda:** rosa e azul: interações hidrofóbicas; vermelho e laranja: interações estéricas; verde: interações de ligação de hidrogênio; LYS: lisina; ASN: asparagina; VAL: valina; LEU: leucina; ALA: alanina; ILE: isoleucina; e MET: metionina.

Fonte: elaborado pela autora

Em relação a proteína p38 α MAPK, ocorreu interações hidrofóbicas entre o composto AMTAC-19 e a proteína alvo, correspondentes aos tipos alquila e π -alquila, presentes no domínio de ligação do ATP. Conforme observado para ERK1 e JNK1, essas interações foram predominantemente encontradas nos anéis aromáticos da estrutura por meio dos resíduos Val158 (1 interação), Ile116 (1 interação) e Cys119 (1 interação). As interações estéricas foram do tipo desfavorável (linhas tracejadas em vermelho) com o resíduo glutamina 120 (Gln120 - 2 interações). Adicionalmente, foram observadas ligações de hidrogênio entre AMTAC-19 e os resíduos Ala111 (1 interação), Gly110 (1 interação) e Ile116 (1 interação). A interação hidrofóbica formada pelo resíduo Ile116 foi observada em todos os compostos (Figura 15).

Figura 15. Interações moleculares entre o AMTAC-19, a doxorubicina ou o ligante doramapimod—BIRB-796 e a Proteína Cinase Ativada por Mitógeno p38 α (p38 α MAPK)



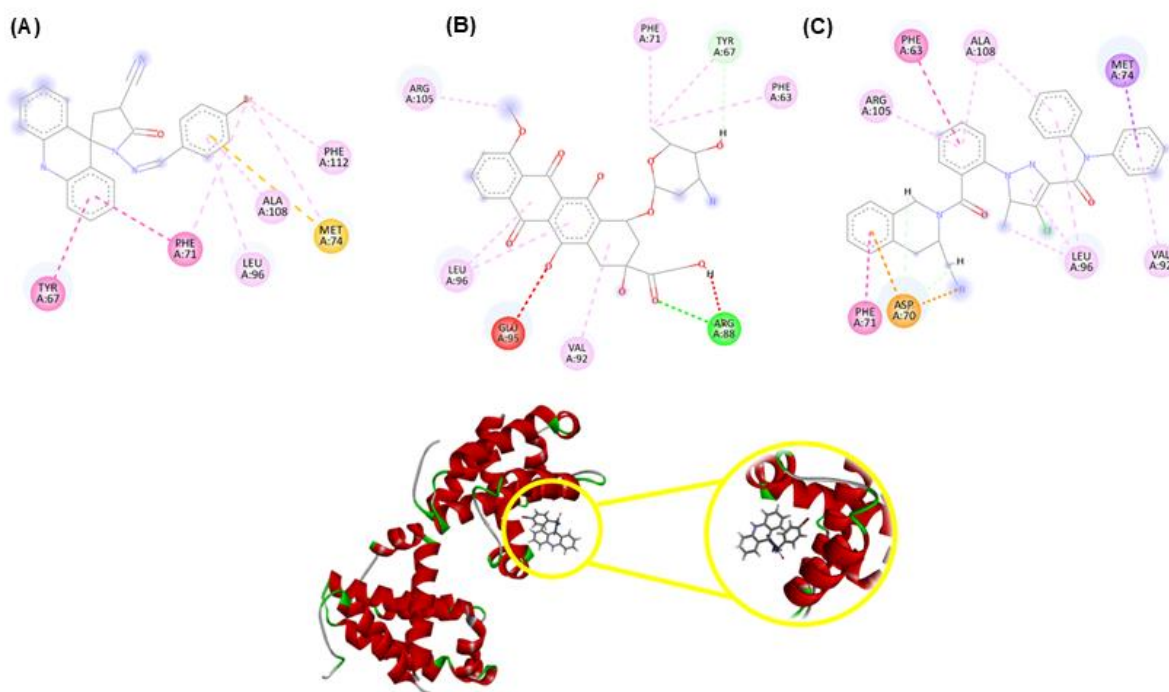
Interações 2D e 3D entre (A) AMTAC-19, (B) doxorubicina (DXR), (C) doramapimod (BIRB-796) e p38 α MAPK (PDB: 1R39). **Legenda:** rosa e azul: interações hidrofóbicas; vermelho e laranja: interações estéricas; verde: interações de ligação de hidrogênio; HIS (Histidina); TYR (Tirosina); PHE (Fenilalanina); ASN: asparagina; VAL: valina; ILE: isoleucina; MET: metionina; CYS: cisteína; GLY: glicina; ALA: alanina; ASP: ácido aspártico; GLU: ácido glutâmico; e GLN: glutamina.

Fonte: elaborado pela autora

Os resultados de encaixe molecular entre AMTAC-19 e BCL-2-xL envolveu interações hidrofóbicas correspondentes aos tipos, π - π -Stacked e π - π -T-shaped (linhas tracejadas em rosa escuro) e alquil e π -alquil (linhas tracejadas em rosa claro),

relacionadas a interações nos anéis aromáticos da estrutura e no sítio bromo (Br), através do resíduo, fenilalanina 112 (Phe112 - 2 interações), Phe71, tirosina 67 (Tyr67 – 1 interação), Leu96 (1 interação), Ala108 (1 interação). Além disso, interações estéricas também foram observadas entre AMTAC-19 e o sítio ativo BCL-2-xL do tipo π -Sulfur (linha tracejada em laranja), relacionadas a interações nos anéis aromáticos e o átomo de bromo (Br), através do resíduo metionina (Met74 - 1 interação). O AMTAC-19 exibiu interações semelhantes às estabelecidas pelos compostos DXR e o ligante PDB no resíduo crítico da proteína alvo, através interações hidrofóbicas do aminoácido Leu96 (Figura 16).

Figura 16. Interações moleculares entre o AMTAC-19, a doxorubicina ou o ligante do *Protein Data Bank* (PDB) e a Linfoma de células B-2 (BCL-2-xL)



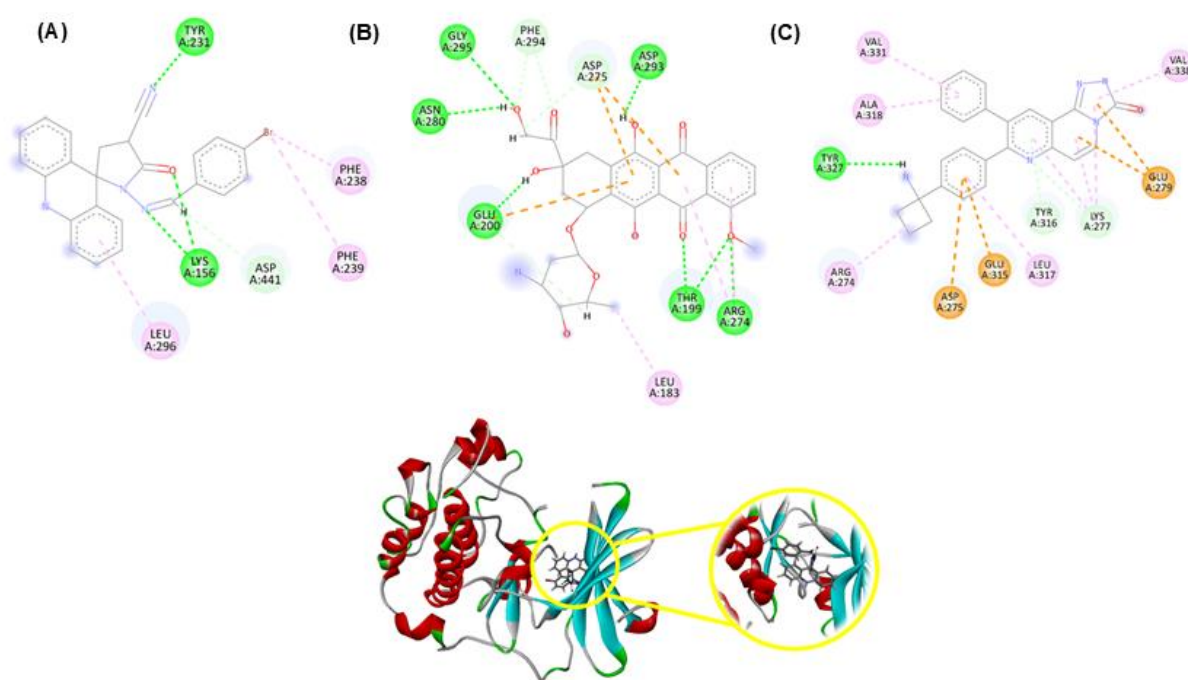
Interações 2D e 3D entre (A) AMTAC-19, (B) doxorubicina (DXR), (C) Ligante PDB (inibidor fenil tetrahydroisoquinolina amida) e BCL-2-xL (PDB: 2W3L). **Legenda:** rosa escuro e rosa claro: interações hidrofóbicas; vermelho e laranja: interações estéricas; verde: interações de ligação de hidrogênio; TYR: tirosina; PHE: fenilalanina; ARG: arginina; GLU: glutamina; ASP: ácido aspártico; VAL: valina; LEU: leucina; ALA: alanina e MET: metionina.

Fonte: elaborado pela autora

Ligação de hidrogênio foi observada entre o AMTAC-19 e a proteína PKB/AKT no resíduo Lys156 (2 interações), Tyr231 (1 interação) e ácido aspártico 441 (Asp441 - 1 interação) (linhas tracejadas em verde), relacionada aos grupos amina e grupo carbonila. Em adição, também foram observadas ligações hidrofóbicas do tipo, π -

alquil (linhas tracejadas em rosa) com Leu296 (1 interação), Phe238 (1 interação) e Phe239 (1 interação), relacionadas a ligação aos anéis aromáticos da estrutura e o átomo de bromo (Br). A DXR mostrou ligações de hidrogênio com Asp293, Asp275, Phe294, Gly295, Asn280, Glu200, Thr199 e Arg274, além de ligações hidrofóbicas com Leu183. Para o ligante dicloridrato MK-2206 foram observadas ligações de hidrogênio com Tyr327, Tyr316 e Lys277. Ligações hidrofóbicas também foram observadas com os resíduos Val331, Val338, Ala318, Arg274 e Leu317 e interações estéricas com Asp275, Glu315 e Glu279 (Figura 17).

Figura 17. Interações moleculares entre o AMTAC-19, a doxorubicina ou o ligante dicloridrato MK-2206 e a Proteína Cinase B (PKB/AKT)



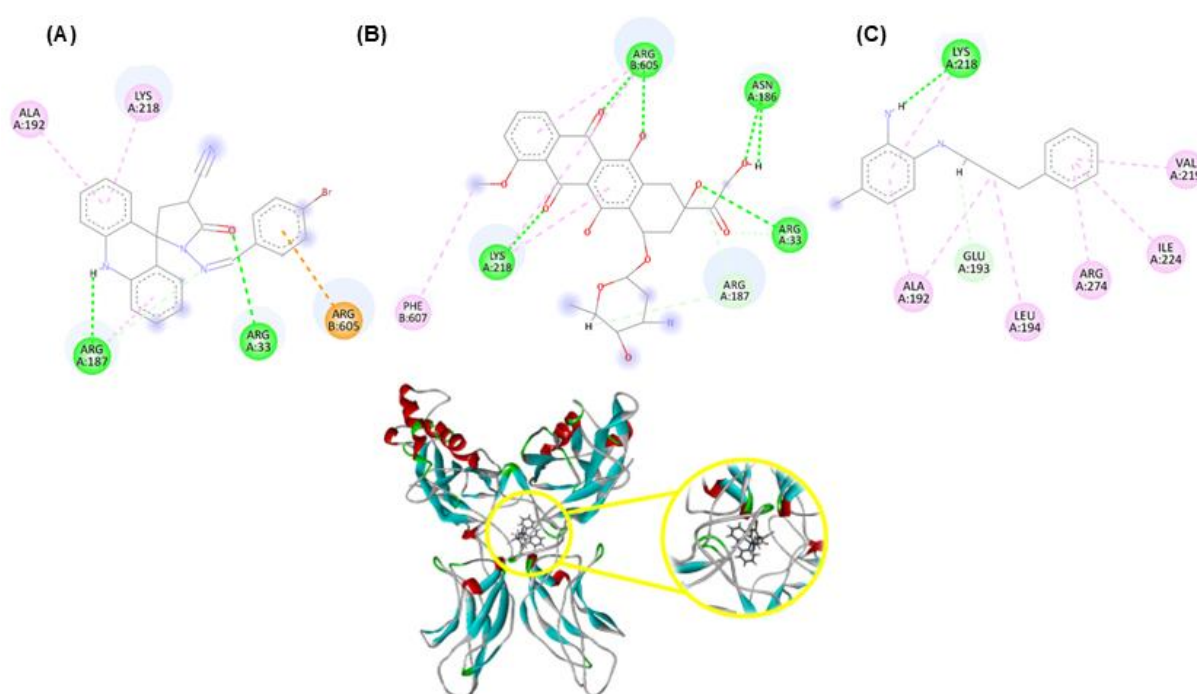
Interações 2D e 3D entre (A) AMTAC-19, (B) doxorubicina (DXR), (C) o ligante dicloridrato MK-2206 e PKB/AKT (PDB: 1GZN). **Legenda:** rosa: interações hidrofóbicas; vermelho e laranja: interações estéricas; verde: interações de ligação de hidrogênio; TYR: tirosina; PHE: fenilalanina; LYS: lisina; ARG: arginina; GLU: glutamina; ASP: ácido aspártico; VAL: valina; LEU: leucina; ALA: alanina e MET: metionina.

Fonte: elaborado pela autora

Para a proteína NF- κ B, o composto AMTAC-19 mostrou interações hidrofóbicas do tipo, π -alquil (linhas tracejadas em rosa) com resíduos Lys218 (1 interação) e Ala192 (1 interação), ligação de hidrogênio convencional com Arginina 187 (Arg187 - 2 interações) e Arg33 (1 interação) e interações fracas do tipo carbono-hidrogênio (linhas tracejadas em verde). Também foram observadas interações estéricas do tipo,

π -Cátion com Arg605 (1 interação) (linhas tracejadas em laranja), sendo estas interações relacionadas principalmente pela ligação aos anéis aromáticos da estrutura e o átomo de bromo (Br), além de contribuições dos átomos de hidrogênio do grupo amina e grupo carbonila. O AMTAC-19 exibiu interações semelhantes às estabelecidas pelos compostos DXR (Lys218, Arg187 e Arg33) e o ligante 4-metil-N1-(3-fenilpropil)benzeno-1,2-diamina (Lys218) no resíduo crítico da proteína alvo (Figura 18).

Figura 18. Interações moleculares entre o AMTAC-19, a doxorubicina ou o ligante 4-metil-N1-(3-fenilpropil)benzeno-1,2-diamina e o Fator Nuclear *kappa* B (NF- κ B; p50/p65)



Interações 2D e 3D entre (A) AMTAC-19, (B) doxorubicina (DXR), (C) o ligante 4-Metil-N1-(3-fenilpropil)benzeno-1,2-diamina e NF- κ B; p50/p65 (PDB: 1VKX). **Legenda:** rosa: interações hidrofóbicas; laranja: interações estéricas; verde: interações de ligação de hidrogênio; PHE: fenilalanina; LYS: lisina; ARG: arginina; GLU: glutamina; ASP: ácido aspártico; LEU: leucina e ALA: alanina.

Fonte: elaborado pela autora

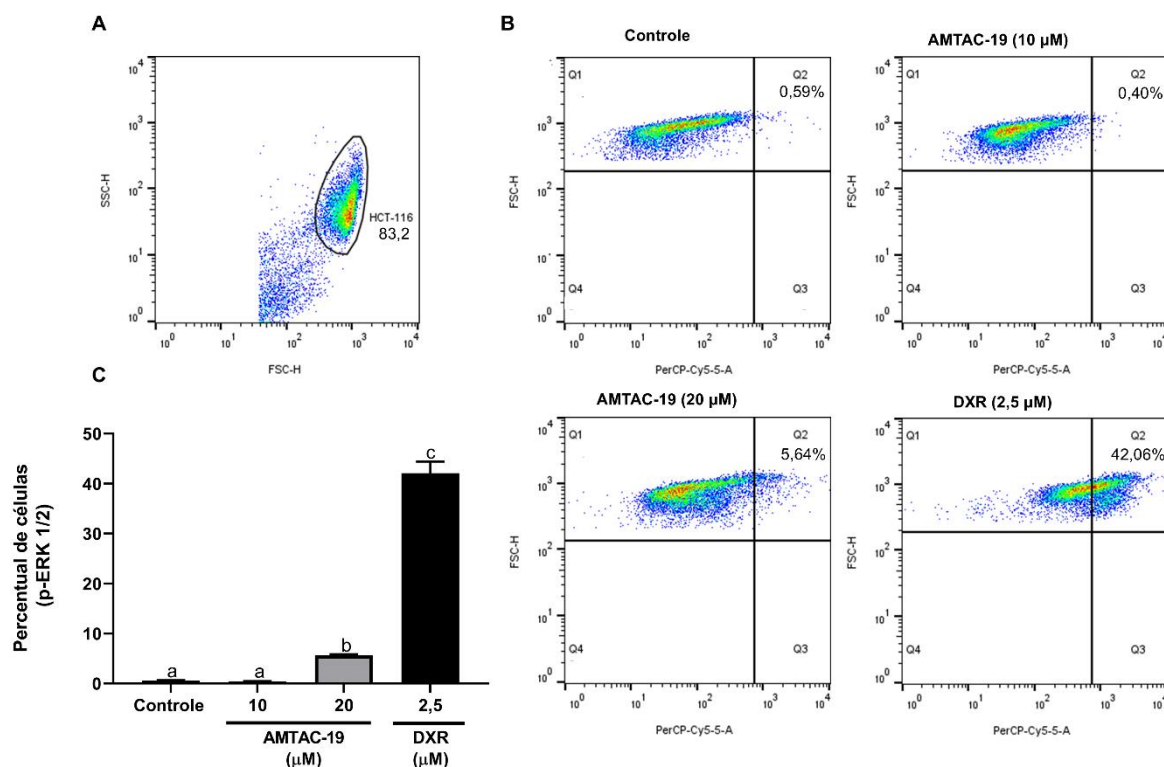
5.2 Efeito do AMTAC-19 sobre a modulação das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógeno (MAPKs)

5.2.1 Marcação com anticorpos anti-MAPKs e análise por citometria de fluxo

Após o tratamento das células HCT-116 com AMTAC-19 (20 μ M), foi observado um aumento significativo na porcentagem de células marcadas com anticorpos anti-

p-ERK1/2 ($5,64 \pm 0,20\%$; $p < 0,05$) em comparação ao grupo controle ($0,59 \pm 0,06\%$). Também, a droga padrão DXR também aumentou significativamente a porcentagem de células marcadas ($42,07 \pm 2,32\%$, $p < 0,05$) em comparação ao controle (Figura 19).

Figura 19. Modulação das Proteínas Cinases Reguladas por Sinal Extracelular 1 e 2 (ERK1/2) em células HCT-116 após tratamento com AMTAC-19 (10 ou 20 μM) ou doxorrubicina (DXR, 2,5 μM)

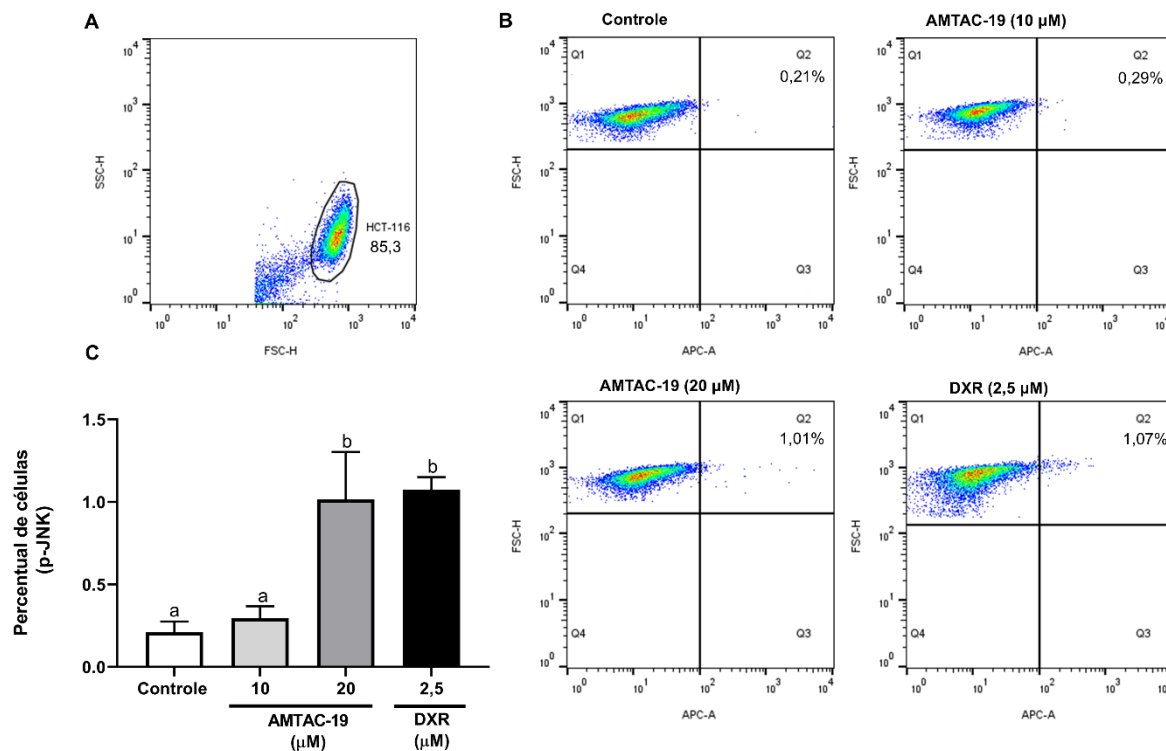


Legenda: Efeito dos tratamentos com AMTAC-19 (10 ou 20 μM) ou doxorrubicina (DXR, 2,5 μM) na atividade da fosfo-Proteínas Cinases Reguladas por Sinal Extracelular 1 e 2 (p-ERK1/2) em células HCT-116. **(A)** A população celular foi avaliada pela análise dos *dotplots* de fluorescência p-ERK1/2 (PerCP-Cy5.5), determinando a região (Q1) correspondente à autofluorescência de células não marcadas e a região (Q2) correspondente à porcentagem de células fluorescentes consideradas positivas. **(B)** Os *dotplots* representativos mostram a fluorescência p-ERK1/2 (PerCP-Cy5.5, eixo X) em função do tamanho da célula (FSC—Forward Scatter, eixo Y) para diferentes grupos experimentais. **(C)** Os resultados obtidos por citometria de fluxo são apresentados graficamente. Os dados são representados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) em triplicata. ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Letras diferentes (a, b, c) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

Fonte: elaborado pela autora

Após 48 h de tratamento com AMTAC-19 (20 μM), a porcentagem de células marcadas com o anticorpo anti-p-JNK aumentou significativamente ($1,02 \pm 0,28\%$; $p < 0,05$) em comparação ao controle ($0,21 \pm 0,06\%$). O fármaco padrão DXR (2,5 μM) também induziu um aumento significativo na porcentagem de células marcadas ($1,07 \pm 0,07\%$, $p < 0,05$) em comparação ao controle (Figura 20).

Figura 20. Modulação das Proteínas Cinases N-terminal c-Jun 1 e 2 (JNK1/2) em células HCT-116 após tratamento com AMTAC-19 (10 ou 20 μ M) ou doxorrubicina (DXR, 2,5 μ M)

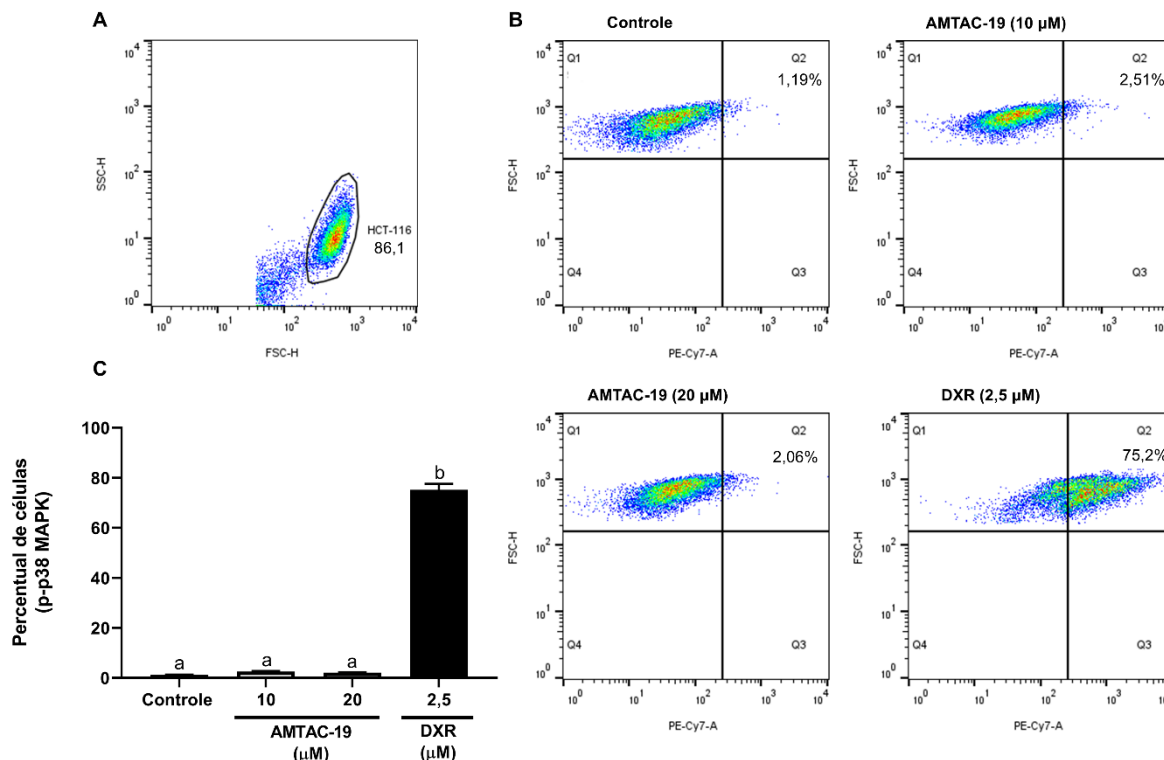


Legenda: Efeito dos tratamentos com AMTAC-19 (10 ou 20 μ M) ou doxorrubicina (DXR, 2,5 μ M) na atividade da fosfo-Proteínas Cinases N-terminal c-Jun (p-JNK) em células HCT-116. **(A)** A população celular foi avaliada pela análise de *dotplots* de fluorescência de p-JNK (APC), determinando a região (Q1) correspondente à autofluorescência de células não marcadas e a região (Q2) correspondente à porcentagem de células fluorescentes consideradas positivas. **(B)** *Dotplots* representativos mostram a fluorescência de p-JNK (APC, eixo X) como uma função do tamanho da célula (FSC–Forward Scatter, eixo Y) para diferentes grupos experimentais. **(C)** Os resultados obtidos por citometria de fluxo são apresentados graficamente. Os dados são representados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) em triplicata. ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Letras diferentes (a, b) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

Fonte: elaborado pela autora

Nenhuma alteração significativa foi observada na porcentagem de células marcadas com anticorpos anti-p-p38 MAPK após o tratamento com AMTAC-19. Em contraste, o tratamento com DXR induziu um aumento significativo na porcentagem de células marcadas com anticorpos anti-p-p38 MAPK ($75,20 \pm 2,37\%$, $p < 0,05$) em comparação ao grupo controle ($1,20 \pm 0,11\%$) (Figura 21).

Figura 21. Modulação das Proteína Cinase Ativada por Mitógeno p38 (p38 MAPK) em células HCT-116 após tratamento com AMTAC-19 (10 ou 20 μM) ou doxorrubicina (DXR, 2,5 μM)



Legenda: Efeito dos tratamentos com AMTAC-19 (10 ou 20 μM) ou doxorrubicina (DXR, 2,5 μM) na atividade da fosfo-Proteína Cinase Ativada por Mitógeno p38 (p-p38 MAPK) em células HCT-116. **(A)** A população celular foi avaliada pela análise de *dotplots* de fluorescência de p-p38 MAPK (PE-Cy7), determinando a região (Q1) correspondente à autofluorescência de células não marcadas e a região (Q2) correspondente à porcentagem de células fluorescentes consideradas positivas. **(B)** Os *dotplots* representativos mostram a fluorescência de p-p38 MAPK (PE-Cy7, eixo X) em função do tamanho da célula (FSC–Forward Scatter, eixo Y) para diferentes grupos experimentais. **(C)** Os resultados obtidos por citometria de fluxo são apresentados graficamente. Os dados são representados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) em triplicata. ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Letras diferentes (a, b) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

Fonte: elaborado pela autora

5.2.2 Citotoxicidade do AMTAC-19 na presença ou ausência de inibidores de MAPKs (iMAPKs)

O tratamento com AMTAC-19 (10 ou 20 μM) na ausência do inibidor de ERK (U0126; 5 μM) induziu uma redução significativa na viabilidade celular (10 μM : $55,84 \pm 2,38\%$; 20 μM : $27,13 \pm 2,10\%$, $p < 0,05$) em comparação com o controle ($100,00 \pm 5,04\%$). O pré-tratamento com inibidor de ERK (U0126, 5 μM) preveniu significativamente a citotoxicidade de AMTAC-19 (10 μM : $83,67 \pm 3,17\%$, $p < 0,05$) em

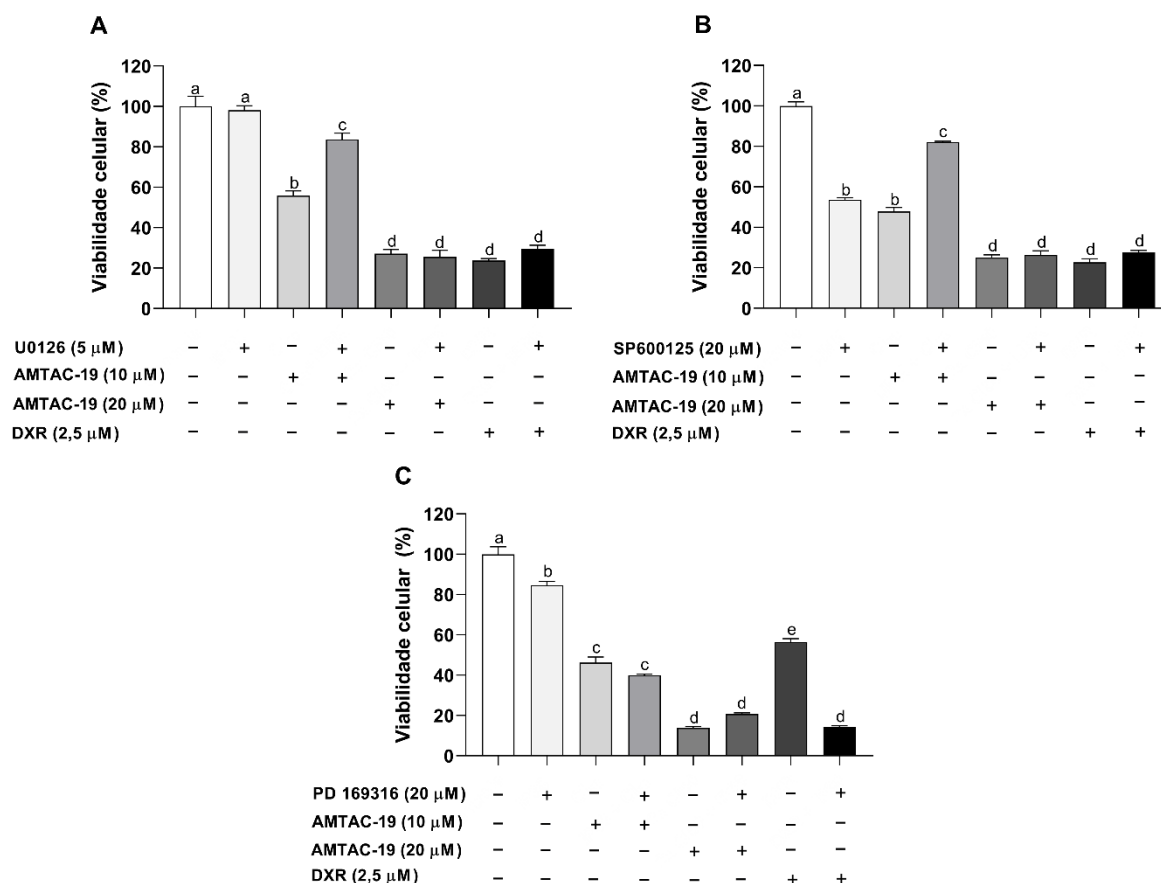
comparação com o grupo tratado com AMTAC-19 na ausência do inibidor de U0126 (Figura 22 A).

Da mesma forma, o tratamento com AMTAC-19 (10 μ M) na ausência do inibidor de JNK (SP600125, 20 μ M) resultou em uma redução significativa na viabilidade celular ($47,89 \pm 1,98\%$, $p < 0,05$) em comparação com o controle ($100,00 \pm 2,08\%$). O pré-tratamento com o inibidor SP600125 preveniu significativamente a citotoxicidade de AMTAC-19 ($82,11 \pm 0,48\%$, $p < 0,05$) em comparação com o grupo tratado com AMTAC-19 na ausência do inibidor de JNK (Figura 22 B).

Por outro lado, não foram observados efeitos significativos na citotoxicidade do AMTAC-19 ($39,95 \pm 0,61\%$, $p < 0,05$) após o pré-tratamento com o inibidor p38 MAPK (PD 169316, 20 μ M) em comparação ao grupo tratado com AMTAC-19 (10 μ M) na ausência do inibidor PD169316 ($46,26 \pm 2,79\%$, $p < 0,05$) (Figura 22 C).

Além disso, conforme observado na Figura X C, o pré-tratamento com inibidor de p38 MAPK aumentou significativamente a citotoxicidade do DXR ($14,74 \pm 0,75\%$, $p < 0,05$) em comparação ao grupo tratado com DXR na ausência do inibidor PD169316 ($56,49 \pm 1,62\%$) (Figura 22 C).

Figura 22. Efeito do AMTAC-19 ou doxorrubicina (DXR), na presença ou ausência de inibidores de ERK1/2 (U0126), JNK (SP600125) ou p38 MAPK (PD 169316), sobre a viabilidade de células da linhagem de carcinoma colorretal humano HCT-116 após 72 h de tratamento



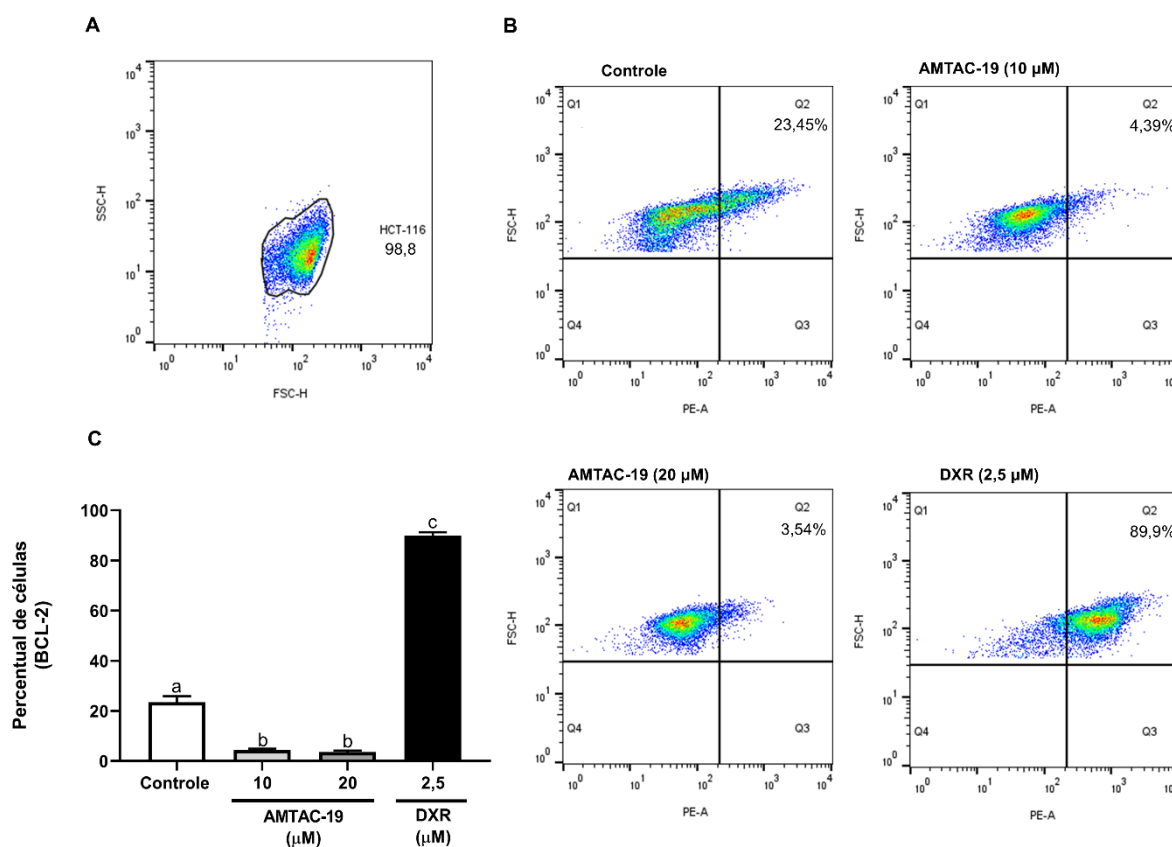
Legenda: O ensaio MTT foi usado para avaliar a viabilidade celular após tratamento com AMTAC-19 (10 ou 20 μM) ou doxorrubicina (DXR, 2,5 μM) por 72 h, na presença ou ausência de inibidores de MAPK: **(A)** inibidor de ERK1/2 (U0126, 5 μM), **(B)** inibidor de JNK (SP600125, 20 μM) ou **(C)** inibidor de p38 MAPK (PD 169316, 20 μM). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM) em triplicata. ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Letras diferentes (a, b, c, d, e) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

Fonte: elaborado pela autora

5.3 Marcação de células HCT-116 com anticorpos anti-BCL-2 e análise por citometria de fluxo

Após o tratamento das células HCT-116 com AMTAC-19 (10 ou 20 μM), foi observado uma redução significativa na porcentagem de células marcadas com anticorpos anti-BCL-2 (10 μM: $4,39 \pm 0,57\%$; 20 μM: $3,54 \pm 0,61\%$, $p < 0,05$ para ambos) em comparação ao grupo controle ($23,45 \pm 2,45\%$). Em contraste, a droga padrão DXR aumentou significativamente a porcentagem de células marcadas ($89,90 \pm 1,37\%$, $p < 0,05$) em comparação ao controle (Figura 23).

Figura 23. Modulação das proteínas BCL-2 em células HCT-116 após tratamento com AMTAC-19 (10 ou 20 μ M) ou doxorubicina (DXR, 2,5 μ M)



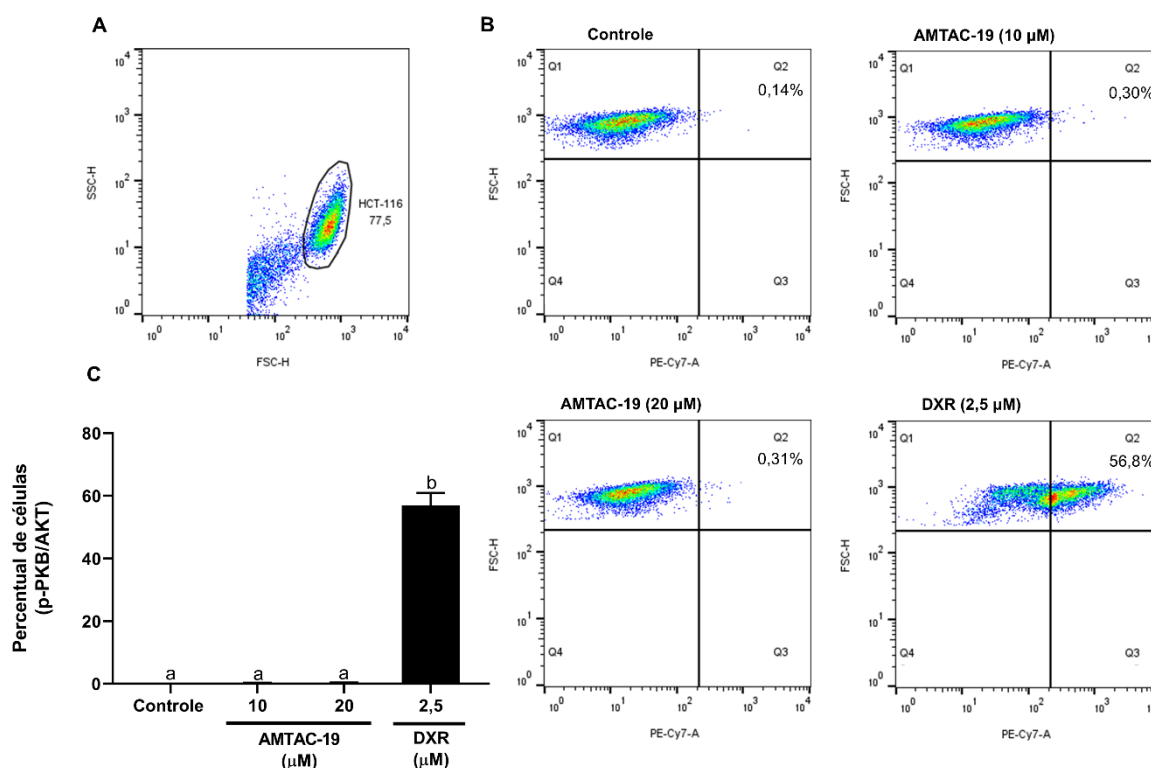
Legenda: Efeito dos tratamentos com AMTAC-19 (10 ou 20 μ M) ou doxorubicina (DXR, 2,5 μ M) na atividade da fosfo-Proteína linfoma de células B-2 (BCL-2) em células HCT-116. **(A)** A população celular foi avaliada pela análise de *dotplots* de fluorescência de BCL-2 (PE), determinando a região (Q1) correspondente à autofluorescência de células não marcadas e a região (Q2) correspondente à porcentagem de células fluorescentes consideradas positivas. **(B)** Os *dotplots* representativos mostram a fluorescência de BCL-2 (PE, eixo X) em função do tamanho da célula (FSC–Forward Scatter, eixo Y) para diferentes grupos experimentais. **(C)** Os resultados obtidos por citometria de fluxo são apresentados graficamente. Os dados são representados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) em triplicata. ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Letras diferentes (a, b) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

Fonte: elaborado pela autora

5.4 Marcação de células HCT-116 com anticorpos anti-PKB/AKT e análise por citometria de fluxo

Como observado na figura 24, não houve alteração significativa na porcentagem de células marcadas com anticorpos anti-PKB/AKT após o tratamento com AMTAC-19. Em contraste, novamente a DXR induziu um aumento significativo na porcentagem de células marcadas com anticorpos anti-PKB/AKT ($56,88 \pm 4,06\%$, $p < 0,05$) em comparação ao grupo controle ($0,15 \pm 0,02\%$) (Figura 24).

Figura 24. Modulação da Proteína Cinase B (PKB/AKT) em células HCT-116 após tratamento com AMTAC-19 (10 ou 20 μM) ou doxorubicina (DXR, 2,5 μM)



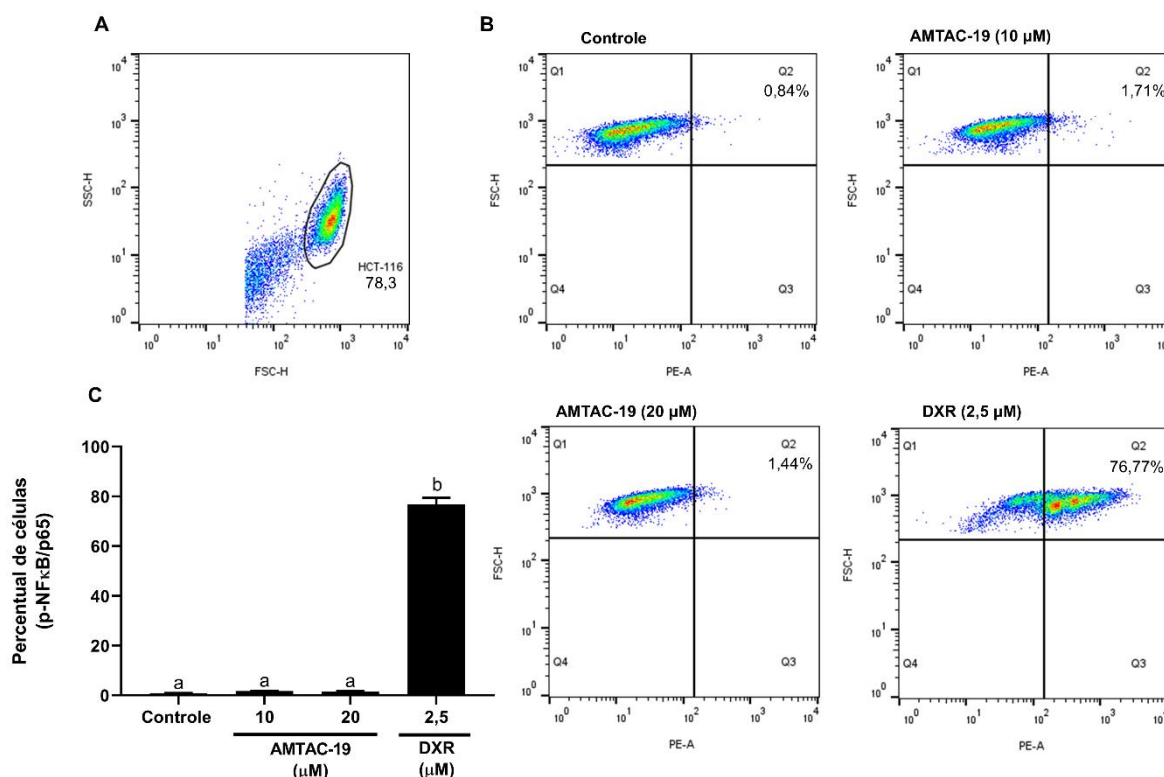
Legenda: Efeito dos tratamentos com AMTAC-19 (10 ou 20 μM) ou doxorubicina (DXR, 2,5 μM) na atividade da fosfo-Proteína Cinase B (PKB/AKT) em células HCT-116. (A) A população celular foi avaliada pela análise de *dotplots* de fluorescência de PKB/AKT (PE-Cy7), determinando a região (Q1) correspondente à autofluorescência de células não marcadas e a região (Q2) correspondente à porcentagem de células fluorescentes consideradas positivas. (B) Os *dotplots* representativos mostram a fluorescência de PKB/AKT (PE-Cy7, eixo X) em função do tamanho da célula (FSC–Forward Scatter, eixo Y) para diferentes grupos experimentais. (C) Os resultados obtidos por citometria de fluxo são apresentados graficamente. Os dados são representados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) em triplicata. ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Letras diferentes (a, b) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

Fonte: elaborado pela autora

5.5 Marcação de células HCT-116 com anticorpos anti-NF- κB (p65) e análise por citometria de fluxo

O tratamento de células HCT-116 com AMTAC-19 e posteriormente marcação com anticorpos anti-NF- κB (p65) permitiu observar que não houve alteração significativa na porcentagem de células marcadas. Em contraste, o tratamento com DXR induziu um aumento significativo na porcentagem de células marcadas com anticorpos anti-NF- κB (p65) ($76,78 \pm 2,66\%$, $p < 0,05$) em comparação ao grupo controle ($0,85 \pm 0,11\%$) (Figura 25).

Figura 25. Modulação do Fator Nuclear *kappa* B (NF- κ B; p65) em células HCT-116 após tratamento com AMTAC-19 (10 ou 20 μ M) ou doxorrubicina (DXR, 2,5 μ M)



Legenda: Efeito dos tratamentos com AMTAC-19 (10 ou 20 μ M) ou doxorrubicina (DXR, 2,5 μ M) na atividade da fosfo-Fator Nuclear *kappa* B (NF- κ B; p65) em células HCT-116. **(A)** A população celular foi avaliada pela análise de *dotplots* de fluorescência de NF- κ B; p65 (PE), determinando a região (Q1) correspondente à autofluorescência de células não marcadas e a região (Q2) correspondente à porcentagem de células fluorescentes consideradas positivas. **(B)** Os *dotplots* representativos mostram a fluorescência de NF- κ B; p65 (PE, eixo X) em função do tamanho da célula (FSC–Forward Scatter, eixo Y) para diferentes grupos experimentais. **(C)** Os resultados obtidos por citometria de fluxo são apresentados graficamente. Os dados são representados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) em triplicata. ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Letras diferentes (a, b) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

Fonte: elaborado pela autora

5.6 Efeito do AMTAC-19 sobre o estado redox celular

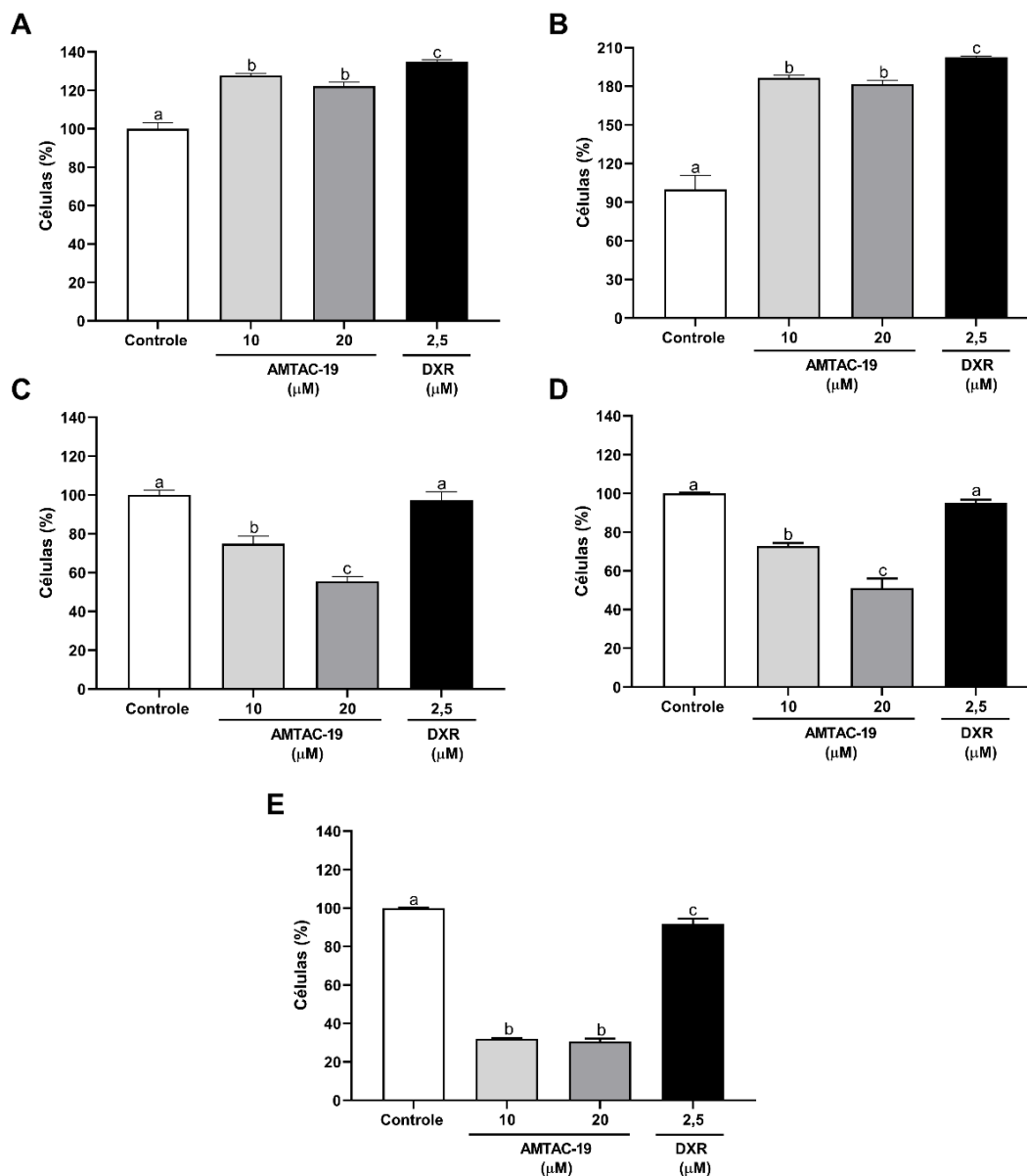
5.6.1 Avaliação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) utilizando o 2'7-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA)

O tratamento com AMTAC-19 induziu um aumento significativo na porcentagem de células fluorescentes após 30 min (10 μ M: $127,70 \pm 1,12\%$; 20 μ M: $122,15 \pm 2,21\%$, $p < 0,05$ para ambos) e 1 h (10 μ M: $186,65 \pm 1,91\%$; 20 μ M: $181,59 \pm 3,11\%$, $p < 0,05$ para ambos) em comparação com o grupo controle (30 min: $100,00 \pm 3,22\%$; 1 h: $100,00 \pm 10,92\%$) (Figura 26 A, B). A partir de 6 h após o tratamento

com AMTAC-19, observou-se redução significativa do percentual de células fluorescentes (6 h: 10 μ M: $74,87 \pm 3,92\%$; 20 μ M: $55,49 \pm 2,54\%$, 12 h: 10 μ M: $72,73 \pm 1,70\%$; 20 μ M: $51,13 \pm 4,95\%$ e 24 h: 10 μ M: $32,11 \pm 0,42\%$; 20 μ M: $30,56 \pm 1,61\%$, $p < 0,05$ para todos) quando comparado ao grupo controle (6 h: $100,00 \pm 2,62\%$; 12 h: $100,00 \pm 0,30\%$ e 24 h: $100,00 \pm 0,21\%$) (Figura 26 C–E).

O fármaco DXR, induziu aumento significativo na porcentagem de células fluorescentes após 30 min ($134,98 \pm 0,84\%$, $p < 0,05$) e 1 h ($202,76 \pm 0,93\%$, $p < 0,05$) de tratamento em comparação ao grupo controle (Figura A, B). Além disso, uma redução significativa na porcentagem de células fluorescentes foi observada após 24 h de tratamento com este fármaco ($91,65 \pm 2,97\%$, $p < 0,05$) em comparação ao grupo controle (Figura 26 E).

Figura 26. Percentual de células fluorescentes após incubação com o 2'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) e o AMTAC-19 (10 ou 20 μM) ou doxorubicina (DXR, 2,5 μM) em diferentes tempos de tratamento



Legenda: Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) em células HCT-116 tratadas com AMTAC-19 (10 ou 20 μM) ou doxorubicina (DXR) (2,5 μM) após (A) 30 min, (B) 1 h, (C) 6 h, (D) 12 h e (E) 24 h de tratamento. Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) em triplicata. ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Letras diferentes (a, b, c) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

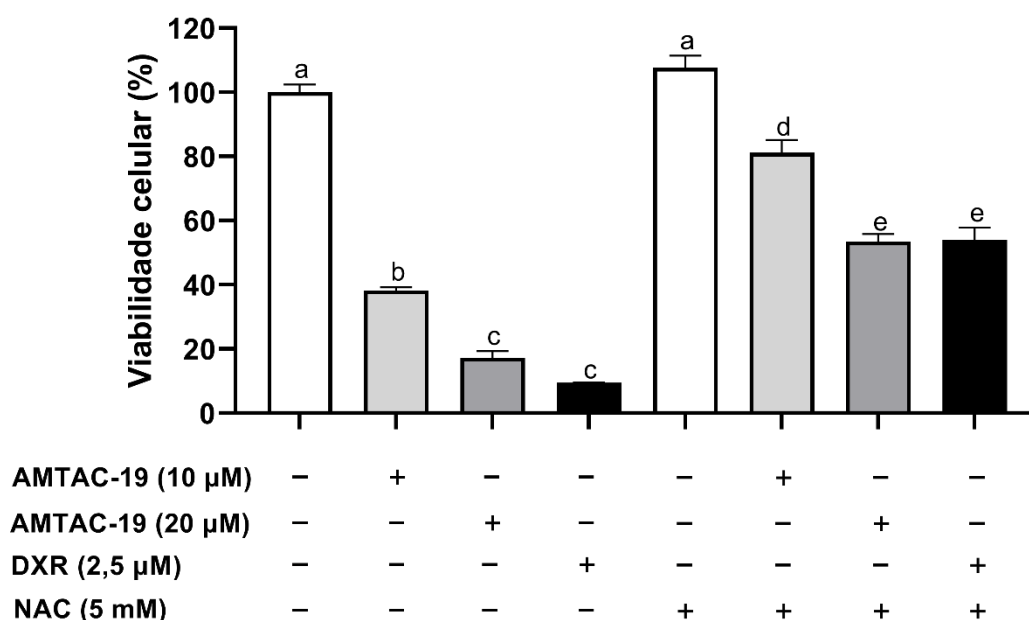
Fonte: elaborado pela autora

5.6.2 Citotoxicidade do AMTAC-19 na presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC)

Conforme mostrado na Figura 27, o tratamento com AMTAC-19 (10 ou 20 μM) na ausência de N-acetilcisteína (NAC, 5 mM) reduziu significativamente a viabilidade celular (10 μM : $38,21 \pm 1,04\%$; 20 μM : $17,29 \pm 2,06\%$, $p < 0,05$ para ambos) em comparação ao grupo controle ($100,00 \pm 2,48\%$). O pré-tratamento com NAC preveniu significativamente o efeito citotóxico do AMTAC-19 (viabilidade celular - 10 μM : $81,14 \pm 3,96\%$; 20 μM : $53,40 \pm 2,48\%$, $p < 0,05$ para ambos) em comparação aos grupos tratados com AMTAC-19 (10 ou 20 μM) na ausência de NAC.

Além disso, o pré-tratamento com NAC induziu uma redução significativa na citotoxicidade da DXR ($9,42 \pm 0,17\%$, $p < 0,05$) em comparação ao grupo tratado com DXR na ausência de NAC ($54,09 \pm 3,75\%$) (Figura 27).

Figura 27. Citotoxicidade do AMTAC-19 (10 ou 20 μM) ou doxorrubicina (DXR, 2,5 μM) na presença ou ausência N-acetilcisteína (NAC, 5 mM) após 72 h de tratamento



Legenda: O ensaio MTT foi usado para avaliar a viabilidade celular após tratamento com AMTAC-19 (10 ou 20 μM) ou doxorrubicina (DXR) (2,5 μM) na presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC, 5 mM) por 72 h. Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) em triplicata. ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Letras diferentes (a, b, c, d, e) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

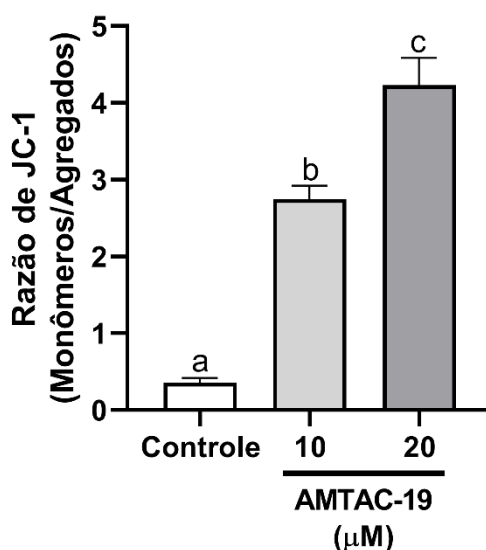
Fonte: elaborado pela autora

5.7 Morte celular induzida pelo AMTAC-19

5.7.1 Efeito do AMTAC-19 sobre a despolarização mitocondrial após marcação com JC-1

O ensaio com o corante JC-1 em células HCT-116 permitiu avaliar a integridade mitocondrial após o tratamento com AMTAC-19 (10 ou 20 μM) por 48 horas. O composto induziu alteração significativa do potencial de membrana mitocondrial (10 μM : $2,75 \pm 0,17$; 20 μM : $4,23 \pm 0,36$, $p < 0,05$ para ambos) em comparação ao grupo controle ($0,36 \pm 0,06$). Esse efeito foi evidenciado pelo aumento da razão da fluorescência verde/vermelho (monômeros/agregados) que é indicativo de despolarização da membrana mitocondrial proporcional ao potencial da membrana mitocondrial (Figura 28).

Figura 28. Efeito do AMTAC-19 (10 ou 20 μM) na despolarização mitocondrial de células de carcinoma colorretal (HCT-116) após 48 h de tratamento



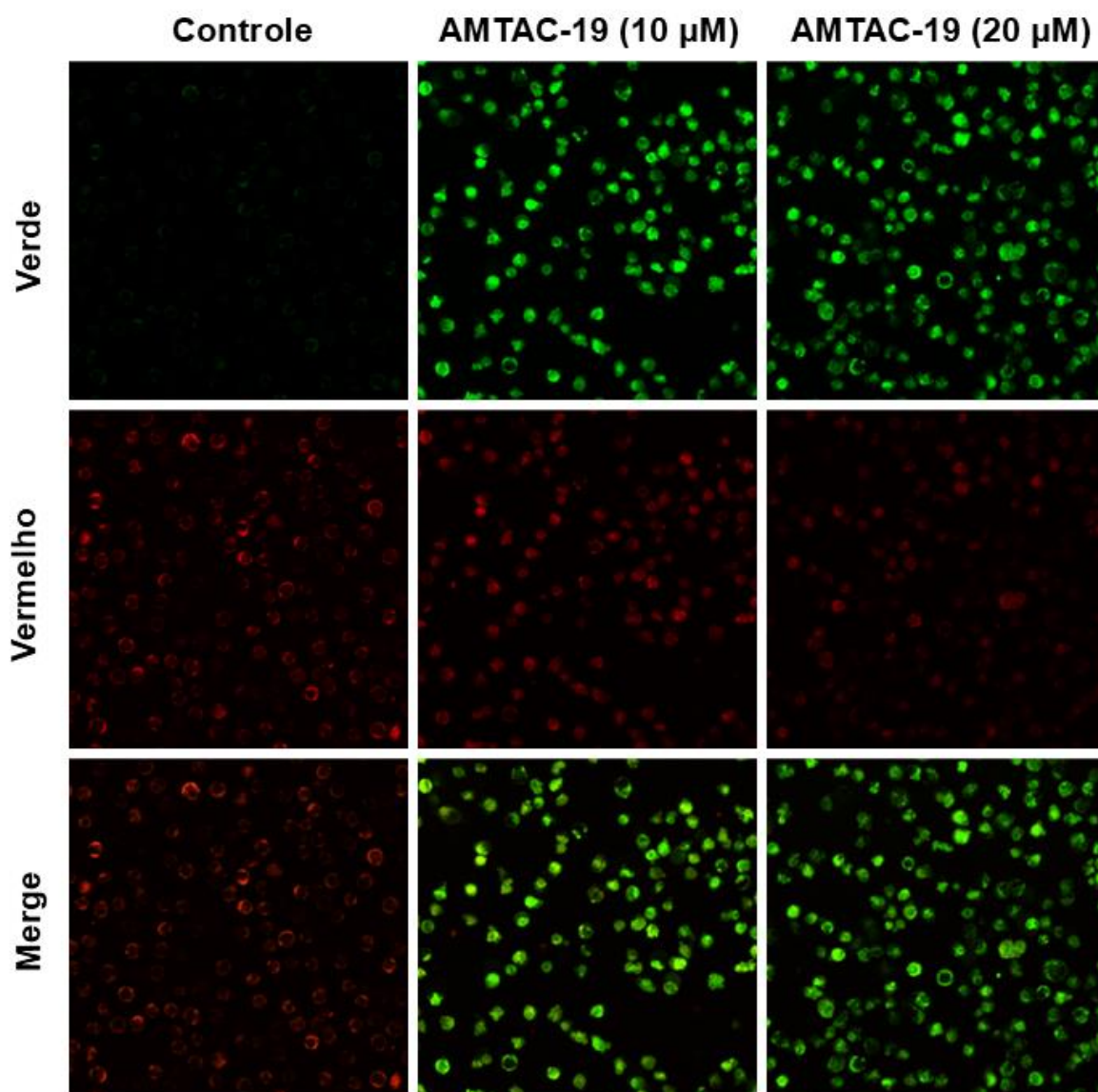
Legenda: Gráfico da razão de JC-1 (monômeros/agregados) após tratamento com AMTAC-19 (10 ou 20 μM) por 48 h. A despolarização mitocondrial foi avaliada por coloração com JC-1, sendo o aumento da razão fluorescência verde/vermelha indicativo de despolarização. Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) em triplicata. Análise de Variância (ANOVA) one-way seguido do teste de Tukey. Letras diferentes (a, b, c) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

Fonte: elaborado pela autora

A figura 29 apresenta imagens representativas das células dos diferentes grupos experimentais obtidas por microscopia confocal, que confirmaram um aumento

na intensidade dessa fluorescência em células tratadas com AMTAC-19, corroborando a indução de despolarização mitocondrial pelo composto.

Figura 29. Imagens representativas da avaliação da despolarização mitocondrial por coloração do cloreto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbo-cianina (JC-1) em células de carcinoma colorretal (HCT-116) incubadas com AMTAC-19 (10 ou 20 μ M)



Legenda: Fotomicrografias representativas de células HCT-116 coradas com JC-1 após 48 horas de tratamento com AMTAC-19 (10 ou 20 μ M). A fluorescência verde indica mitocôndrias com perda de potencial de membrana, evidenciando despolarização mitocondrial, enquanto a fluorescência vermelha corresponde a mitocôndrias com potencial de membrana preservado. As imagens foram capturadas por microscopia confocal.

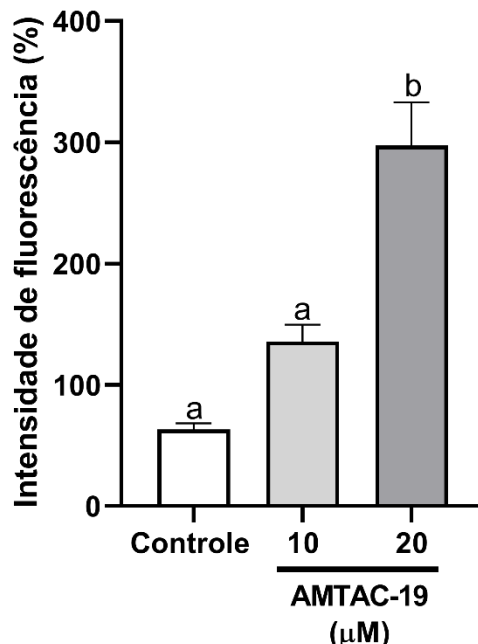
Fonte: elaborado pela autora

5.7.2 Efeito do AMTAC-19 sobre a morfologia de células HCT-116 após coloração com Hoechst 34580 por microscopia confocal

A indução de apoptose pelo composto AMTAC-19 foi avaliada utilizando a coloração com Hoechst 34580 em células de carcinoma colorretal humano HCT-116 após 48 horas de tratamento. As células foram expostas a AMTAC-19 nas concentrações de 10 ou 20 μM e analisadas por microscopia confocal.

Os resultados demonstraram um aumento significativo na intensidade de fluorescência nas células tratadas com AMTAC-19 (10 μM : $135,5 \pm 13,96\%$; 20 μM : $297,5 \pm 35,60\%$, $p < 0,05$ para ambos) em comparação ao grupo controle ($63,36 \pm 4,87\%$) (Figura 30). Esses dados indicam que o aumento na intensidade de fluorescência reflete o efeito do composto sobre a condensação da cromatina e a fragmentação nuclear, alterações características do processo de apoptose.

Figura 30. Indução de apoptose pelo AMTAC-19 (10 ou 20 μM) analisada por coloração com Hoechst 34580 em células de carcinoma colorretal humano HCT-116 após 48 h de tratamento

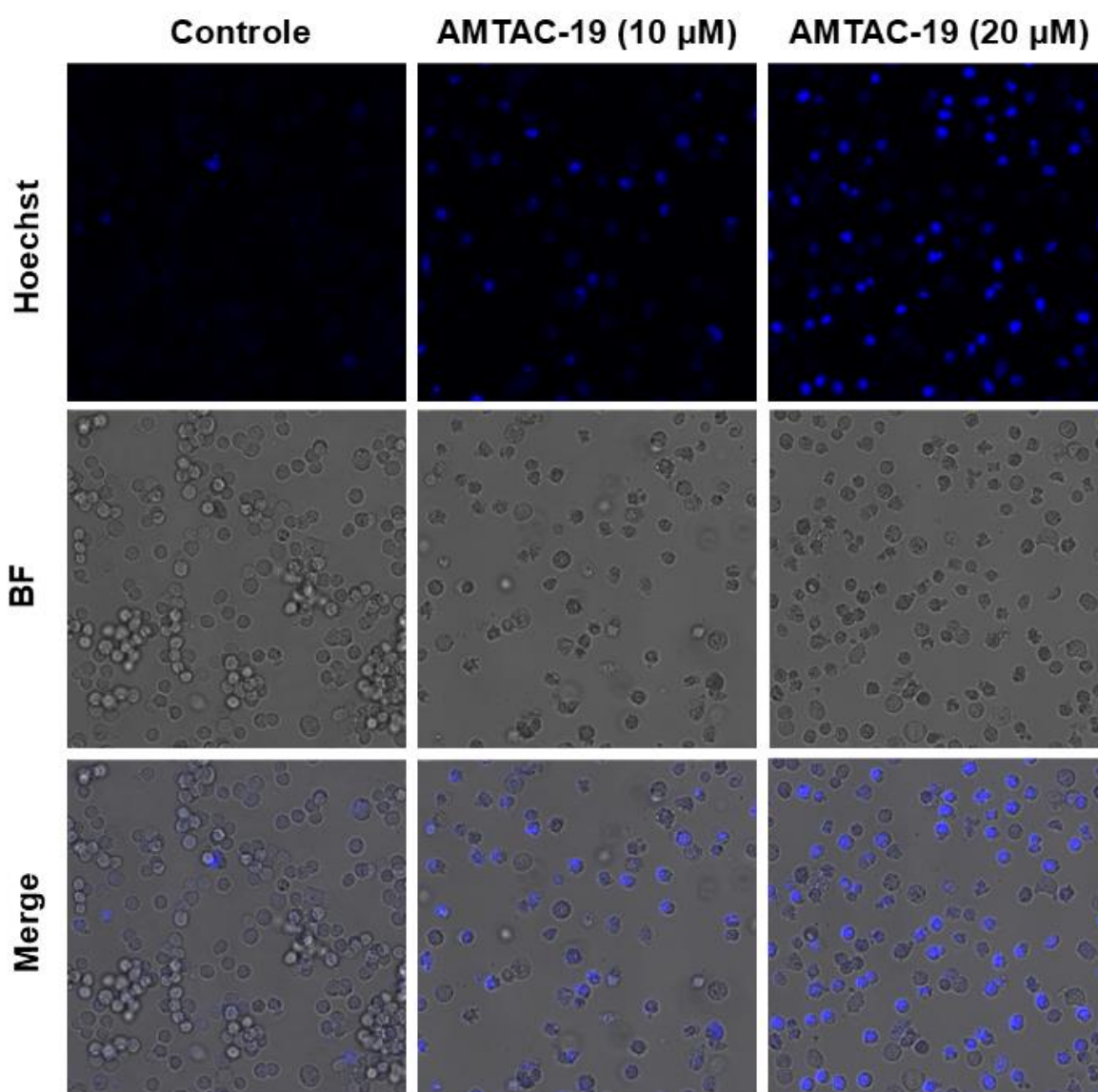


Legenda: Percentual de células marcadas com Hoechst 34580 após tratamento com AMTAC-19 (10 ou 20 μM) por 48 h. Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) em triplicata. Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguido do teste de Dunnett. Letras diferentes (a, b) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

Fonte: elaborado pela autora

A Figura 31 apresenta imagens representativas dos diferentes grupos experimentais corados com Hoechst 34580. A condensação da cromatina observada evidencia a indução de apoptose nas células tratadas com AMTAC-19.

Figura 31. Imagens representativas da avaliação da apoptose por coloração com Hoechst 34580 em células de carcinoma colorretal humano HCT-116 incubadas com AMTAC-19 (10 ou 20 μ M) por 48 h



Legenda: Fotomicrografias de células HCT-116 coradas com Hoechst 34580 após 48 h de tratamento com AMTAC-19 (10 ou 20 μ M). A coloração intensa indica condensação de cromatina e fragmentação nuclear, características de apoptose.

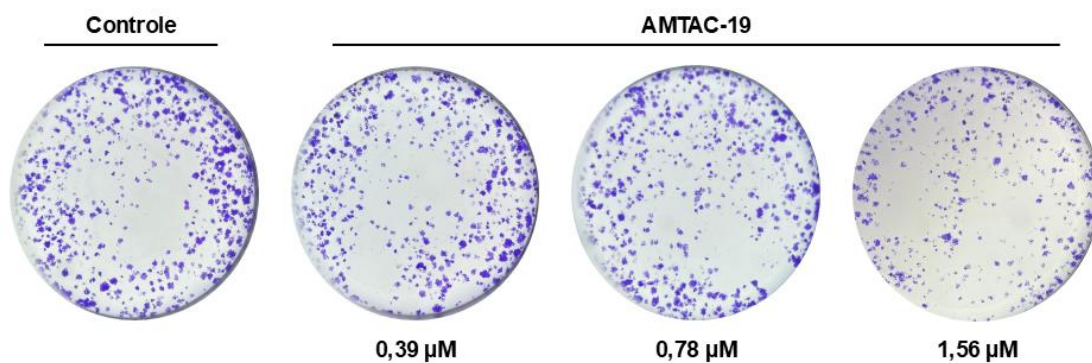
Fonte: elaborado pela autora

5.9 Efeito do AMTAC-19 na sobrevivência de células HCT-116 através do ensaio clonogênico

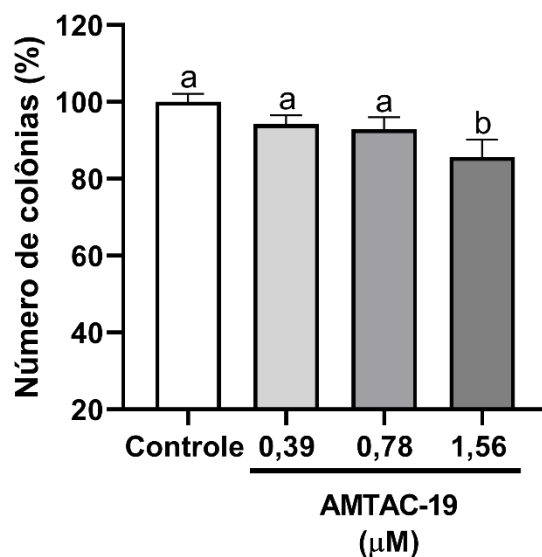
Para realizar o ensaio de formação de colônias foram escolhidas três concentrações não citotóxicas, determinadas a partir da curva do cálculo da IC₅₀ (200 – 3,12 µM). Este ensaio permitiu avaliar o efeito inibidor do tratamento com AMTAC-19 sobre a capacidade de formação de colônias e sobrevivência de células HCT-116. O tratamento foi realizado com concentrações não citotóxicas de 0,39, 0,78 e 1,56 µM do AMTAC-19, e as células foram incubadas por um período de 48 horas. Os resultados obtidos para a linhagem HCT-116, mostraram que o AMTAC-19 (1,56 µM: 85,59 ± 4,65%, $p < 0,05$) reduziu significativamente a formação de colônias nessa concentração, quando comparado ao grupo controle (100,00 ± 2,09%). Por outro lado, não foram observados efeitos significativos nas concentrações de 0,39 µM (94,18 ± 2,35%, $p < 0,05$) e 0,78 µM (92,85 ± 3,15%, $p < 0,05$) em comparação com o grupo controle, demonstrando que o composto nestas concentrações não interferiu na sobrevivência das células HCT-116 (Figura 32).

Figura 32. Ensaio de formação de colônias em células de carcinoma colorretal humano HCT-116 após o tratamento com AMTAC-19 (0,39, 0,78 ou 1,56 μM)

A



B



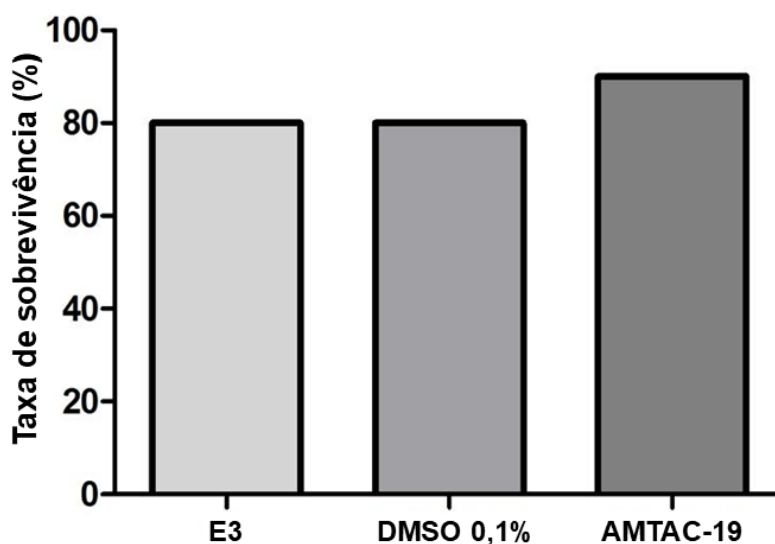
Legenda: (A) Imagens representativas do ensaio de formação de colônias em células de carcinoma colorretal humano HCT-116 após o tratamento com o AMTAC-19. Em (B) a respectiva análise quantitativa do percentual de colônias formado nas concentrações testadas de 0,39, 0,78 e 1,56 μM . Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) em triplicata, analisados por Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Letras diferentes (a, b) indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

Fonte: elaborado pela autora

5.9 Avaliação da toxicidade aguda em embriões e larvas de peixe-zebra

A taxa de sobrevivência de embriões e larvas de peixe-zebra após exposição a 100 μM de AMTAC-19 por 96 h foi de 90%, enquanto para o meio E3 (controle interno) e os grupos controle DMSO a 0,1% (controle de solvente) esse número foi de 80% para ambos (Figura 33). O único efeito letal observado em todos os tratamentos foi a falta de batimentos cardíacos. Nenhum outro desfecho de letalidade (coagulação do ovo, falta de formação de somitos e não desprendimento do broto da cauda) ou quaisquer alterações morfológicas (efeitos não letais) nos embriões e larvas expostos ao AMTAC-19 ou controles foram observados durante 96 h de exposição (Figura 34). Diante do exposto, é possível afirmar que a CL_{50} (concentração letal mediana) para 96 h de exposição de embriões/larvas de peixe-zebra ao AMTAC-19 é maior que 100 μM .

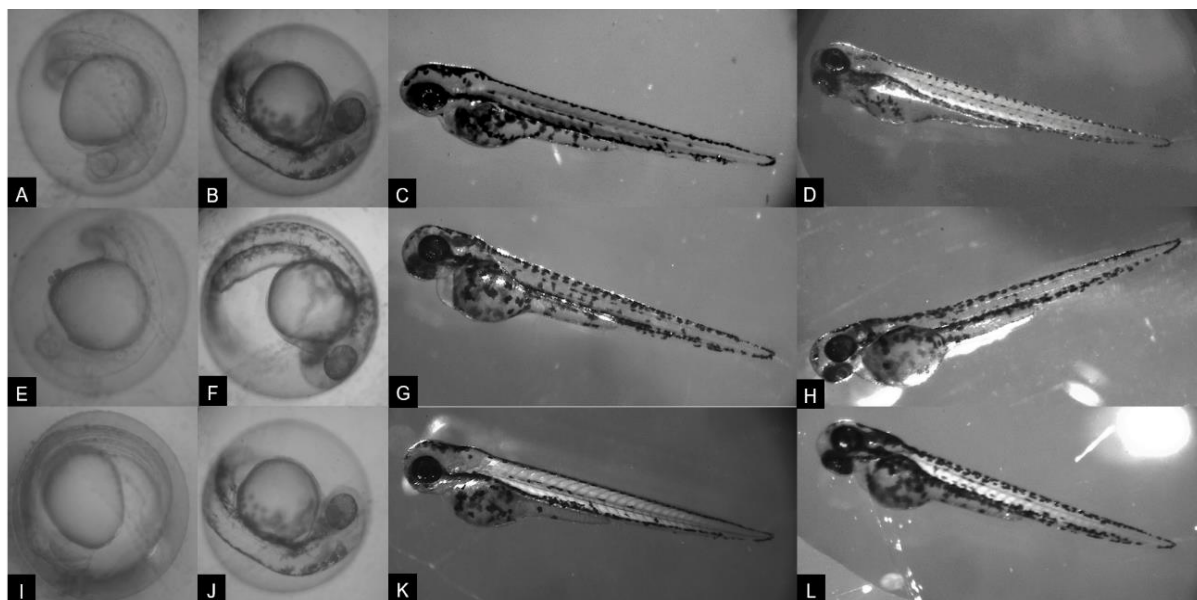
Figura 33. Taxas de sobrevivência de embriões e larvas de peixe-zebra expostos a 100 μM de AMTAC-19 ou amostras de controle (meio E3 e DMSO 0,1%) após 96 h



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/ou (iv) falta de batimentos cardíacos, de acordo com a recomendações do teste FET nº 236 (OECD, 2013).

Fonte: elaborado pela autora

Figura 34. Imagens representativas de embriões e larvas de peixe-zebra após a exposição a AMTAC-19 (100 μ M) ou DMSO (0,1%) e controle de meio E3, durante 96 h



Legenda: Organismos com desenvolvimento normal expostos ao meio E3 (A-D), DMSO 0,1% (E-H) e AMTAC-19 (I-L) após 24 (A, E, I), 48 (B, F, J), 72 (C, G, K) e 96 (D, H, L) horas.

Fonte: elaborado pela autor

Discussão

6 DISCUSSÃO

O câncer colorretal (CCR) tem uma incidência global significativa e é responsável por altas taxas de mortalidade por câncer (KHAN, 2018). Como resultado, a busca por novas alternativas terapêuticas permanece incessante (KHAN, 2018; VASAN; BASELGA; HYMAN, 2019). Neste contexto, os compostos de espiro-acridina surgiram como candidatos promissores, sendo extensivamente investigados por seu potencial na terapia antitumoral (DUARTE et al., 2020a; SILVA et al., 2019c).

O derivado espiro-acridina (*E*)-1'-((4-bromobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-diidro-10*H*-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-19) foi previamente sintetizado e demonstrou citotoxicidade significativa na linhagem de células de câncer colorretal HCT-116 (metade da concentração inibitória média, $CI_{50} = 10,35 \pm 1,66 \mu M$) por meio de parada do ciclo celular, de alteração do estado redox celular e de indução de apoptose (DE SOUSA et al., 2024). Para a melhor caracterização do efeito anti-CCR do AMTAC-19, no presente estudo foram realizados ensaios de modelagem molecular e testes *in vitro* utilizando a linhagem de células tumorais humanas HCT-116. Em adição, também foram realizados ensaios de toxicidade não clínica em embriões e larvas de peixe-zebra (*Danio rerio*).

Para os ensaios *in vitro*, foi utilizada como droga padrão a doxorrubicina (DXR). A DXR, conhecida como adriamicina, derivada do *Streptomyces peucetius*, considerada o principal agente antitumoral da classe das antraciclinas (KCIUK et al., 2023; SRITHARAN; SIVALINGAM, 2021), usada amplamente no tratamento de diferentes tipos de cânceres, como mama (ZENG et al., 2023), ovário (S. et al., 2022), sarcomas (LIU et al., 2022), cérebro (ALHOWAIL et al., 2019), colorretal (EMAMI et al., 2019), melanoma (VENDRAMIN et al., 2021), leucemia (GHELLI LUSERNA DI RORÀ et al., 2023) e linfoma (PICARDI et al., 2022). Esse fármaco induz morte celular por diferentes mecanismos intracelulares, como a inibição da topoisomerase II (BUKOWSKI; KCIUK; KONTEK, 2020), a liberação do citocromo c pela mitocôndria, a intercalação no DNA, o aumento da alquilação e a geração de radicais livres que culminam em estresse oxidativo (PETER et al., 2022). Adicionalmente, a DXR pode atuar na modulação da atividade de proteínas sinalizadoras pertencentes as vias de sinalização envolvidas no seu efeito antitumoral, incluindo as Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs) (CHEN et al., 2018;

WEI; XIAOJUN; PEILONG, 2020; ZHANG et al., 2021c), do Fator Nuclear kappa B (NF- κ B) (STRZESZEWSKA et al., 2018) e da Proteína Cinase B (PKB/AKT) (GHANEM et al., 2020) e Proteína linfoma/leucemia de células B-2 (BCL-2) (VU et al., 2020). Neste contexto, a DXR tem sido utilizada como controle em vários estudos por induzir apoptose associada ao efeito anticâncer (BOJKO et al., 2019; YANG et al., 2019b; ZHU; LIN, 2020).

Como mencionado, o AMTAC-19 induz citotoxicidade de células HCT-116 por meio da indução da apoptose (DE SOUSA et al., 2024). De fato, este é um dos principais mecanismos antitumorais pelos quais os derivados da acridina atuam (BOROWA-MAZGAJ et al., 2017; CHEN et al., 2019; FU et al., 2017; GIREK et al., 2019; ZHANG et al., 2019a). A apoptose é uma forma de morte celular programada essencial para a manutenção da homeostase celular. Esse processo envolve duas vias de sinalização, conhecidas como via intrínseca e via extrínseca (BALAJI et al., 2021; KUROWSKA; MLYCZYNSKA; RAK, 2019), ambas podendo ser ativadas por estímulos como estresse oxidativo (DE et al., 2019; REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016). No câncer, a apoptose é uma estratégia terapêutica fundamental dos principais mecanismos de ação de agentes anticâncer, que induzem alterações no DNA, ativam moléculas pró-apoptóticas e promovem a morte celular. Neste cenário, a investigação da apoptose é essencial na descoberta de novas drogas antitumorais (CUI et al., 2018; REN et al., 2017; SUN et al., 2018).

Diante disto e, sabendo que este processo de morte celular pode ser mediado por uma variedade de proteínas, como as MAPKs, o NF- κ B, a PKB/AKT e a BCL-2, realizou-se ensaios de modelagem molecular entre o AMTAC-19 e as estruturas cristalográficas dessas proteínas.

O *docking* molecular é uma técnica computacional que permite prever a interação e a energia de ligação entre moléculas e um alvo proteico específico. Essa ferramenta possibilita identificar, entre diferentes moléculas, aquela com maior afinidade pelo alvo (PINZI; RASTELLI, 2019). Na pesquisa por novas drogas, essa metodologia se destaca como um recurso importante para realizar triagens virtuais e investigar possíveis interações entre novos compostos e alvos moleculares expressos em diferentes doenças, como o câncer (CAVA; CASTIGLIONI, 2020), o que contribui para o desenvolvimento de novos medicamentos.

As MAPKs, dentre elas as Proteínas Cinase Reguladas por Sinal Extracelular (ERK), as Proteínas Cinase N-terminal de c-Jun (JNK) e as Proteínas Cinase Ativadas

por Mitógenos p38 (MAPK p38), têm sido amplamente investigadas como alvos para ação de potenciais fármacos antitumorais (ABDELRAHMAN et al., 2021; BRAICU et al., 2019; LEE; RAUCH; KOLCH, 2020a) por estarem envolvidas em diversos processos biológicos, como proliferação celular, diferenciação, sobrevivência, inflamação e apoptose (WEI et al., 2021). Estas enzimas exercem seus efeitos biológicos por meio da fosforilação de alvos proteicos (LEE; RAUCH; KOLCH, 2020a), promovendo, por exemplo, aumento de proteínas pró ou anti-apoptóticas (SUGIURA; SATOH; TAKASAKI, 2021; YUE; LÓPEZ, 2020a) característicos do papel dual destas proteínas no câncer (JENKINS et al., 2021; MARTÍNEZ-LIMÓN et al., 2020; YUAN et al., 2020).

As ERK, tendo como isoformas clássicas ERK1 e ERK2, desempenham um papel crucial na cascata de sinalização, transmitindo sinais extracelulares para seus alvos intracelulares em resposta a estímulos estressores (GUO, YAN-JUN et al., 2020; MAIK-RACHLINE; HACHOEN-LEV-RAN; SEGER, 2019). No câncer, tem sido observado o papel dual dessas proteínas (GONG et al., 2018; GUO et al., 2021; SU et al., 2022). Neste contexto, investigou-se as possíveis interações moleculares entre AMTAC-19 e a proteína ERK1. Os resultados do estudo *in silico* mostraram uma interação favorável entre AMTAC-19 e esta proteína por meio de resíduos de aminoácidos que também estão envolvidos no acoplamento do inibidor carbamato de piridina (Ligante do *Protein Data Bank* - PDB) ou da DXR (Leu156, Ala52, Ile31, Thr110 e Asp111) a esse alvo. Além disso, AMTAC-19 demonstrou interação com o sítio ativo de ERK1 por meio de Cys166, que é um resíduo crucial para o mecanismo de inibição e regulação da atividade de ERK (SOLOMON; ALMAYAN; LEE, 2017). Conforme relatado por Gao et al. (2022) (GAO et al., 2022), a buxifoliadina E, um composto de acridina, interage com o segmento catalítico da proteína ERK por meio de ligações de hidrogênio entre os resíduos Lys54 e Glu71 e pela interação com Asp167 no segmento KDD da porção catalítica desta enzima. Além disso, Boshta et al. (2024) (BOSHTA et al., 2024) sintetizaram derivados de 1,3,5-trissubstituídos-1H-pirazol, nomeadamente os compostos 6, 7, 10a, 10c e 10d, que exibiram citotoxicidade significativa contra as linhagens celulares humanas de câncer de próstata (PC-3) e de mama (MCF-7). Na análise de *docking* molecular, observou-se que os compostos 6, 10a e 10d, os mais citotóxicos nos ensaios *in vitro*, foram capazes de interagir com a proteína ERK por meio dos resíduos Ala52, Thr110 e Asp111.

A proteína cinase JNK possui três principais isoformas (JNK1, JNK2 e JNK3), codificadas por genes distintos e localizadas em diferentes cromossomos, que desempenham papéis essenciais na regulação da expressão gênica e na resposta a estímulos de estresse celular (MAIK-RACHLINE; WORTZEL; SEGER, 2021; WU et al., 2019). No câncer, a JNK desempenha um papel dual, podendo atuar como um supressor tumoral, ao induzir a apoptose celular, ou como promotora da tumorigênese, ao estimular a liberação de citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento (PETROVA et al., 2018). No microambiente tumoral de tumores sólidos, como no CCR, as baixas concentrações de nutrientes e oxigênio induzem um estado de hipóxia, que é um fator desencadeante para a ativação da via de JNK envolvida nos processos de promoção tumoral (TAM; WU; LAW, 2020). Assim, considerando a JNK como um alvo importante na pesquisa de novos fármacos anti-CCR, analisou-se os possíveis acoplamentos entre o AMTAC-19 e a JNK1.

Foram observadas interações favoráveis entre AMTAC-19 e a proteína alvo por meio de interações hidrofóbicas entre os resíduos de aminoácidos Ile32, Val158, Leu168, Ala53, Met108, Val40 e Lys55, semelhante as interações estabelecidas pela DXR ou pelo inibidor pirazoloquinolona (Ligante do PDB). Além disso, o composto exibiu interações estéricas por meio do resíduo Met108, que são essenciais para a atividade da enzima e responsáveis pelo controle da função catalítica (KURNIAWAN et al., 2021; SUGARA et al., 2021). Malki et al. (2015) obtiveram novos tiossemicarbazidas e 1,3,4-oxadiazóis e avaliaram seus efeitos citotóxicos contra a linhagem celular de câncer mamário humano MCF-7. Entre os compostos testados, 2-(3-(4-clorofenil)-3-hidroxi-butanoil)-N-fenil-hidrazinocarbonotioamida, designado como 4c, apresentou a maior citotoxicidade e, após análise de *docking* molecular, mostrou interações favoráveis com os resíduos Ile32, Leu168 e Val158 de JNK1 (MALKI et al., 2015).

A via p38 MAPK é ativada principalmente por sinais de estresse e estímulos inflamatórios, desempenhando funções cruciais na manutenção da homeostase celular em diversos tecidos, como os sistemas nervoso e cardiovascular, além de estar envolvida em processos relacionados ao câncer (LEE; RAUCH; KOLCH, 2020a). As p38 MAPK são codificadas por genes distintos em 4 isoformas: p38 α , p38 β , p38 γ e p38 δ (KUDARAVALLI; DEN HOLLANDER; MANI, 2022). A p38 α MAPK é amplamente expressa em diversos tipos celulares, enquanto as outras isoformas têm expressão mais restrita a tecidos específicos (MARTÍNEZ-LIMÓN et al., 2020). Por exemplo, a

p38 β MAPK é predominante no cérebro, a p38 γ MAPK é encontrada principalmente em músculos esqueléticos, e a p38 δ MAPK está presente em órgãos como rins, pâncreas, intestino delgado e testículos (GARCÍA-HERNÁNDEZ et al., 2021). As p38 MAPK desempenham um papel duplo, podendo tanto mediar a sobrevivência celular quanto promover a morte celular, dependendo dos mecanismos envolvidos (STEFANI et al., 2021). Com base no potencial da p38 α MAPK no desenvolvimento e na manutenção do câncer colorretal, foram investigadas as possíveis interações moleculares entre o AMTAC-19 e essa isoforma da p38 MAPK.

As interações favoráveis observadas entre a proteína p38 α MAPK e o AMTAC-19 envolveram resíduos de aminoácidos associados ao sítio catalítico desta enzima (interações hidrofóbicas: Val158, Ile116 e Cys119; ligações de hidrogênio: Ala111, Gly110 e Ile116; e interações estéricas: Gln120, Cys119 e Cys162) (PATEL et al., 2004; POUS et al., 2023). Da mesma forma, o resíduo Ile116 está envolvido na interação entre p38 α MAPK e a DXR ou ligante doramapimod (BIRB-796), um inibidor seletivo desta proteína. Kaboli et al. (2019) avaliaram a interação entre berberina, um composto alcaloide estruturalmente semelhante aos agentes intercalantes de DNA, e p38 α MAPK. Esses autores observaram que a berberina interage com p38 α MAPK por meio do resíduo Gly110, que também está envolvido na interação entre o AMTAC-19 e esta enzima (JABBARZADEH KABOLI et al., 2019).

A superativação da ERK1/2 e da JNK é observada no CCR (BEN HAMOUDA; ESSAFI-BENKHADIR, 2023). No entanto, o papel duplo de ERK1/2 e JNK em vários tipos de câncer foi amplamente relatado (YUE; LÓPEZ, 2020b). Assim, a estimulação da atividade dessas cinases pode estar envolvida em efeitos pró-tumorais ou antitumorais, incluindo no CCR (FERREIRA et al., 2023c; XU; HU, 2020). O envolvimento de MAPK na indução da morte de células tumorais foi relatado, o que depende do tipo de célula e do estímulo (CAGNOL; CHAMBARD, 2010). Em células CCR, a ativação de ERK1/2 e JNK está associada à ativação da apoptose (REN et al., 2021; SUGIURA; SATOH; TAKASAKI, 2021; TAKAC et al., 2020; VARGA et al., 2022). Atualmente, vários estímulos têm sido associados a esse efeito indutor de morte de células tumorais mediado pela ativação de ERK1/2 e JNK, que inclui a geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) (D'SOUSA COSTA et al., 2017; MOHEBALI et al., 2020; WANG et al., 2022).

A PKB/AKT é uma cinase serina-treonina que participa de diversas vias celulares essenciais, como sobrevivência, proliferação, invasão, apoptose e

angiogênese (SHARIATI; MERIC-BERNSTAM, 2019). Embora a fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K) seja o principal regulador da ativação de PKB/AKT, diversos estímulos e cinases iniciam a sinalização de PKB/AKT, promovendo o crescimento e a sobrevivência celular (HE et al., 2021). Além de seu papel essencial na fisiologia celular normal, diversos estudos demonstraram a ativação da cascata de PKB/AKT em diferentes tipos de câncer. No CCR, a via PI3K/AKT tem um papel fundamental na indução do processo de transição epitélio-mesenquimal (EMT) durante a progressão do CCR, promovendo a regulação positiva de fatores de transcrição específicos de EMT (MAHARATI; MOGHBELI, 2023), que contribuem para a metástase, e consequentemente resistência aos tratamentos (GALLYAS; SUMEGI; SZABO, 2020). Devido à sua relevância no câncer, a proteína PKB/AKT tem sido considerada um alvo terapêutico promissor para o tratamento dessa doença.

Neste contexto, foram analisadas as interações entre o alvo PKB/AKT e o AMTAC-19, que apresentaram valores significativos de energia de interação e probabilidade, sugerindo um acoplamento favorável. Essa interação envolveu resíduos de aminoácidos (Tyr231, Lys156 e Asp441), que favorece a inibição do alvo proteico. Para o ligante do PDB, o 8-[4-(1-aminociclobutil)fenil]-9-fenil-2H-[1,2,4]triazolo[3,4-f][1,6]naftiridina-3-ona (MK-2206), o encaixe molecular envolveu diferentes resíduos de aminoácidos como Tyr327, Tyr316 e Lys277. De forma semelhante, a DXR também apresentou resíduos específicos de interação com PKB/AKT (Asp293, Asp275, Phe294, Gly295, Asn280, Glu200, Thr199, Arg274), mostrando que cada composto tem resíduos críticos distintos com a proteína alvo. Não foram encontrados dados de *docking* molecular relacionados à interação entre derivados acridínicos ou compostos estruturalmente semelhantes ao AMTAC-19 e a PKB/AKT. No entanto, análises *in silico* dessa interação estão disponíveis para outras classes de compostos.

Danni Ramdhani e Resmi Mustarichie (2021) realizaram um estudo *in silico* com Brevilin A, um composto ativo com estrutura de sesquiterpenos de lactona derivado da *Centipeda minima* (Asteraceae) e a proteína PKB/AKT. Na análise de acoplamento molecular entre Brevilin A e o alvo proteico foram observadas interações de hidrogênio favoráveis associadas ao resíduo de aminoácido Lys156, que inferem na sua atividade anticâncer, semelhante a interação entre a proteína PKB/AKT e o AMTAC-19 (RAMDHANI; MUSTARICHIE, 2021).

O NF- κ B é um fator de transcrição nuclear que está envolvido em diversas funções biológicas, incluindo proliferação celular, diferenciação, metástase, resposta imune e apoptose (PFLUG; SITCHERAN, 2020; ZHANG; LENARDO; BALTIMORE, 2017). A família de proteínas do NF- κ B podem ser formadas por homodímeros ou heterodímeros, sendo o p50/p65 o principal heterodímero responsável pela transcrição genética (ZHANG et al., 2021b). A via de sinalização do NF- κ B tem sido associada ao desenvolvimento de colite e câncer colorretal associado à colite, através da ativação da via não canônica, que desencadeia o processo de inflamação do cólon (ALLEN et al., 2012; WU et al., 2024). Diante disso, analisamos as possíveis previsões de acoplamento entre o AMTAC-19 e o heterodímero p50/p65. Foram observadas interações favoráveis entre o AMTAC-19 e o alvo, atreladas aos resíduos de aminoácidos Arg187 e Arg33. Além disso, o AMTAC-19, a DXR e o ligante 4-metil-N1-(3-fenilpropil)benzeno-1,2- diamina (JSH-23), utilizado em nosso estudo como molécula padrão de interação com o NF- κ B (p50/p65), exibiram interações hidrofóbicas por meio do resíduo Lys218, que é essencial para a atividade da enzima e responsável pelo controle da função catalítica. Não foram identificados dados de *docking* molecular envolvendo a interação entre derivados acridínicos ou compostos estruturalmente relacionados ao AMTAC-19 e a NF- κ B (p50/p65). No entanto, estão disponíveis resultados de análises *in silico* dessa interação para outros compostos.

Na pesquisa de Fontana e colaboradores (2022), foi realizada a síntese de derivados do lupeol, um triterpeno, denominados de compostos 9 e 11, que exibiram citotoxicidade significativa nas linhagens de células humanas de leucemia (HL60) e de leucemia multirresistente (HL60R). Na análise de *docking* molecular, observou-se que o composto 11 apresentou maior capacidade de interagir com a subunidade p65 do NF- κ B, por meio dos resíduos Arg187 e Lys218, enquanto o composto 9 interagiu com os resíduos Arg33 e Arg187. Ambas moléculas foram capazes de modificar a via molecular do NF- κ B, impedindo sua ativação e tornando as células mais sensíveis aos medicamentos quimioterápicos padrão (FONTANA et al., 2022). Além disso, Subaiea et al. (2023) avaliaram a interação entre a combinação do ganetespib (GAN) (inibidor de hsp90) e o metotrexato (MTX) (inibidor da enzima diidrofolato redutase) com o NF- κ B. Esses autores observaram que o composto GAN interage com o NF- κ B por meio do resíduo Arg187, e o MTX com os resíduos Lys218 e Arg187, e que a associação destes compostos favorece o encaixe molecular com o alvo, induzindo o efeito de

inibição da via de sinalização do NF- κ B em linhagem de células de adenocarcinoma pulmonar humano (A549) (SUBAIEA et al., 2023).

As proteínas da família BCL-2 têm um papel fundamental na regulação da apoptose, desempenhando funções tanto pró-apoptóticas quanto antiapoptóticas (CAMPBELL; TAIT, 2018). A superexpressão ou ativação anormal de proteínas antiapoptóticas dessa família, como BCL-2, MCL-1 e BCL-XL, combinada à redução da expressão de membros pró-apoptóticos, é frequentemente observada em casos de linfomas e leucemias (ZHANG et al., 2017), gliomas (RAHMAN et al., 2020), câncer de mama (BESSOU et al., 2020), mieloma múltiplo humano (MM) (PARRONDO; PAULUS; AILAWADHI, 2022), melanoma (LUCIANÒ et al., 2021) e câncer colorretal (SCHERR et al., 2020). Essa alteração está diretamente relacionada à sobrevivência e proliferação de células cancerosas, além de contribuir para a resistência aos tratamentos disponíveis. Assim, o desenvolvimento de inibidores seletivos que sejam eficazes contra células tumorais e apresentem baixa toxicidade em células normais continua sendo um desafio significativo (ZHANG; LU; ZHAO, 2021).

Neste cenário, avaliou-se as possíveis interações moleculares entre o AMTAC-19 e a proteína BCL-2. Em relação ao acoplamento entre AMTAC-19 e a BCL-2, foi possível observar que houve interação favorável entre o alvo e o ligante, destacando o envolvimento do resíduo de aminoácido Leu96, que também está presente na interação entre o alvo e a DXR, e o ligante do PDB, o inibidor fenil tetrahydroisoquinolina. Não foram encontrados dados de *docking* molecular relacionados à interação entre derivados acridínicos ou compostos estruturalmente semelhantes ao AMTAC-19 e a BCL-2. Contudo, há resultados disponíveis de estudos *in silico* envolvendo essa interação para outros compostos.

Ibrahim et al. (2019) avaliaram a interação entre apigenina, um composto alcaloide derivado da *Matricaria chamomilla* (Asteraceae) e a proteína BCL-2. Esses autores observaram que a apigenina interage com BCL-2 por meio do resíduo Leu96, que também está envolvido na ligação entre o AMTAC-19 e esta enzima (IBRAHIM et al., 2022). Além disso, Kumar e colaboradores (2015) investigaram diferentes compostos fitoquímicos e o seu potencial antitumoral *in silico* associados à interação com as proteínas BCL-2. Foi observado acoplamento molecular favorável entre o composto gingerdione, derivado de *Zingiber officinale* (Zingiberaceae) e a proteína BCL-2 por meio de interações hidrofóbicas com o resíduo de aminoácido Leu96 presente no sítio de ligação da proteína alvo (Mala et al., 2015).

Hamdy e colaboradores (2017), na busca por sintetizar potenciais agentes anticâncer inibidores pró-apoptóticos de BCL-2, projetaram uma série de 5-(1*H*-indol-3-il)-*N*-aril-1,3,4-oxadiazol-2-aminas (8a-j). No estudo *in silico*, os compostos 8a e 8e apresentaram afinidade de interação com a proteína BCL-2 semelhante ao inibidor BCL-2 com atividade antitumoral conhecida, gossipol. Essa atividade está associada ao encaixe molecular dos compostos 8a e 8e com o sítio de ligação hidrofóbico de BCL-2 por meio de interações importantes entre o resíduo Leu96 e o grupo amina extracelular (NH) presentes no sítio de ligação da proteína alvo, sendo estes compostos candidatos para desenvolvimento de novos agentes inibidores de BCL-2 (HAMDY et al., 2017).

Nossos resultados de *docking* molecular sugerem que as proteínas investigadas são alvos moleculares potenciais para o efeito anti-CCR do AMTAC-19. Nesse sentido, conduzimos testes *in vitro* para confirmar o envolvimento de ERK1/2, JNK, p38 MAPK, PKB/AKT, NF-κB e BCL-2 na atividade antitumoral desse composto espiro-acridínico.

A marcação de células HCT-116 com anticorpos anti-p-ERK1/2 e anti-p-JNK1 revela que o tratamento com AMTAC-19 induz a ativação dessas enzimas. Apoiando o papel de ERK1/2 e JNK1 na citotoxicidade de AMTAC-19, o pré-tratamento com inibidores de ERK1/2 (U0126) e JNK (SP600125) preveniu parcialmente o efeito antiproliferativo de AMTAC-19. Esta descoberta corrobora o efeito antitumoral do derivado de acridina benzimidazol *N*-{(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)metil}-2-butilacridin-9-amina (8m), que induziu apoptose mediada por ativação de JNK em células HCT-116 (CHEN et al., 2015). Da mesma forma, a bruceína D, um composto quassinoide, induz apoptose e autofagia em linhagens de células de câncer de pulmão humano (A549 e NCI-H292), mediadas pela geração de ROS e ativação de ERK e JNK (FAN et al., 2020). Adicionalmente, Takac e colaboradores (2018) mostraram que a chalcona, (2*E*)-3-(acridin-9-il)-1-(2,6 dimetoxifenil)prop-2-en-1-ona (1C) induziu aumento na produção das ROS, promovendo disfunção mitocondrial, danos ao DNA e apoptose de células HCT-116, por meio da ativação das vias de sinalização das MAPK (TAKAC et al., 2018). Portanto, nossos resultados demonstram que a ativação das proteínas ERK1/2 e JNK1 está envolvida no efeito antitumoral *in vitro* induzido por AMTAC-19.

Por outro lado, o uso de anticorpos anti-p-p38 MAPK e o pré-tratamento com o inibidor p38 MAPK (PD 169316) revelaram que não há envolvimento de p38 MAPK no efeito anti-CCR do AMTAC-19 em células HCT-116.

Prosseguindo com a elucidação do mecanismo antitumoral *in vitro* do AMTAC-19, investigou-se as vias de sinalização das proteínas BCL-2, PKB/AKT e NF- κ B em células HCT-116. A redução significativa na marcação das células HCT-116 com os anticorpos anti-p-BCL-2 sugere que o AMTAC-19 induz efeito antitumoral por inibir a ativação das proteínas antiapoptóticas BCL-2, favorecendo a indução de senescência e a morte celular. Corroborando com esse resultado, a pesquisa realizada por Solomon e colaboradores (2017) sintetizaram 23 novos compostos híbridos (6-28), análogos da quinacrina, formados pela união estrutural do anel de 9-aminoacridina com o sistema de anel de tiazolidina-4-ona, com a finalidade de obter compostos com potencial efeito anticâncer. O composto 11 (VR118) induziu apoptose em linhagens de células de câncer de mama metastático triplo-negativo humano (MDA-MB231) ao regular negativamente a proteína antiapoptótica BCL-2 e regular positivamente as proteínas pró-apoptóticas Bax e Bad (SOLOMON; ALMNAYAN; LEE, 2017). Adicionalmente, o composto 4t-CHQ (*N*-(4-terc-butil-4'-oxo-1'*H*-espiro[ciclohexano-1,2'-quinazolina]-3'(4'*H*)-il)-4-metilbenzeno sulfonamida), um composto espiro-quinazolinona benzeno sulfonamida, induziu citotoxicidade em células-tronco KG1-a semelhantes a leucemia mieloide aguda. O efeito antitumoral do 4t-CHQ foi evidenciado pela redução significativa da expressão de BCL-2 antiapoptótica e aumento nos níveis de Bax pró-apoptótica, resultando na permeabilização da membrana mitocondrial e indução da apoptose por meio da via intrínseca (RAHIMIAN et al., 2019).

Por outro lado, não houve diferença significativa do percentual de células marcadas com os anticorpos anti-p-PKB/AKT e anti-p-NF- κ B, revelando que não há envolvimento das vias de sinalização do PKB/AKT e NF- κ B no efeito anti-CCR do AMTAC-19.

Vários sinais podem modular a atividade de MAPK, incluindo ROS (KANDA et al., 2021). Nossos dados anteriores demonstraram que AMTAC-19 reduz a produção de ROS após 48 h de tratamento. No entanto, dado que compostos antineoplásicos podem induzir níveis aumentados de ROS nos estágios iniciais do tratamento e ativar as vias de sinalização de MAPKs (D'SOUSA COSTA et al., 2017), sugerimos que a modulação do estado redox em células HCT-116, logo após o tratamento com AMTAC-19, pode estar ligada à indução de estresse oxidativo e subsequente ativação de MAPKs. Portanto, decidimos avaliar os níveis de ROS em intervalos de tempo inferiores a 48 h (30 min, 1 h, 6 h, 12 h e 24 h) usando o ensaio de diacetato de 2,7-

diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA). Níveis elevados de ROS foram observados após 30 min e 1 h de tratamento com AMTAC-19, seguidos por uma redução progressiva nos níveis de ROS após esse período. Apoiando a evidência de que o efeito anti-CCR do AMTAC-19 depende da produção inicial de ROS, o pré-tratamento com N-acetilcisteína (NAC), um composto antioxidante (SAHASRABUDHE; TERLUK; KARTHA, 2023), preveniu significativamente a citotoxicidade desta molécula. Chen et al. (2015) relataram que um novo derivado de acridina benzimidazol, designado como 77, induziu a morte de células HCT-116 por meio da indução da produção de ROS (CHEN et al., 2015).

Diante dos resultados observados, é possível inferir que o AMTAC-19 exerça efeito anti-CCR *in vitro* mediado pela modulação, dependente de estresse oxidativo, das proteínas ERK1/2, JNK e BCL-2.

Em condições fisiológicas, a produção e eliminação de ROS estão equilibradas. No câncer, as células tumorais apresentam altos níveis de ROS, que estão envolvidas em processos como indução da proliferação celular e metástase (KIRTONIA; SETHI; GARG, 2020; KLIESER et al., 2019; LIU et al., 2017a). Embora o estresse oxidativo esteja associado à iniciação e progressão do câncer, a produção excessiva de ROS em células tumorais também pode induzir a apoptose como resposta terapêutica (YANG; CHEN; SHI, 2019a). Diversos medicamentos aumentam os níveis de ROS intracelulares ao ativar vias de sinalização, como as MAPKs (quinases ativadas por mitógenos), incluindo ERK 1/2, JNK e p38, que induzem um desequilíbrio redox, resultando na promoção da apoptose (DHANASEKARAN; REDDY, 2017; HUANG; NAN, 2019; MOLONEY; COTTER, 2018; ZHANG et al., 2016).

Diante disso, para investigar qual a via de ativação da apoptose (intrínseca ou extrínseca) é induzida pelo AMTAC-19 em células HCT-116, foi avaliado o potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) por meio da microscopia confocal por coloração com cloreto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1).

Em células sem alteração do $\Delta\Psi_m$, o corante lipofílico JC-1 se acumula na matriz mitocondrial, formando agregados que emitem fluorescência vermelha. Entretanto, quando ocorre perda do potencial mitocondrial devido à permeabilização da membrana mitocondrial, o corante se dissocia em monômeros que emitem fluorescência verde e se dispersam no citosol (LI et al., 2024). Esse método permite avaliar a ativação da via intrínseca ou mitocondrial da apoptose, que é regulada por alterações na permeabilidade da membrana (KUMAR et al., 2022).

Os resultados demonstraram um aumento significativo na razão entre a fluorescência verde e vermelha nas células HCT-116 tratadas com o AMTAC-19, indicando despolarização mitocondrial e sugerindo a ativação da apoptose por meio da via intrínseca. Essa via é controlada por um equilíbrio delicado entre proteínas pró-apoptóticas e antiapoptóticas, onde as proteínas pró-apoptóticas promovem a formação de poros na membrana mitocondrial, permitindo a liberação de citocromo c e SMAC (segundo membro da família de antagonistas de inibidores de apoptose) para o citosol, o que inicia a cascata apoptótica (OBENG, 2021; WOLF; SCHOENIGER; EDLICH, 2022). Assim, os achados indicam que o AMTAC-19 atua como um agente indutor de apoptose por ativação da via intrínseca, destacando seu potencial na promoção da morte celular programada em células tumorais.

Gao e colaboradores (2015) realizaram a síntese de uma série de compostos de acridina benzimidazol (8a–8q) como novos ligantes de DNA e inibidores de topoisomerase. Foi observado que o composto 8l mostrou a melhor atividade contra células K562 (linhagem celular de leucemia mieloide crônica humana) além de induzir alteração do $\Delta\Psi_m$ e consequente apoptose por meio da via mitocondrial (GAO et al., 2015). De forma semelhante, o efeito antitumoral do derivado de acridina benzimidazol (8m), envolve o aumento dos níveis de ROS, que promove a despolarização da membrana mitocondrial de maneira dependente de concentração, além de ativar a via intrínseca da apoptose mediada por JNK em células HCT-116 (CHEN et al., 2015). Em adição, o estudo realizado por Wei e colaboradores (2023) investigou o efeito apoptótico do composto 4, derivado de acridona, que exibiu significativa atividade contra células Hep-G2 (linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano), além de induzir o aumento da fluorescência verde e despolarização mitocondrial, indicativo de morte celular por apoptose (WEI et al., 2023).

Assim, sugere-se que o efeito antitumoral do AMTAC-19 em células HCT-116 envolve alteração do $\Delta\Psi_m$ com consequente ativação da via intrínseca da apoptose, de maneira dependente de ROS.

Assim, para melhor caracterizar o efeito apoptótico induzido pelo AMTAC-19, foi utilizada a coloração com o marcador nuclear Hoechst 34580, em conjunto com microscopia confocal a *laser*. Essa técnica cria uma fonte de luz pontual utilizando *lasers*, eliminando a luz desfocada e empregando comprimentos de onda específicos para iluminar áreas pequenas, permitindo capturar a fluorescência desejada,

resultando em imagens de alta resolução (ELLIOTT, 2020; JAYAMOHANAN, 2022). O aumento significativo da fluorescência nas células HCT-116 após tratamento com AMTAC-19, indicando condensação da cromatina, corrobora o efeito pró-apoptótico induzido por esta molécula.

De forma semelhante, o composto 9-fenil acridina (ACPH) exibiu alterações indicativas de apoptose como, encolhimento celular, condensação da cromatina e fragmentação internucleossômica em células A375 (linhagem celular humana de melanoma maligno) expostas ao tratamento com este composto (HANSDA; GHOSH; GHOSH, 2020). Também, Zhang e colaboradores (2019), sintetizaram uma série de novos derivados de acridina N-fenilbenzamida-4-metilamina (9a-9f), que exibiram atividade antitumoral contra linhagem de células de leucemia linfoblástica aguda humana (CCRF-CEM). No ensaio de coloração com Hoechst 34580, o composto 9b induziu alterações morfológicas características de apoptose nas células CCRF-CEM (ZHANG et al., 2019a).

Adicionalmente, para avaliar as alterações na sobrevivência e proliferação celular induzida pelo AMTAC-19 em células HCT-116, foi utilizado o ensaio clonogênico, uma técnica laboratorial *in vitro* amplamente usada para analisar a capacidade proliferativa das células individuais de formar novas colônias. Essa abordagem é frequentemente empregada para avaliar a resposta celular a agentes terapêuticos e substâncias citotóxicas (BURYSKA et al., 2023).

Os resultados do ensaio clorogênico mostraram que o composto AMTAC-19 apresentou uma redução significativa na capacidade de formação de colônias das células HCT-116, especialmente na concentração de 1,56 μM (correspondente a 1/8 da CI_{50}). Corroborando com esse resultado, os novos derivados de acridina N-acilhidrazona (3a e 3c) foram sintetizados como potenciais inibidores da topoisomerase I/II. No ensaio de colônia na concentração de 50 μM (correspondente a CI_{50}), esses compostos reduziram significativamente a capacidade clonogênica e a sobrevivência de células da linhagem celular A549 (VILKOVÁ et al., 2022). De forma semelhante, Nunhart e colaboradores (2020) sintetizaram uma série de novos derivados de acridina 3,6,9-trissubstituídos com substituintes de flúor no anel fenil, denominados 8a-8d. No teste clorogênico, os compostos 8b e 8d exibiram efeito inibidor na formação de colônias na maior concentração (50 μM), levando a diminuição significativa da proliferação e sobrevivência das células A549 (NUNHART et al., 2020). Esses achados indicam um efeito promissor do AMTAC-19 como um inibidor de

sobrevivência celular e clonogenicidade em células HCT-116. Este efeito sugere que o composto pode atuar interrompendo processos necessários para proliferação celular, mostrando-se relevante para o desenvolvimento de terapias anticâncer.

Apesar dos avanços no conhecimento das características do câncer e do desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas, o número de mortes por câncer continua aumentando (KHAN, 2018). Isso por que muitas terapias são invasivas ou inespecíficas, o que reflete em potencial toxicidade (DE ALMEIDA et al., 2015).

Nesse contexto, vislumbrando o potencial antitumoral de compostos acridínicos, diversos compostos dessa classe vêm sendo sintetizados e testados em relação à atividade antitumoral e toxicidade (BATISTA, 2019; DUARTE et al., 2020a; LISBOA et al., 2019; MANGUEIRA, 2019; SILVA et al., 2019a; SOUSA, 2019), objetivando o desenvolvimento de novos agentes anticâncer mais eficazes e menos tóxicos (DE MELO REGO et al., 2017).

Diante disso, avaliou-se a toxicidade do AMTAC-19 em modelo de peixe-zebra (*Danio rerio*). Este animal é um organismo vertebrado usado como modelo de doença humana para toxicologia, angiogênese, danos ao DNA, câncer, envelhecimento e triagem de drogas (DUAN et al., 2017) por apresentarem semelhanças fisiológicas e genéticas ao ser humano (HORZMANN; FREEMAN, 2018).

Para isto, foi realizado o teste de toxicidade em embriões de peixe (teste FET) de acordo com o Guia nº 236 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) (2013) que visa determinar a toxicidade aguda ou letal de produtos químicos em estágios embrionários (OECD, 2013).

De acordo com a metodologia do teste FET, os embriões devem ser expostos ao composto químico teste e avaliados diariamente por um período de 96 horas, observando os parâmetros de letalidade, como a coagulação do embrião, falta de somitos, não descolamento da base cauda e falta de batimentos cardíacos (BAMBINO; CHU, 2017). Em adição, após o período de exposição, a concentração letal média (CL₅₀) é estimada pelos resultados dos indicativos de letalidade (KOENIG et al., 2016).

O tratamento de embriões/larvas de peixe-zebra com 100 µM do AMTAC-19 (aproximadamente 10 vezes a CL₅₀ em células HCT-116) por 96 horas de exposição, não causou morte dos animais, estimando que a CL₅₀ do composto foi maior que 100 µM. Então, pode-se inferir que o mesmo apresenta baixa toxicidade aguda nesse modelo não clínico, indicando ainda, considerando o valor da CL₅₀ em células tumorais

HCT-116 (10 μ M), que a molécula teste apresenta seletiva toxicidade às células tumorais. Os resultados em peixe-zebra para os compostos espiro-acridínicos (*E*)-1'-((4-clorobenzilideno)amino)-5'-oxo-1',5'-diidro-10*H*-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-06), (*E*)-1'-((4-flúorbenzilideno)-amino)-5'-oxo-1',5'-diidro-10*H*-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-07) e (*E*)-5'-oxo-1'-((3,4,5-trimetoxibenzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10*H*-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-17) corroboram os resultados do AMTAC-19 por exibirem baixa toxicidade no mesmo modelo avaliado (BATISTA, 2019; DUARTE et al., 2020a; SILVA et al., 2019b). Este resultado fornece informações importantes sobre a segurança deste composto, uma vez que o teste de embriotoxicidade do peixe-zebra é um bom preditor de toxicidade química para animais vertebrados (ALI; MIL; RICHARDSON, 2011; CASSAR et al., 2020; HILL et al., 2005; SHEN; ZUO, 2020).

Os dados obtidos evidenciam a relevante atividade antitumoral *in vitro* do AMTAC-19 contra a linhagem de células de carcinoma colorretal humano HCT-116, bem como sua baixa toxicidade em modelo de peixe-zebra. Esses resultados incentivam a realização de novos estudos para uma caracterização mais detalhada do perfil de toxicidade e da atividade anti-CCR.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos, pode-se concluir que o AMTAC-19 apresentou um efeito antitumoral significativo *in vitro* na linhagem celular HCT-116 (câncer colorretal humano, CCR). Esse efeito envolve as Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), que têm a capacidade de ativar diferentes vias de sinalização celular, incluindo as Cinases 1 e 2 Reguladas por Sinal Extracelular (ERK1/2) e a Cinase N-terminal c-Jun (JNK). A ativação dessas enzimas está relacionada a processos celulares cruciais, incluindo a indução de apoptose em células tumorais.

Com base nessa interação entre ROS e MAPKs, propusemos que as alterações redox iniciais induzidas pelo tratamento com AMTAC-19 desempenham um papel fundamental na ativação de ERK1/2 e JNK. Além disso, o composto demonstrou modular a regulação das proteínas BCL-2, ativando proteínas pro-apoptóticas. Esses efeitos podem levar à apoptose subsequente em células HCT-116. As implicações desses achados são significativas, pois sugerem que AMTAC-19 não apenas induz estresse oxidativo em células tumorais, mas também ativa vias de sinalização que culminam na morte celular.

Adicionalmente, conclui-se que o AMTAC-19 é um composto seguro, visto que o mesmo induziu baixa toxicidade aguda em embriões e larvas do peixe-zebra.

Considerando essas descobertas, nossos resultados encorajam investigações adicionais para entender melhor os mecanismos subjacentes dos efeitos anti-CCR do AMTAC-19, o que poderia contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes contra o CCR. Além disso, nossos resultados também fornecem insights sobre como ROS e MAPKs podem servir como alvos na farmacoterapia do câncer.

Referências

REFERÊNCIAS

AASHAQ, Sabreena; BATOOL, Asiya; ANDRABI, Khurshid I. TAK1 mediates convergence of cellular signals for death and survival. **Apoptosis**, [S. l.], v. 24, n. 1–2, p. 3–20, 2019. DOI: 10.1007/s10495-018-1490-7. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10495-018-1490-7>.

ABDELRAHMAN, Kamal S.; HASSAN, Heba A.; ABDEL-AZIZ, Salah A.; MARZOUK, Adel A.; NARUMI, Atsushi; KONNO, Hiroyuki; ABDEL-AZIZ, Mohamed. JNK signaling as a target for anticancer therapy. **Pharmacological Reports**, [S. l.], v. 73, n. 2, p. 405–434, 2021. DOI: 10.1007/s43440-021-00238-y. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s43440-021-00238-y>.

ABDULLAH, Leena; HILLS, L. Benjamin; WINTER, Evan B.; HUANG, Yina H. Diverse Roles of Akt in T cells. **Immunometabolism**, [S. l.], v. 3, n. 1, 2021. DOI: 10.20900/immunometab20210007. Disponível em: <https://journals.lww.com/10.20900/immunometab20210007>.

ABEDIZADEH, Roya; MAJIDI, Fateme; KHORASANI, Hamid Reza; ABEDI, Hassan; SABOUR, Davood. Colorectal cancer: a comprehensive review of carcinogenesis, diagnosis, and novel strategies for classified treatments. **Cancer and Metastasis Reviews**, [S. l.], v. 43, n. 2, p. 729–753, 2024. DOI: 10.1007/s10555-023-10158-3. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s10555-023-10158-3>.

AGHAZADEH, Yasaman; PAPADOPOULOS, Vassilios. The role of the 14-3-3 protein family in health, disease, and drug development. **Drug Discovery Today**, [S. l.], v. 21, n. 2, p. 278–287, 2016. DOI: 10.1016/j.drudis.2015.09.012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2015.09.012>.

ALAM, Manzar et al. Bax/Bcl-2 Cascade Is Regulated by the EGFR Pathway: Therapeutic Targeting of Non-Small Cell Lung Cancer. **Frontiers in Oncology**, [S. l.], v. 12, 2022. DOI: 10.3389/fonc.2022.869672. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2022.869672/full>.

ALBUQUERQUE, Rita de Cássia Ribeiro De; VIEIRA, Cláudia Lima; SANTIAGO, Isabel Cristina de Almeida; NASCIMENTO, Aline Do; CHANÇA, Raphael Duarte; TURA, Bernardo Rangel; CORREIA, Marcelo Goulart; BARUFALDI, Laura Augusta. Inibidores BTK e BCL-2 no Tratamento de Primeira Linha da Leucemia Linfocítica Crônica em Pacientes de Alto Risco: Revisão Sistemática e Meta-Análise em Rede. **Revista Brasileira de Cancerologia**, [S. l.], v. 70, n. 2, 2024. DOI: 10.32635/2176-9745.rbc.2024v70n2.4501.

ALHOSHANI, Ali et al. BCL-2 Inhibitor Venetoclax Induces Autophagy-Associated Cell Death, Cell Cycle Arrest, and Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. **OncoTargets and Therapy**, [S. l.], v. Volume 13, p. 13357–13370, 2020. DOI: 10.2147/OTT.S281519. Disponível em: <https://www.dovepress.com/bcl-2-inhibitor-venetoclax-induces-autophagy-associated-cell-death-cel-peer-reviewed-article-OTT>.

ALHOWAIL, Ahmad H. et al. Doxorubicin-induced neurotoxicity is associated with acute alterations in synaptic plasticity, apoptosis, and lipid peroxidation. **Toxicology Mechanisms and Methods**, [S. l.], v. 29, n. 6, p. 457–466, 2019. DOI: 10.1080/15376516.2019.1600086. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15376516.2019.1600086>.

ALI, Shaukat; MIL, Harald G. J. Van; RICHARDSON, Michael K. Large-Scale Assessment of the Zebrafish Embryo as a Possible Predictive Model in Toxicity Testing. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 6, n. 6, p. e21076, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0021076. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0021076>.

ALIMBETOV, Dauren; ASKAROVA, Sholpan; UMBAYEV, Bauyrzhan; DAVIS, Terence; KIPLING, David. Pharmacological Targeting of Cell Cycle, Apoptotic and Cell Adhesion Signaling Pathways Implicated in Chemoresistance of Cancer Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 19, n. 6, p. 1690, 2018. DOI: 10.3390/ijms19061690. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1422-0067/19/6/1690>.

ALLEN, Irving C. et al. NLRP12 Suppresses Colon Inflammation and Tumorigenesis through the Negative Regulation of Noncanonical NF- κ B Signaling. **Immunity**, [S. l.], v. 36, n. 5, p. 742–754, 2012. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.03.012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761312001318>.

ALMEIDA, Sinara Mônica Vitalino De et al. New spiro-acridines: DNA interaction, antiproliferative activity and inhibition of human DNA topoisomerases. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 92, p. 467–475, 2016. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.07.057. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.057>.

ANDERSON, Robin L. et al. A framework for the development of effective anti-metastatic agents. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [S. l.], v. 16, n. 3, p. 185–204, 2019. DOI: 10.1038/s41571-018-0134-8. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41571-018-0134-8>.

ANDRÉS, Celia; PÉREZ DE LA LASTRA, José; JUAN, Celia; PLOU, Francisco; PÉREZ-LEBEÑA, Eduardo. The Role of Reactive Species on Innate Immunity. **Vaccines**, [S. l.], v. 10, n. 10, p. 1735, 2022. DOI: 10.3390/vaccines10101735. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-393X/10/10/1735>.

ANSARIZADEH, Fatemeh; SINGH, Manmohan; RICHARDS, David. Modelling of tumor cells regression in response to chemotherapeutic treatment. **Applied Mathematical Modelling**, [S. l.], v. 48, p. 96–112, 2017. DOI: 10.1016/j.apm.2017.03.045. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apm.2017.03.045>.

ASHKENAZI, Avi; FAIRBROTHER, Wayne J.; LEVERSON, Joel D.; SOUERS, Andrew J. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S. l.], v. 16, n. 4, p. 273–284, 2017. DOI: 10.1038/nrd.2016.253. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd.2016.253>.

BABAKHANOVA, Greta; ZIMMERMAN, Stephen M.; PIERCE, Laura T.; SARKAR, Sumona; SCHAUB, Nicholas J.; SIMON, Carl G. Quantitative, traceable determination of cell viability using absorbance microscopy. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. e0262119, 2022. DOI: 10.1371/journal.pone.0262119. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0262119>.

BAILLY, Christian; THURU, Xavier; QUESNEL, Bruno. Combined cytotoxic chemotherapy and immunotherapy of cancer: modern times. **NAR Cancer**, [S. l.], v. 2, n. 1, 2020. DOI: 10.1093/narcan/zcaa002. Disponível em: <https://academic.oup.com/narcancer/article/doi/10.1093/narcan/zcaa002/5736808>.

BALAJI, Swapnaa; TERRERO, David; TIWARI, Amit K.; ASHBY, Charles R.; RAMAN, Dayanidhi. Alternative approaches to overcome chemoresistance to apoptosis in cancer. *Em: Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. 1. ed. [s.l.] : Elsevier Inc., 2021. v. 126p. 91–122. DOI: 10.1016/bs.apcsb.2021.01.005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.apcsb.2021.01.005>.

BAMBINO, Kathryn; CHU, Jaime. Zebrafish in Toxicology and Environmental Health. *Em: Current Topics in Developmental Biology*. 1. ed. [s.l.] : Elsevier Inc., 2017. v. 124p. 331–367. DOI: 10.1016/bs.ctdb.2016.10.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.10.007>.

BATISTA, TATIANNE MOTA. Toxicidade e atividade antitumoral do derivado acridínico (E)-1'-{(4-flúorbenzilideno)-amino}-5'oxo-1,5'diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'carbonitrila (AMTAC-07). **Tese de Doutorado**. Universidade Federal da Paraíba, [S. l.], p. 127, 2019.

BEN HAMOUDA, Sonia; ESSAFI-BENKHADIR, Khadija. Interplay between Signaling Pathways and Tumor Microenvironment Components: A Paradoxical Role in Colorectal Cancer. **International Journal of Molecular Sciences** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 2023. DOI: 10.3390/ijms24065600.

BESSOU, Margaux et al. The apoptosis inhibitor Bcl-xL controls breast cancer cell migration through mitochondria-dependent reactive oxygen species production. **Oncogene**, [S. l.], v. 39, n. 15, p. 3056–3074, 2020. DOI: 10.1038/s41388-020-1212-9. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41388-020-1212-9>.

BHARTI, Vijaya et al. BCL-xL inhibition potentiates cancer therapies by redirecting the outcome of p53 activation from senescence to apoptosis. **Cell Reports**, [S. l.], v. 41, n. 12, p. 111826, 2022. DOI: 10.1016/j.celrep.2022.111826. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124722017181>.

BODEGA, G.; ALIQUE, M.; PUEBLA, L.; CARRACEDO, J.; RAMÍREZ, R. M. Microvesicles: ROS scavengers and ROS producers. **Journal of Extracellular Vesicles**, [S. l.], v. 8, n. 1, 2019. DOI: 10.1080/20013078.2019.1626654. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1080/20013078.2019.1626654>.

BOJKO, Agnieszka; CZARNECKA-HEROK, Joanna; CHARZYNSKA, Agata; DABROWSKI, Michal; SIKORA, Ewa. Diversity of the Senescence Phenotype of Cancer Cells Treated with Chemotherapeutic Agents. **Cells**, [S. l.], v. 8, n. 12, p. 1501, 2019. DOI: 10.3390/cells8121501. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/12/1501>.

BONELLI, Mara; LA MONICA, Silvia; FUMAROLA, Claudia; ALFIERI, Roberta. Multiple effects of CDK4/6 inhibition in cancer: From cell cycle arrest to immunomodulation. **Biochemical Pharmacology**, [S. l.], v. 170, p. 113676, 2019. DOI: 10.1016/j.bcp.2019.113676. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113676>.

BOOTH, Laurence A.; ROBERTS, Jane L.; DENT, Paul. The role of cell signaling in the crosstalk between autophagy and apoptosis in the regulation of tumor cell survival in response to sorafenib and neratinib. **Seminars in Cancer Biology**, [S. l.], v. 66, n. January, p. 129–139, 2020. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.10.013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.10.013>.

BOROWA-MAZGAJ, Barbara; MRÓZ, Anna; AUGUSTIN, Ewa; PALUSZKIEWICZ, Ewa; MAZERSKA, Zofia. 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**, [S. l.], v. 142, p. 21–38, 2017. DOI: 10.1016/j.bcp.2017.06.124. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2017.06.124>.

BOSE, Prithviraj; GANDHI, Varsha; KONOPLEVA, Marina. Pathways and mechanisms of venetoclax resistance. **Leukemia & Lymphoma**, [S. l.], v. 58, n. 9, p. 2026–2039, 2017. DOI: 10.1080/10428194.2017.1283032. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10428194.2017.1283032>.

BOSHITA, Nader M.; TEMIRAK, Ahmed; EL-SHAHID, Zeinab A.; SHAFIQ, Zahid; SOLIMAN, Ahmed A. F. Design, synthesis, molecular docking and biological evaluation of 1,3,5-trisubstituted-1H-pyrazole derivatives as anticancer agents with cell cycle arrest, ERK and RIPK3- kinase activities. **Bioorganic Chemistry**, [S. l.], v. 143, p. 107058, 2024. DOI: 10.1016/j.bioorg.2023.107058. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045206823007198>.

BRAICU, Cornelia et al. A Comprehensive Review on MAPK: A Promising Therapeutic Target in Cancer. **Cancers**, [S. l.], v. 11, n. 10, p. 1618, 2019. DOI: 10.3390/cancers11101618. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/11/10/1618>.

BRAY, Freddie; FERLAY, Jacques; SOERJOMATARAM, Isabelle; SIEGEL, Rebecca L.; TORRE, Lindsey A.; JEMAL, Ahmedin. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [S. l.], v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018. DOI: 10.3322/caac.21492. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21492>.

BRAY, Freddie; LAVERSANNE, Mathieu; SUNG, Hyuna; FERLAY, Jacques; SIEGEL, Rebecca L.; SOERJOMATARAM, Isabelle; JEMAL, Ahmedin. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [S. l.], v. 74, n. 3, p. 229–263, 2024. DOI: 10.3322/caac.21834. Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21834>.

BRUMATTI, Gabriela; KALONI, Deeksha; CASTRO, Fabíola Attié; AMARANTE-MENDES, Gustavo P. BH3 mimetics and TKI combined therapy for Chronic Myeloid Leukemia. **Biochemical Journal**, [S. l.], v. 480, n. 2, p. 161–176, 2023. DOI: 10.1042/BCJ20210608. Disponível em: <https://portlandpress.com/biochemj/article/480/2/161/232520/BH3-mimetics-and-TKI-combined-therapy-for-Chronic>.

BUKOWSKI, Karol; KCIUK, Mateusz; KONTEK, Renata. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 9, p. 3233, 2020. DOI: 10.3390/ijms21093233. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/9/3233>.

BURYSKA, Seth; ARJI, Sanjana; WUERTZ, Beverly; ONDREY, Frank. Using Bland–Altman Analysis to Identify Appropriate Clonogenic Assay Colony Counting Techniques. **Technology in Cancer Research & Treatment**, [S. l.], v. 22, 2023. DOI: 10.1177/15330338231214250. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/15330338231214250>.

CAGNOL, Sebastien; CHAMBARD, Jean Claude. ERK and cell death: Mechanisms of ERK-induced cell death - Apoptosis, autophagy and senescence. **FEBS Journal**, 2010. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.07366.x.

CAMPBELL, Kirsteen J.; TAIT, Stephen W. G. Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer. **Open Biology** Royal Society Publishing, , 2018. DOI: 10.1098/rsob.180002.

CARNEIRO, Benedito A.; EL-DEIRY, Wafik S. Targeting apoptosis in cancer therapy. **Nature Reviews Clinical Oncology** Nature Research, , 2020. DOI: 10.1038/s41571-020-0341-y.

CASARA, Patrick et al. S55746 is a novel orally active BCL-2 selective and potent inhibitor that impairs hematological tumor growth. **Oncotarget**, [S. l.], v. 9, n. 28, p. 20075–20088, 2018. DOI: 10.18632/oncotarget.24744. Disponível em: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.24744>.

CASSAR, Steven et al. Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 95–118, 2020. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.9b00335. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrestox.9b00335>.

CAVA, Claudia; CASTIGLIONI, Isabella. Integration of Molecular Docking and In Vitro Studies: A Powerful Approach for Drug Discovery in Breast Cancer. **Applied**

Sciences, [S. l.], v. 10, n. 19, p. 6981, 2020. DOI: 10.3390/app10196981. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-3417/10/19/6981>.

CHATTERJEE, Aniruddha; RODGER, Euan J.; ECCLES, Michael R. Epigenetic drivers of tumorigenesis and cancer metastasis. **Seminars in Cancer Biology**, [S. l.], v. 51, n. August, p. 149–159, 2018. DOI: 10.1016/j.semcancer.2017.08.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.08.004>.

CHEN, Frances E.; HUANG, De-Bin; CHEN, Yong-Qing; GHOSH, Gourisankar. Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF- κ B bound to DNA. **Nature**, [S. l.], v. 391, n. 6665, p. 410–413, 1998. DOI: 10.1038/34956. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/34956>.

CHEN, Jui-Chieh; HUANG, Cheng; LEE, I-Neng; WU, Yu-Ping; TANG, Chih-Hsin. Amphiregulin enhances cell migration and resistance to doxorubicin in chondrosarcoma cells through the MAPK pathway. **Molecular Carcinogenesis**, [S. l.], v. 57, n. 12, p. 1816–1824, 2018. DOI: 10.1002/mc.22899. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mc.22899>.

CHEN, Kang; CHU, Bi-zhu; LIU, Feng; LI, Bin; GAO, Chun-mei; LI, Lu-lu; SUN, Qin-sheng; SHEN, Zhi-fa; JIANG, Yu-yang. New benzimidazole acridine derivative induces human colon cancer cell apoptosis in vitro via the ROS-JNK signaling pathway. **Acta Pharmacologica Sinica**, [S. l.], v. 36, n. 9, p. 1074–1084, 2015. DOI: 10.1038/aps.2015.44. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/aps201544>.

CHEN, Miao; XIE, Songbo. Therapeutic targeting of cellular stress responses in cancer. **Thoracic Cancer** John Wiley and Sons Inc., , 2018. DOI: 10.1111/1759-7714.12890.

CHEN, Rui et al. Design, Synthesis, Antimicrobial, and Anticancer Activities of Acridine Thiosemicarbazides Derivatives. **Molecules**, [S. l.], v. 24, n. 11, p. 2065, 2019. DOI: 10.3390/molecules24112065. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/11/2065>.

CHENG, Hongyun et al. Naringin inhibits colorectal cancer cell growth by repressing the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. **Experimental and Therapeutic Medicine**, [S. l.], 2020. DOI: 10.3892/etm.2020.8649. Disponível em: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2020.8649>.

CHENG, Jing; FENG, Xuexin; LI, Zhiqiang; ZHOU, Feilong; YANG, Jin-Ming; ZHAO, Yujun. Pharmacological inhibition of NF- κ B-inducing kinase (NIK) with small molecules for the treatment of human diseases. **RSC Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 12, n. 4, p. 552–565, 2021. a. DOI: 10.1039/D0MD00361A. Disponível em: <https://xlink.rsc.org/?DOI=D0MD00361A>.

CHENG, Rui; LIU, Xiaolong; WANG, Zheng; TANG, Kunlong. ABT-737, a Bcl-2 family inhibitor, has a synergistic effect with apoptosis by inducing urothelial carcinoma cell necroptosis. **Molecular Medicine Reports**, [S. l.], v. 23, n. 6, p. 412, 2021. b. DOI: 10.3892/mmr.2021.12051. Disponível em: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2021.12051>.

CHO, Yik-Lam; TAN, Hayden Weng Siong; SAQUIB, Quaiser; REN, Yi; AHMAD, Javed; WAHAB, Rizwan; HE, Weifeng; BAY, Boon-Huat; SHEN, Han-Ming. Dual role of oxidative stress-JNK activation in autophagy and apoptosis induced by nickel oxide nanoparticles in human cancer cells. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 153, n. April, p. 173–186, 2020. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.03.027. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.03.027>.

CIARDIELLO, Fortunato; CIARDIELLO, Davide; MARTINI, Giulia; NAPOLITANO, Stefania; TABERNERO, Josep; CERVANTES, Andres. Clinical management of metastatic colorectal cancer in the era of precision medicine. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [S. l.], v. 72, n. 4, p. 372–401, 2022. DOI: 10.3322/caac.21728. Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21728>.

COOLEY, Joseph C.; JAVKHLAN, Nomin; WILSON, Jasmine A.; FOSTER, Daniel G.; EDELMAN, Benjamin L.; ORTIZ, Luis A.; SCHWARTZ, David A.; RICHES, David W. H.; REDENTE, Elizabeth F. Inhibition of antiapoptotic BCL-2 proteins with ABT-263 induces fibroblast apoptosis, reversing persistent pulmonary fibrosis. **JCI Insight**, [S. l.], v. 8, n. 3, 2023. DOI: 10.1172/jci.insight.163762. Disponível em: <https://insight.jci.org/articles/view/163762>.

COSENTINO, Katia; GARCÍA-SÁEZ, Ana J. Bax and Bak Pores: Are We Closing the Circle? **Trends in Cell Biology**, [S. l.], v. 27, n. 4, p. 266–275, 2017. DOI: 10.1016/j.tcb.2016.11.004. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0962892416302021>.

CUI, Li et al. Apoptosis induction by alantolactone in breast cancer MDA-MB-231 cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrion-dependent pathway. **Archives of Pharmacal Research**, [S. l.], v. 41, n. 3, p. 299–313, 2018. DOI: 10.1007/s12272-017-0990-2. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12272-017-0990-2>.

CZABOTAR, Peter E.; GARCIA-SAEZ, Ana J. Mechanisms of BCL-2 family proteins in mitochondrial apoptosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S. l.], v. 24, n. 10, p. 732–748, 2023. DOI: 10.1038/s41580-023-00629-4. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41580-023-00629-4>.

DA SILVA, Márcio; ERRANTE, Paolo Ruggero. **Revista UNILUS Ensino e Pesquisa v. 13, n. 33, out./dez.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>.

DADSENA, Shashank; JENNER, Andreas; GARCÍA-SÁEZ, Ana J. Mitochondrial outer membrane permeabilization at the single molecule level. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [S. l.], v. 78, n. 8, p. 3777–3790, 2021. DOI: 10.1007/s00018-021-03771-4. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s00018-021-03771-4>.

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

Acesso em julho de 2024.

DE ALMEIDA, Sinara et al. Synthesis, DNA Binding, and Antiproliferative Activity of Novel Acridine-Thiosemicarbazone Derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 16, n. 12, p. 13023–13042, 2015. DOI: 10.3390/ijms160613023. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1422-0067/16/6/13023>.

DE ALMEIDA, Sinara Mônica Vitalino; RIBEIRO, Amélia Galdino; DE LIMA SILVA, Geilza Carla; FERREIRA ALVES, Josival Emanuel; BELTRÃO, Eduardo Isidoro Carneiro; DE OLIVEIRA, Jamerson Ferreira; DE CARVALHO, Luiz Bezerra; ALVES DE LIMA, Maria do Carmo. DNA binding and Topoisomerase inhibition: How can these mechanisms be explored to design more specific anticancer agents? **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 96, n. November, p. 1538–1556, 2017. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.11.054. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.054>.

DE, Arun Kumar et al. A Natural Quinazoline Derivative from Marine Sponge Hyrtios erectus Induces Apoptosis of Breast Cancer Cells via ROS Production and Intrinsic or Extrinsic Apoptosis Pathways. **Marine Drugs**, [S. l.], v. 17, n. 12, p. 658, 2019. DOI: 10.3390/md17120658. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1660-3397/17/12/658>.

DE AZEVEDO JR., Walter. MolDock Applied to Structure-Based Virtual Screening. **Current Drug Targets**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 327–334, 2010. DOI: 10.2174/138945010790711941. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-4501&volume=11&issue=3&spage=327>.

DE JONG, Mathilde Rikje Willemijn; LANGENDONK, Myra; REITSMA, Bart; NIJLAND, Marcel; VAN DEN BERG, Anke; AMMATUNA, Emanuele; VISSER, Lydia; VAN MEERTEN, Tom. Heterogeneous pattern of dependence on anti-apoptotic BCL-2 family proteins upon CHOP treatment in diffuse large b-cell lymphoma. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 23, 2019. DOI: 10.3390/ijms20236036.

DE LA HOZ POLO, Marcela; DICK, Elizabeth; BHUMBRA, Rej; POLLOCK, Rob; SANDHU, Ranbir; SAIFUDDIN, Asif. Surgical considerations when reporting MRI studies of soft tissue sarcoma of the limbs. **Skeletal Radiology**, [S. l.], v. 46, n. 12, p. 1667–1678, 2017. DOI: 10.1007/s00256-017-2745-z. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00256-017-2745-z>.

DE M. SILVA, Marina et al. Correlation between DNA/HSA-interactions and antimalarial activity of acridine derivatives: Proposing a possible mechanism of action. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [S. l.], v. 189, n. May, p. 165–175, 2018. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2018.10.016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.10.016>.

DE MELO REGO, Moacyr J. B. et al. Synthesis and Anticancer Evaluation of Thiazacridine Derivatives Reveals New Selective Molecules to Hematopoietic Neoplastic Cells. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, [S. l.],

v. 20, n. 8, p. 804–819, 2017. DOI: 10.2174/1386207320666170724114802.
Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/152888/article>.

DE SOUSA, Valgrícia Matias et al. Cytotoxicity of a new spiro-acridine derivative: modulation of cellular antioxidant state and induction of cell cycle arrest and apoptosis in HCT-116 colorectal carcinoma. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, [S. l.], v. 397, n. 3, p. 1901–1913, 2024. DOI: 10.1007/s00210-023-02686-0.

DHANASEKARAN, Danny N.; REDDY, E. Premkumar. JNK-signaling: A multiplexing hub in programmed cell death. **Genes & Cancer**, [S. l.], v. 8, n. 9–10, p. 682–694, 2017. DOI: 10.18632/genesandcancer.155. Disponível em: <https://www.genesandcancer.com/lookup/doi/10.18632/genesandcancer.155>.

DICKENS, Elena; AHMED, Samreen. Principles of cancer treatment by chemotherapy. **Surgery (Oxford)**, [S. l.], v. 36, n. 3, p. 134–138, 2018. DOI: 10.1016/j.mpsur.2017.12.002. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2017.12.002>.

DIEPSTRATEN, Sarah T. et al. Putting the STING back into BH3-mimetic drugs for TP53-mutant blood cancers. **Cancer Cell**, [S. l.], v. 42, n. 5, p. 850–868.e9, 2024. DOI: 10.1016/j.ccell.2024.04.004.

DIEPSTRATEN, Sarah T.; ANDERSON, Mary Ann; CZABOTAR, Peter E.; LESSENE, Guillaume; STRASSER, Andreas; KELLY, Gemma L. The manipulation of apoptosis for cancer therapy using BH3-mimetic drugs. **Nature Reviews Cancer**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 45–64, 2022. DOI: 10.1038/s41568-021-00407-4. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41568-021-00407-4>.

DONOHUE, Fionán; WILKINSON, Michael; BAXTER, Eva; BRENNAN, Donal J. Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) and Obesity-Related Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 1241, 2020. DOI: 10.3390/ijms21041241. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/4/1241>.

D'SOUSA COSTA, Cinara O. et al. Novel piplartine-containing ruthenium complexes: synthesis, cell growth inhibition, apoptosis induction and ROS production on HCT116 cells. **Oncotarget**, [S. l.], v. 8, n. 61, p. 104367–104392, 2017. DOI: 10.18632/oncotarget.22248. Disponível em: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.22248>.

DUAN, Junchao; HU, Hejing; FENG, Lin; YANG, Xiaozhe; SUN, Zhiwei. Silica nanoparticles inhibit macrophage activity and angiogenesis via VEGFR2-mediated MAPK signaling pathway in zebrafish embryos. **Chemosphere**, [S. l.], v. 183, p. 483–490, 2017. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.05.138. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.138>.

DUARTE, SÂMIA SOUSA et al. Anticancer Effect of a Spiro-acridine Compound Involves Immunomodulatory and Anti-angiogenic Actions. **Anticancer Research**, [S. l.], v. 40, n. 9, p. 5049–5057, 2020. a. DOI: 10.21873/anticancer.14508. Disponível em: <http://ar.iiarjournals.org/lookup/doi/10.21873/anticancer.14508>.

DUARTE, SÂMIA SOUSA et al. Anticancer Effect of a Spiro-acridine Compound Involves Immunomodulatory and Anti-angiogenic Actions. **Anticancer Research**, [S. l.], v. 40, n. 9, p. 5049–5057, 2020. b. DOI: 10.21873/anticancerres.14508. Disponível em: <http://ar.iiarjournals.org/lookup/doi/10.21873/anticancerres.14508>.

DUARTE, Sâmia Sousa et al. Apoptotic and antioxidant effects in HCT-116 colorectal carcinoma cells by a spiro-acridine compound, AMTAC-06. **Pharmacological Reports**, [S. l.], v. 74, n. 3, p. 545–554, 2022. DOI: 10.1007/s43440-022-00357-0. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s43440-022-00357-0>.

EBRAHIMI, Nasim et al. Targeting the NF- κ B pathway as a potential regulator of immune checkpoints in cancer immunotherapy. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [S. l.], v. 81, n. 1, p. 106, 2024. DOI: 10.1007/s00018-023-05098-8. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s00018-023-05098-8>.

ELEFANTOVA, Katarina; LAKATOS, Boris; KUBICKOVA, Jana; SULOVA, Zdena; BREIER, Albert. Detection of the Mitochondrial Membrane Potential by the Cationic Dye JC-1 in L1210 Cells with Massive Overexpression of the Plasma Membrane ABCB1 Drug Transporter. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 19, n. 7, p. 1985, 2018. DOI: 10.3390/ijms19071985. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/7/1985>.

ELHINNAWI, Manar A.; MOHAREB, Rafat M.; RADY, Hanaa M.; KHALIL, Wagdy K. B.; ABD ELHALIM, Mervat M.; ELMEGEED, Gamal A. Novel pregnenolone derivatives modulate apoptosis via Bcl-2 family genes in hepatocellular carcinoma in vitro. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 183, p. 125–136, 2018. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2018.06.006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096007601830178X>.

ELLIOTT, Amicia D. Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. **Current Protocols in Cytometry**, [S. l.], v. 92, n. 1, 2020. DOI: 10.1002/cpcy.68. Disponível em: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cpcy.68>.

EMAMI, Fakhrossadat; BANSTOLA, Asmita; VATANARA, Alireza; LEE, Sooyeon; KIM, Jong Oh; JEONG, Jee-Heon; YOOK, Simmyung. Doxorubicin and Anti-PD-L1 Antibody Conjugated Gold Nanoparticles for Colorectal Cancer Photochemotherapy. **Molecular Pharmaceutics**, [S. l.], v. 16, n. 3, p. 1184–1199, 2019. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b01157. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.molpharmaceut.8b01157>.

FAN, Jiangjiang; REN, Dongmei; WANG, Jinxia; LIU, Xiaoqing; ZHANG, Huaran; WU, Mingsheng; YANG, Guotao. Bruceine D induces lung cancer cell apoptosis and autophagy via the ROS/MAPK signaling pathway in vitro and in vivo. **Cell Death & Disease**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 126, 2020. DOI: 10.1038/s41419-020-2317-3. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41419-020-2317-3>.

FAN, Ping; TYAGI, Amit K.; AGBOKE, Fadeke A.; MATHUR, Rohit; POKHAREL, Niranjana; JORDAN, V. Craig. Modulation of nuclear factor-kappa B activation by the endoplasmic reticulum stress sensor PERK to mediate estrogen-induced apoptosis in

breast cancer cells. **Cell Death Discovery**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 15, 2018. DOI: 10.1038/s41420-017-0012-7. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41420-017-0012-7>.

FARGHALI, H.; KGALALELO KEMELO, M.; WOJNAROVÁ, L.; KUTINOVÁ CANOVÁ, N. In vitro and in vivo experimental hepatotoxic models in liver research: Applications to the assessment of potential hepatoprotective drugs. **Physiological Research**, [S. l.], v. 65, p. S417–S425, 2016. DOI: 10.33549/physiolres.933506.

FERNANDO, Jenny; JONES, Rob. The principles of cancer treatment by chemotherapy. **Surgery (Oxford)**, [S. l.], v. 33, n. 3, p. 131–135, 2015. DOI: 10.1016/j.mpsur.2015.01.005. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0263931915000162>.

FERREIRA, Rafael Carlos et al. Chemical Composition, In Vitro Antitumor Effect, and Toxicity in Zebrafish of the Essential Oil from *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (Asteraceae). **Biomolecules**, [S. l.], v. 13, n. 10, p. 1439, 2023. a. DOI: 10.3390/biom13101439. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2218-273X/13/10/1439>.

FERREIRA, Rafael Carlos et al. Chemical Composition, In Vitro Antitumor Effect, and Toxicity in Zebrafish of the Essential Oil from *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (Asteraceae). **Biomolecules**, [S. l.], v. 13, n. 10, 2023. b. DOI: 10.3390/biom13101439.

FERREIRA, Rafael Carlos et al. The Essential Oil from *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (Asteraceae) Exerts an In Vitro Antimelanoma Effect by Inducing Apoptosis and Modulating the MAPKs, NF- κ B, and PKB/AKT Signaling Pathways. **Pharmaceuticals**, [S. l.], v. 16, n. 11, 2023. c. DOI: 10.3390/ph16111553.

FIOCCHETTI, Marco; FERNANDEZ, Virginia Solar; MONTALESI, Emiliano; MARINO, Maria. Neuroglobin: A Novel Player in the Oxidative Stress Response of Cancer Cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [S. l.], v. 2019, p. 1–9, 2019. DOI: 10.1155/2019/6315034. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2019/6315034/>.

FISHER, Michael J. et al. Management of neurofibromatosis type 1-associated plexiform neurofibromas. **Neuro-Oncology**, [S. l.], v. 24, n. 11, p. 1827–1844, 2022. DOI: 10.1093/neuonc/noac146. Disponível em: <https://academic.oup.com/neuro-oncology/article/24/11/1827/6601427>.

FLORES-ROMERO, Hector et al. BCL-2-family protein tBID can act as a BAX-like effector of apoptosis. **The EMBO Journal**, [S. l.], v. 41, n. 2, 2022. DOI: 10.15252/embj.2021108690. Disponível em: <https://www.embopress.org/doi/10.15252/embj.2021108690>.

FONTANA, Gianfranco; BADALAMENTI, Natale; BRUNO, Maurizio; CASTIGLIONE, Davide; NOTARBARTOLO, Monica; POMA, Paola; SPINELLA, Alberto; TUTONE, Marco; LABBOZZETTA, Manuela. Synthesis, In Vitro and In Silico Analysis of New Oleanolic Acid and Lupeol Derivatives against Leukemia Cell Lines: Involvement of

the NF- κ B Pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 23, n. 12, p. 6594, 2022. DOI: 10.3390/ijms23126594. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/12/6594>.

FRANKEN, Nicolaas A. P.; RODERMOND, Hans M.; STAP, Jan; HAVEMAN, Jaap; VAN BREE, Chris. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, [S. l.], v. 1, n. 5, p. 2315–2319, 2006. DOI: 10.1038/nprot.2006.339. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nprot.2006.339>.

FU, Wan et al. A novel acridine derivative, LS-1-10 inhibits autophagic degradation and triggers apoptosis in colon cancer cells. **Cell Death & Disease**, [S. l.], v. 8, n. 10, p. e3086–e3086, 2017. DOI: 10.1038/cddis.2017.498. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s43440-022-00357-0>.

FU, Wenxiang; HALL, Michael N. Regulation of mTORC2 Signaling. **Genes**, [S. l.], v. 11, n. 9, p. 1045, 2020. DOI: 10.3390/genes11091045. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4425/11/9/1045>.

GALLUZZI, Lorenzo et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 486–541, 2018. DOI: 10.1038/s41418-017-0012-4. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41418-017-0012-4>.

GALLYAS, Ferenc; SUMEGI, Balazs; SZABO, Csaba. Role of Akt Activation in PARP Inhibitor Resistance in Cancer. **Cancers**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 532, 2020. DOI: 10.3390/cancers12030532. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/3/532>.

GAO, Chunmei et al. Synthesis and biological evaluation of benzimidazole acridine derivatives as potential DNA-binding and apoptosis-inducing agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 23, n. 8, p. 1800–1807, 2015. DOI: 10.1016/j.bmc.2015.02.036. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968089615001303>.

GAO, Ping-Ping; QI, Xiao-Wei; SUN, Na; SUN, Yuan-Yuan; ZHANG, Ye; TAN, Xuan-Ni; DING, Jun; HAN, Fei; ZHANG, Yi. The emerging roles of dual-specificity phosphatases and their specific characteristics in human cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, [S. l.], v. 1876, n. 1, p. 188562, 2021. DOI: 10.1016/j.bbcan.2021.188562. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304419X21000597>.

GAO, Wen-Yong; BOONYARAT, Chantana; TAKOMTHONG, Pitchayakarn; PLEKRATOKE, Kusawadee; HAYAKAWA, Yoshihiro; YENJAI, Chavi; KAEWAMATAWONG, Rawiwun; CHAIWIWATRAKUL, Suchada; WAIWUT, Pornthip. Acridone Derivatives from Atalantia monophyla Inhibited Cancer Cell Proliferation through ERK Pathway. **Molecules**, [S. l.], v. 27, n. 12, p. 3865, 2022. DOI: 10.3390/molecules27123865. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/12/3865>.

GARCÍA-HERNÁNDEZ, Laura; GARCÍA-ORTEGA, María Belén; RUIZ-ALCALÁ, Gloria; CARRILLO, Esmeralda; MARCHAL, Juan Antonio; GARCÍA, María Ángel. The p38 MAPK Components and Modulators as Biomarkers and Molecular Targets in Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 370, 2021. DOI: 10.3390/ijms23010370. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/1/370>.

GARG, Manoj et al. Selinexor (KPT-330) has antitumor activity against anaplastic thyroid carcinoma in vitro and in vivo and enhances sensitivity to doxorubicin. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. 1, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-10325-x.

GEHRIG, Jochen; PANDEY, Gunjan; WESTHOFF, Jens H. Zebrafish as a Model for Drug Screening in Genetic Kidney Diseases. **Frontiers in Pediatrics**, [S. l.], v. 6, 2018. DOI: 10.3389/fped.2018.00183. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fped.2018.00183/full>.

GENSICKA-KOWALEWSKA, Monika; CHOLEWIŃSKI, Grzegorz; DZIERZBICKA, Krystyna. Recent developments in the synthesis and biological activity of acridine/acridone analogues. **RSC Advances**, [S. l.], v. 7, n. 26, p. 15776–15804, 2017. DOI: 10.1039/C7RA01026E. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C7RA01026E>.

GENSICKA-KOWALEWSKA, Monika; CICHOREK, Mirosława; RONOWSKA, Anna; DEPTUŁA, Milena; KLEJBOR, Ilona; DZIERZBICKA, Krystyna. Synthesis and Biological Evaluation of Acridine/Acridone Analogs as Potential Anticancer Agents. **Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 15, n. 7, p. 729–737, 2019. DOI: 10.2174/1573406414666181015145120. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/166258/article>.

GHANEM, Aml; EMARA, Hamdy A.; MUAWIA, Shaden; ABD EL MAKSOUD, Ahmed I.; AL-KARMALAWY, Ahmed A.; ELSHAL, Mohamed F. Tanshinone IIA synergistically enhances the antitumor activity of Doxorubicin by interfering with PI3K/AKT/mTOR pathway and inhibition of topoisomerase II: in vitro and molecular docking studies. **New Journal of Chemistry**, [S. l.], v. 44, n. 40, p. 17374–17381, 2020. DOI: 10.1039/D0NJ04088F. Disponível em: <https://xlink.rsc.org/?DOI=D0NJ04088F>.

GHELLI LUSERNA DI RORÀ, Andrea et al. Exploring the ATR-Chk1 pathway in the response of doxorubicin-induced DNA damages in acute lymphoblastic leukemia cells. **Cell Biology and Toxicology**, [S. l.], v. 39, n. 3, p. 795–811, 2023. DOI: 10.1007/s10565-021-09640-x. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s10565-021-09640-x>.

GIACOMELLO, Marta; PYAKUREL, Aswin; GLYTSOU, Christina; SCORRANO, Luca. The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 204–224, 2020. DOI: 10.1038/s41580-020-0210-7. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41580-020-0210-7>.

GILMORE, Andrew; KING, Louise. Emerging approaches to target mitochondrial apoptosis in cancer cells. **F1000Research**, [S. l.], v. 8, p. 1793, 2019. DOI:

10.12688/f1000research.18872.1. Disponível em:
<https://f1000research.com/articles/8-1793/v1>.

GIREK, Małgorzata 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**, [S. l.], v. 460, n. 1–2, p. 123–150, 2019. DOI: 10.1007/s11010-019-03576-x. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11010-019-03576-x>.

GIRVIN, Francis et al. Malignant and Benign Tracheobronchial Neoplasms: Comprehensive Review with Radiologic, Bronchoscopic, and Pathologic Correlation. **Radiographics**, [S. l.], v. 43, n. 9, 2023. DOI: 10.1148/rg.230045.

GKOUVERIS, Ioannis; NIKITAKIS, Nikolaos G. Role of JNK signaling in oral cancer: A mini review. **Tumor Biology**, [S. l.], v. 39, n. 6, p. 101042831771165, 2017. DOI: 10.1177/1010428317711659. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1010428317711659>.

GONG, Liuyun; ZHANG, Yujie; LIU, Chengcheng; ZHANG, Mingzhen; HAN, Suxia. **Application of radiosensitizers in cancer radiotherapy. International Journal of Nanomedicine**Dove Medical Press Ltd, , 2021. DOI: 10.2147/IJN.S290438.

GONG, Shu; XU, Dongsheng; ZHU, Jialin; ZOU, Fangdong; PENG, Rui. Efficacy of the MEK Inhibitor Cobimetinib and its Potential Application to Colorectal Cancer Cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, [S. l.], v. 47, n. 2, p. 680–693, 2018. DOI: 10.1159/000490022. Disponível em: <https://karger.com/CPB/article/doi/10.1159/000490022>.

GOUVEIA, Rawny Galdino; RIBEIRO, Amélia Galdino; SEGUNDO, Miguel Ângelo Santos Pinheiro; DE OLIVEIRA, Jamerson Ferreira; DE LIMA, Maria do Carmo Alves; DE LIMA SOUZA, Túlio Ricardo Couto; DE ALMEIDA, Sinara Mônica Vitalino; DE MOURA, Ricardo Olímpio. Synthesis, DNA and protein interactions and human topoisomerase inhibition of novel Spiroacridine derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 26, n. 22, p. 5911–5921, 2018. DOI: 10.1016/j.bmc.2018.10.038. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.10.038>.

GRAY, Janet M.; RASANAYAGAM, Sharima; ENGEL, Connie; RIZZO, Jeanne. State of the evidence 2017: an update on the connection between breast cancer and the environment. **Environmental Health**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 94, 2017. DOI: 10.1186/s12940-017-0287-4. Disponível em: <https://ehjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12940-017-0287-4>.

GREEN, Douglas R.; LLAMBI, Fabien. Cell Death Signaling. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [S. l.], v. 7, n. 12, p. a006080, 2015. DOI: 10.1101/cshperspect.a006080. Disponível em: <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a006080>.

GUAN, Ruijuan; KANG, Zefeng; LI, Ling; YAN, Xin; GAO, Tianpeng. PI3CA regulates development of diabetes retinopathy through the PI3K/Akt/mTOR pathway.

PLOS ONE, [S. l.], v. 19, n. 1, p. e0295813, 2024. DOI: 10.1371/journal.pone.0295813. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0295813>.

GUO, Dandan et al. Qizhen capsule inhibits colorectal cancer by inducing NAG-1/GDF15 expression that mediated via MAPK/ERK activation. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 273, p. 113964, 2021. DOI: 10.1016/j.jep.2021.113964. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874121001914>.

GUO, Jipeng; XU, Bingfei; HAN, Qi; ZHOU, Hongxia; XIA, Yun; GONG, Chongwen; DAI, Xiaofang; LI, Zhenyu; WU, Gang. Ferroptosis: A novel anti-tumor action for cisplatin. **Cancer Research and Treatment**, [S. l.], v. 50, n. 2, p. 445–460, 2018. DOI: 10.4143/crt.2016.572.

GUO, Meng et al. Research Advances on Anti-Cancer Natural Products. **Frontiers in Oncology**, [S. l.], v. 12, 2022. DOI: 10.3389/fonc.2022.866154. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2022.866154/full>.

GUO, Qing; JIN, Yizi; CHEN, Xinyu; YE, Xiaomin; SHEN, Xin; LIN, Mingxi; ZENG, Cheng; ZHOU, Teng; ZHANG, Jian. NF- κ B in biology and targeted therapy: new insights and translational implications. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 53, 2024. DOI: 10.1038/s41392-024-01757-9. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41392-024-01757-9>.

GUO, Yan-Jun; PAN, Wei-Wei; LIU, Sheng-Bing; SHEN, Zhong-Fei; XU, Ying; HU, Ling-Ling. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). **Experimental and Therapeutic Medicine**, [S. l.], p. 1997–2007, 2020. DOI: 10.3892/etm.2020.8454. Disponível em: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2020.8454>.

GUPTA, Vikas A.; ACKLEY, James; KAUFMAN, Jonathan L.; BOISE, Lawrence H. BCL2 Family Inhibitors in the Biology and Treatment of Multiple Myeloma. **Blood and Lymphatic Cancer: Targets and Therapy**, [S. l.], v. Volume 11, p. 11–24, 2021. DOI: 10.2147/blctt.s245191.

HAMDY, Rania; ZIEDAN, Noha I.; ALI, Samia; BORDONI, Cinzia; EL-SADEK, Mohamed; LASHIN, Elsaid; BRANCALE, Andrea; JONES, Arwyn T.; WESTWELL, Andrew D. Synthesis and evaluation of 5-(1 H -indol-3-yl)- N -aryl-1,3,4-oxadiazol-2- amines as Bcl-2 inhibitory anticancer agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S. l.], v. 27, n. 4, p. 1037–1040, 2017. DOI: 10.1016/j.bmcl.2016.12.061. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960894X16313415>.

HAMMOUDA, Manel; FORD, Amy; LIU, Yuan; ZHANG, Jennifer. The JNK Signaling Pathway in Inflammatory Skin Disorders and Cancer. **Cells**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 857, 2020. DOI: 10.3390/cells9040857. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/4/857>.

HAN, Yo-Han; MUN, Jeong-Geon; JEON, Hee Dong; KEE, Ji-Ye; HONG, Seung-Heon. Betulin Inhibits Lung Metastasis by Inducing Cell Cycle Arrest, Autophagy, and

Apoptosis of Metastatic Colorectal Cancer Cells. **Nutrients**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 66, 2019. DOI: 10.3390/nu12010066. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/12/1/66>.

HANAHAN, Douglas. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 31–46, 2022. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cancerdiscovery/article/12/1/31/675608/Hallmarks-of-Cancer-New-DimensionsHallmarks-of>.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, [S. l.], v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30163-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30163-9).

HANSDA, Surajit; GHOSH, Gargi; GHOSH, Rita. 9-phenyl acridine photosensitizes A375 cells to UVA radiation. **Heliyon**, [S. l.], v. 6, n. 9, p. e04733, 2020. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e04733. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405844020315760>.

HE, Wenya et al. Brain-Targeted Codelivery of Bcl-2/Bcl-xl and Mcl-1 Inhibitors by Biomimetic Nanoparticles for Orthotopic Glioblastoma Therapy. **ACS Nano**, [S. l.], v. 16, n. 4, p. 6293–6308, 2022. DOI: 10.1021/acsnano.2c00320. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.2c00320>.

HE, Yan; SUN, Miao Miao; ZHANG, Guo Geng; YANG, Jing; CHEN, Kui Sheng; XU, Wen Wen; LI, Bin. Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 425, 2021. DOI: 10.1038/s41392-021-00828-5. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41392-021-00828-5>.

HEINZERLING, Lucie et al. Tolerability of BRAF/MEK inhibitor combinations: adverse event evaluation and management. **ESMO Open**, [S. l.], v. 4, n. 3, p. e000491, 2019. DOI: 10.1136/esmoopen-2019-000491. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2059702920301526>.

HILL, Adrian J.; TERAOKA, Hiroki; HEIDEMAN, Warren; PETERSON, Richard E. Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. **Toxicological Sciences**, [S. l.], v. 86, n. 1, p. 6–19, 2005. DOI: 10.1093/toxsci/kfi110. Disponível em: <http://academic.oup.com/toxsci/article/86/1/6/1654090/Zebrafish-as-a-Model-Vertebrate-for-Investigating>.

HINZ, Boris; LAGARES, David. Evasion of apoptosis by myofibroblasts: a hallmark of fibrotic diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 11–31, 2020. DOI: 10.1038/s41584-019-0324-5. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41584-019-0324-5>.

HOLLVILLE, Emilie; ROMERO, Selena E.; DESHMUKH, Mohanish. Apoptotic cell death regulation in neurons. **The FEBS Journal**, [S. l.], v. 286, n. 17, p. 3276–3298, 2019. DOI: 10.1111/febs.14970. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/febs.14970>.

HORZMANN, Katharine A.; FREEMAN, Jennifer L. Making Waves: New Developments in Toxicology With the Zebrafish. **Toxicological Sciences**, [S. l.], v. 163, n. 1, p. 5–12, 2018. DOI: 10.1093/toxsci/kfy044. Disponível em: <https://academic.oup.com/toxsci/article/163/1/5/4870163>.

HOSSAIN, Md. Sanower et al. Colorectal Cancer: A Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies. **Cancers**, [S. l.], v. 14, n. 7, p. 1732, 2022. DOI: 10.3390/cancers14071732. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/14/7/1732>.

HOSSAN, Md Shahadat et al. Cardiac glycoside cerberin exerts anticancer activity through PI3K/AKT/mTOR signal transduction inhibition. **Cancer Letters**, [S. l.], v. 453, p. 57–73, 2019. DOI: 10.1016/j.canlet.2019.03.034. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383519301909>.

HUANG, Kai et al. BH3-only proteins target BCL-xL/MCL-1, not BAX/BAK, to initiate apoptosis. **Cell Research**, [S. l.], v. 29, n. 11, p. 942–952, 2019. DOI: 10.1038/s41422-019-0231-y. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41422-019-0231-y>.

HUANG, Yu Jing; NAN, Guang Xian. Oxidative stress-induced angiogenesis. **Journal of Clinical Neuroscience** Churchill Livingstone, , 2019. DOI: 10.1016/j.jocn.2019.02.019.

HYNDMAN, Iain Joseph. Review: the Contribution of both Nature and Nurture to Carcinogenesis and Progression in Solid Tumours. **Cancer Microenvironment**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 63–69, 2016. DOI: 10.1007/s12307-016-0183-4. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s12307-016-0183-4>.

IBRAHIM, Mutiat; ADEGBOYEGA, Abayomi; ADEGBORO, Rotimi; ILOMUANYA, Margaret; ABDULKAREEM, Fatimah. Flavonoid and Organosulphur Phytoconstituents From *Allium Sativum* Inhibits Antiapoptotic Protein Bcl-2: A Computational Molecular Modeling Study. **JCO Global Oncology**, [S. l.], v. 8, n. Supplement_1, p. 25–25, 2022. DOI: 10.1200/GO.22.31000. Disponível em: <https://ascopubs.org/doi/10.1200/GO.22.31000>.

IKSEN; WITAYATEERAPORN, Wasita; HARDIANTI, Besse; PONGRAKHANANON, Varisa. Comprehensive review of Bcl-2 family proteins in cancer apoptosis: Therapeutic strategies and promising updates of natural bioactive compounds and small molecules. **Phytotherapy Research** John Wiley and Sons Ltd, , 2024. DOI: 10.1002/ptr.8157.

ISLAM, Md Rezaul; AKASH, Shopnil; RAHMAN, Md Mominur; NOWRIN, Feana Tasmim; AKTER, Tamanna; SHOHAG, Sheikh; RAUF, Abdur; ALJOHANI, Abdullah S. M.; SIMAL-GANDARA, Jesus. Colon cancer and colorectal cancer: Prevention and treatment by potential natural products. **Chemico-Biological Interactions**, [S. l.], v. 368, p. 110170, 2022. DOI: 10.1016/j.cbi.2022.110170. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279722003751>.

JABBARZADEH KABOLI, Parham; LEONG, Melody Pui-Yee; ISMAIL, Patimah; LING, King-Hwa. Antitumor effects of berberine against EGFR, ERK1/2, P38 and AKT in MDA-MB231 and MCF-7 breast cancer cells using molecular modelling and in vitro study. **Pharmacological Reports**, [S. l.], v. 71, n. 1, p. 13–23, 2019. DOI: 10.1016/j.pharep.2018.07.005. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S173411401730676X>.

JAIN, Nitin et al. Ibrutinib and Venetoclax for First-Line Treatment of CLL. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 380, n. 22, p. 2095–2103, 2019. DOI: 10.1056/NEJMoa1900574. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1900574>.

JAN, Rehmat; CHAUDHRY, Gul-e-Saba. Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, [S. l.], v. 9, n. 2, p. 205–218, 2019. DOI: 10.15171/apb.2019.024. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.15171/jcvtr.2015.24>.

JANG, Hyunbum; SMITH, Iris Nira; ENG, Charis; NUSSINOV, Ruth. The mechanism of full activation of tumor suppressor PTEN at the phosphoinositide-enriched membrane. **iScience**, [S. l.], v. 24, n. 5, 2021. DOI: 10.1016/j.isci.2021.102438.

JAYAMOHANAN, Rakhe. Confocal microscopy – Working principle and applications in dermatology. **Journal of Skin and Sexually Transmitted Diseases**, [S. l.], v. 5, p. 81, 2022. DOI: 10.25259/JSSTD_23_2022. Disponível em: <https://jsstd.org/confocal-microscopy-working-principle-and-applications-in-dermatology/>.

JENKINS, Laura J. et al. Dual MAPK and HDAC inhibition rewires the apoptotic rheostat to trigger colorectal cancer **cell death**, 2021. DOI: 10.1101/2021.02.15.431252. Disponível em: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.02.15.431252>.

JIANG, Wei; JI, Meiju. Receptor tyrosine kinases in PI3K signaling: The therapeutic targets in cancer. **Seminars in Cancer Biology**. Academic Press, , 2019. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.03.006.

JIMI, Eijiro; HUANG, Fei; NAKATOMI, Chihiro. NF-κB Signaling Regulates Physiological and Pathological Chondrogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 24, p. 6275, 2019. DOI: 10.3390/ijms20246275. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/24/6275>.

JONES, Jeffrey A. et al. Venetoclax for chronic lymphocytic leukaemia progressing after ibrutinib: an interim analysis of a multicentre, open-label, phase 2 trial. **The Lancet Oncology**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 65–75, 2018. DOI: 10.1016/S1470-2045(17)30909-9. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470204517309099>.

KALKAVAN, Halime; GREEN, Douglas R. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. **Cell Death & Differentiation**, [S. l.], v. 25, n. 1, p. 46–55, 2018. DOI: 10.1038/cdd.2017.179. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2017.179>.

KALONI, Deeksha; DIEPSTRATEN, Sarah T.; STRASSER, Andreas; KELLY, Gemma L. BCL-2 protein family: attractive targets for cancer therapy. **Apoptosis Springer**, , 2023. DOI: 10.1007/s10495-022-01780-7.

KAMDAR, Rahul D. et al. NF- κ B Signaling Modulates miR-452-5p and miR-335-5p Expression to Functionally Decrease Epithelial Ovarian Cancer Progression in Tumor-Initiating Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 24, n. 9, 2023. DOI: 10.3390/ijms24097826.

KANDA, Yuki; MIZUNO, Ayami; TAKASAKI, Teruaki; SATOH, Ryosuke; HAGIHARA, Kanako; MASUKO, Takashi; ENDO, Yuichi; TANABE, Genzoh; SUGIURA, Reiko. Down-regulation of dual-specificity phosphatase 6, a negative regulator of oncogenic ERK signaling, by ACA-28 induces apoptosis in NIH/3T3 cells overexpressing HER2/ErbB2. **Genes to Cells**, [S. l.], v. 26, n. 2, p. 109–116, 2021. DOI: 10.1111/gtc.12823. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/gtc.12823>.

KAROL, Seth E. et al. Venetoclax in combination with cytarabine with or without idarubicin in children with relapsed or refractory acute myeloid leukaemia: a phase 1, dose-escalation study. **The Lancet Oncology**, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 551–560, 2020. DOI: 10.1016/S1470-2045(20)30060-7. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470204520300607>.

KATOCH, Swati; PATIAL, Vikram. Zebrafish: An emerging model system to study liver diseases and related drug discovery. **Journal of Applied Toxicology**, [S. l.], v. 41, n. 1, p. 33–51, 2021. DOI: 10.1002/jat.4031.

KAYA, Selçuk. Evaluation of Current Therapeutic Approach to Obstructive and Perforated Colorectal Cancers. **Turkish Journal of Trauma and Emergency Surgery**, [S. l.], v. 25, n. 6, p. 589–596, 2019. DOI: 10.14744/tjtes.2019.03828. Disponível em: https://jag.journalagent.com/travma/pdfs/UTD_25_6_589_596.pdf.

KCIUK, Mateusz; GIELECÍŃSKA, Adrianna; MUJWAR, Somduitt; KOŁAT, Damian; KAŁUZIŃSKA-KOŁAT, Żaneta; CELIK, Ismail; KONTEK, Renata. Doxorubicin—An Agent with Multiple Mechanisms of Anticancer Activity. **Cells**, [S. l.], v. 12, n. 4, p. 659, 2023. DOI: 10.3390/cells12040659. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/12/4/659>.

KHAN, Riaz A. Natural products chemistry: The emerging trends and prospective goals. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [S. l.], v. 26, n. 5, p. 739–753, 2018. DOI: 10.1016/j.jsps.2018.02.015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.02.015>.

KIM, Eun Kyung; CHO, Jae Hee; KIM, Eui Joo; KIM, Yoon Jae. Ursodeoxycholic acid inhibits the proliferation of colon cancer cells by regulating oxidative stress and cancer stem-like cell growth. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 12, n. 7, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0181183.

KIRTONIA, Anuradha; SETHI, Gautam; GARG, Manoj. The multifaceted role of reactive oxygen species in tumorigenesis. **Cellular and Molecular Life Sciences**. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, , 2020. DOI: 10.1007/s00018-020-03536-5.

KLIESER; MAYR; KIESSLICH; WISSNIOWSKI; FAZIO; NEUREITER; OCKER. The Crosstalk of miRNA and Oxidative Stress in the Liver: From Physiology to Pathology and Clinical Implications. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 21, p. 5266, 2019. DOI: 10.3390/ijms20215266. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/21/5266>.

KOENIG, Jeffrey A.; DAO, Thuy L.; KAN, Robert K.; SHIH, Tsung-Ming. Zebrafish as a model for acetylcholinesterase-inhibiting organophosphorus agent exposure and oxime reactivation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [S. l.], v. 1374, n. 1, p. 68–77, 2016. DOI: 10.1111/nyas.13051. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/nyas.13051>.

KOGURE, Kazunari; YAMAZAKI, Michio; TAMAKI, Tomonori; NODE, Yoji; MORITA, Akio. Neck and Occipital Pain Caused by Deep Cervical Intramuscular Lipoma: A Surgical Case. **Journal of Nippon Medical School**, [S. l.], v. 84, n. 2, p. 96–99, 2017. DOI: 10.1272/jnms.84.96. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jnms/84/2/84_96/_article.

KOVVURI, Jeshma; NAGARAJU, Burri; NAYAK, V. Lakshma; AKUNURI, Ravikumar; RAO, M. P. Narasimha; AJITHA, Ayyappan; NAGESH, Narayan; KAMAL, Ahmed. Design, synthesis and biological evaluation of new β -carboline-bisindole compounds as DNA binding, photocleavage agents and topoisomerase I inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 143, p. 1563–1577, 2018. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.10.054. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.10.054>.

KRASTEVA, Natalia; GEORGIEVA, Milena. Promising Therapeutic Strategies for Colorectal Cancer Treatment Based on Nanomaterials. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 14, n. 6, p. 1213, 2022. DOI: 10.3390/pharmaceutics14061213. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4923/14/6/1213>.

KUDARAVALLI, Sriya; DEN HOLLANDER, Petra; MANI, Sendurai A. Role of p38 MAP kinase in cancer stem cells and metastasis. **Oncogene**, [S. l.], v. 41, n. 23, p. 3177–3185, 2022. DOI: 10.1038/s41388-022-02329-3. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41388-022-02329-3>.

KUKOWSKA, Monika. 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**, [S. l.], v. 109, p. 587–615, 2017. DOI: 10.1016/j.ejps.2017.08.027. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2017.08.027>.

KULLANDER, Sven; RAHMAN, Md. Mizanur; NORÉN, Michael; MOLLAH, Abdur Rob. Laubuka tenella, a new species of cyprinid fish from southeastern Bangladesh

and southwestern Myanmar (Teleostei, Cyprinidae, Danioninae). **ZooKeys**, [S. l.], v. 742, n. 742, p. 105–126, 2018. DOI: 10.3897/zookeys.742.22510. Disponível em: <https://zookeys.pensoft.net/articles.php?id=22510>.

KUMAR, Rajesh; SHARMA, Ankita; SHARMA, Sarita; SILAKARI, Om; SINGH, Mandeep; KAUR, Manmeet. Synthesis, characterization and antitumor activity of 2-methyl-9-substituted acridines. **Arabian Journal of Chemistry**, [S. l.], v. 10, p. S956–S963, 2017. DOI: 10.1016/j.arabjc.2012.12.035. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.12.035>.

KUMAR, Sonu; SINGH, Rajveer; DUTTA, Debrupa; CHANDEL, Shivani; BHATTACHARYA, Arka; RAVICHANDIRAN, Velayutham; SUKLA, Soumi. In Vitro Anticancer Activity of Methanolic Extract of Justicia adhatoda Leaves with Special Emphasis on Human Breast Cancer Cell Line. **Molecules**, [S. l.], v. 27, n. 23, p. 8222, 2022. DOI: 10.3390/molecules27238222. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/23/8222>.

KUMARI, Ratna; CHOUHAN, Surbhi; SINGH, Snahlata; CHHIPA, Rishi Raj; AJAY, Amrendra Kumar; BHAT, Manoj Kumar. Constitutively activated ERK sensitizes cancer cells to doxorubicin: Involvement of p53-EGFR-ERK pathway. **Journal of Biosciences**, [S. l.], v. 42, n. 1, p. 31–41, 2017. DOI: 10.1007/s12038-017-9667-8. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12038-017-9667-8>.

KUMARI, Seema; BADANA, Anil Kumar; G, Murali Mohan; G, Shailender; MALLA, RamaRao. Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival. **Biomarker Insights**, [S. l.], v. 13, 2018. DOI: 10.1177/1177271918755391. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1177271918755391>.

KURNIAWAN, Yehezkiel Steven; PRIYANGGA, Krisfian Tata Aneka; JUMINA; PRANOWO, Harno Dwi; SHOLIKHAH, Eti Nurwening; ZULKARNAIN, Abdul Karim; FATIMI, Hana Anisa; JULIANUS, Jeffry. An Update on the Anticancer Activity of Xanthone Derivatives: A Review. **Pharmaceuticals**, [S. l.], v. 14, n. 11, p. 1144, 2021. DOI: 10.3390/ph14111144. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1424-8247/14/11/1144>.

KUROWSKA, P.; MLYCZYNSKA, E.; RAK, Agnieszka. Effect of ghrelin on the apoptosis of various cells. A critical review. **Journal of Physiology and Pharmacology**, [S. l.], v. 70, n. 1, p. 1–11, 2019. DOI: 10.26402/jpp.2019.1.02.

LAI, Yu-Chiang; LIU, Yang; JACOBS, Roxane; RIDER, Mark H. A novel PKB/Akt inhibitor, MK-2206, effectively inhibits insulin-stimulated glucose metabolism and protein synthesis in isolated rat skeletal muscle. **Biochemical Journal**, [S. l.], v. 447, n. 1, p. 137–147, 2012. DOI: 10.1042/BJ20120772. Disponível em: <https://portlandpress.com/biochemj/article/447/1/137/81640/A-novel-PKB-Akt-inhibitor-MK-2206-effectively>.

LE GOUILL, Steven et al. Ibrutinib, obinutuzumab, and venetoclax in relapsed and untreated patients with mantle cell lymphoma: a phase 1/2 trial. **Blood**, [S. l.], v. 137, n. 7, p. 877–887, 2021. DOI: 10.1182/blood.2020008727. Disponível em:

<https://ashpublications.org/blood/article/137/7/877/474141/ibrutinib-obinutuzumab-and-venetoclax-in-relapsed>.

LEBEDEVA, Lina; ZHUMABAYEVA, Beibitgul; GEBAUER, Tatyana; KISSELEV, Ilya; AITASHEVA, Zaure. Zebrafish (Danio rerio) as a Model for Understanding the Process of Caudal Fin Regeneration. **Zebrafish**, [S. l.], v. 17, n. 6, p. 359–372, 2020. DOI: 10.1089/zeb.2020.1926.

LEBRAUD, Honorine; WRIGHT, David J.; EAST, Charlotte E.; HOLDING, Finn P.; O'REILLY, Marc; HEIGHTMAN, Tom D. In-gel activity-based protein profiling of a clickable covalent ERK1/2 inhibitor. **Molecular BioSystems**, [S. l.], v. 12, n. 9, p. 2867–2874, 2016. DOI: 10.1039/c6mb00367b.

LEE, Jihyun; SOHN, Eun Jung; YOON, Sang Wook; KIM, Chang Geun; LEE, Sangil; KIM, Joe Young; BAEK, Namin; KIM, Sung-Hoon. Anti-Metastatic Effect of Dehydrocorydaline on H1299 Non-Small Cell Lung Carcinoma Cells via Inhibition of Matrix Metalloproteinases and B Cell Lymphoma 2. **Phytotherapy Research**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 441–448, 2017. a. DOI: 10.1002/ptr.5766. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ptr.5766>.

LEE, Kuan I.; SU, Chin Chuan; YANG, Ching Yao; HUNG, Dong Zong; LIN, Ching Ting; LU, Tien Hui; LIU, Shing Hwa; HUANG, Chun Fa. Etoposide induces pancreatic β -cells cytotoxicity via the JNK/ERK/GSK-3 signaling-mediated mitochondria-dependent apoptosis pathway. **Toxicology in Vitro**, [S. l.], v. 36, p. 142–152, 2016. DOI: 10.1016/j.tiv.2016.07.018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2016.07.018>.

LEE, Shannon; RAUCH, Jens; KOLCH, Walter. Targeting MAPK Signaling in Cancer: Mechanisms of Drug Resistance and Sensitivity. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 3, p. 1102, 2020. a. DOI: 10.3390/ijms21031102. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/3/1102>.

LEE, Shannon; RAUCH, Jens; KOLCH, Walter. Targeting MAPK Signaling in Cancer: Mechanisms of Drug Resistance and Sensitivity. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 3, p. 1102, 2020. b. DOI: 10.3390/ijms21031102. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/3/1102>.

LEE, Yuan Chin; CHEN, Ying Jung; HUANG, Chia Hui; CHANG, Long Sen. Amsacrine-induced apoptosis of human leukemia U937 cells is mediated by the inhibition of AKT- and ERK-induced stabilization of MCL1. **Apoptosis**, [S. l.], v. 22, n. 3, p. 406–420, 2017. b. DOI: 10.1007/s10495-016-1307-5. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10495-016-1307-5>.

LEIPHRAKPAM, Premila; ARE, Chandrakanth. PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway as a Target for Colorectal Cancer Treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 25, n. 6, p. 3178, 2024. DOI: 10.3390/ijms25063178. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/25/6/3178>.

LEOWATTANA, Wattana; LEOWATTANA, Pathomthep; LEOWATTANA, Tawitthep. Systemic treatment for metastatic colorectal cancer. **World Journal of**

Gastroenterology, [S. l.], v. 29, n. 10, p. 1569–1588, 2023. DOI: 10.3748/wjg.v29.i10.1569. Disponível em: <https://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v29/i10/1569.htm>.

LI, Fengwei et al. Cyclic peptides discriminate BCL-2 and its clinical mutants from BCL-XL by engaging a single-residue discrepancy. **Nature Communications**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 1476, 2024. DOI: 10.1038/s41467-024-45848-1. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-024-45848-1>.

LI, Jia Nan; WANG, Qiu Hong; WANG, Zhi Bin; CUI, Na; YANG, Bing You; NIU, Wen Ying; KUANG, Hai Xue. Tetrandrine inhibits colon carcinoma HT-29 cells growth via the Bcl-2/Caspase 3/PARP pathway and G1/S phase. **Bioscience Reports**, [S. l.], v. 39, n. 5, 2019. DOI: 10.1042/BSR20182109.

LI, Mingxue; WANG, Dun; HE, Jianhua; CHEN, Lixia; LI, Hua. Bcl-XL: A multifunctional anti-apoptotic protein. **Pharmacological Research**, [S. l.], v. 151, p. 104547, 2020. DOI: 10.1016/j.phrs.2019.104547. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043661819314847>.

LIANG, Fan; REN, Chunxia; WANG, Jingshu; WANG, Shuoer; YANG, Lina; HAN, Xianghui; CHEN, Yaping; TONG, Guoqing; YANG, Gong. The crosstalk between STAT3 and p53/RAS signaling controls cancer cell metastasis and cisplatin resistance via the Slug/MAPK/PI3K/AKT-mediated regulation of EMT and autophagy. **Oncogenesis**, [S. l.], v. 8, n. 10, p. 59, 2019. DOI: 10.1038/s41389-019-0165-8. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41389-019-0165-8>.

LIANG, Yiran et al. HSPB1 facilitates chemoresistance through inhibiting ferroptotic cancer cell death and regulating NF- κ B signaling pathway in breast cancer. **Cell Death and Disease**, [S. l.], v. 14, n. 7, 2023. DOI: 10.1038/s41419-023-05972-0.

LIAO, Li; GONG, Lihong; ZHOU, Mengting; XUE, Xinyan; LI, Yunxia; PENG, Cheng. Leonurine Ameliorates Oxidative Stress and Insufficient Angiogenesis by Regulating the PI3K/Akt-eNOS Signaling Pathway in H₂O₂-Induced HUVECs. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [S. l.], v. 2021, 2021. DOI: 10.1155/2021/9919466.

LIN, Han Syuan et al. Identification of novel anti-liver cancer small molecules with better therapeutic index than sorafenib via zebrafish drug screening platform. **Cancers**, [S. l.], v. 11, n. 6, 2019. DOI: 10.3390/cancers11060739.

LISBOA, Thaís et al. Toxicity and Antitumor Activity of a Thiophene–Acridine Hybrid. **Molecules**, [S. l.], v. 25, n. 1, p. 64, 2019. DOI: 10.3390/molecules25010064. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/1/64>.

LIU, Fangzhou; ZHAO, Yike; PEI, Yiran; LIAN, Fengyu; LIN, Hui. Role of the NF- κ B signalling pathway in heterotopic ossification: biological and therapeutic significance. **Cell Communication and Signaling**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 159, 2024. DOI: 10.1186/s12964-024-01533-w. Disponível em: <https://biosignaling.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12964-024-01533-w>.

LIU, Feifei; YANG, Xiaotong; GENG, Meiyu; HUANG, Min. Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 552–562, 2018. DOI: 10.1016/j.apsb.2018.01.008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2018.01.008>.

LIU, Mei et al. Synthesis and SAR of 1,9-dihydro-9-hydroxypyrazolo[3,4-b]quinolin-4-ones as novel, selective c-Jun N-terminal kinase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S. l.], v. 16, n. 10, p. 2590–2594, 2006. DOI: 10.1016/j.bmcl.2006.02.046. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960894X06002307>.

LIU, Xin et al. Pegylated Liposomal Doxorubicin Combined with Ifosfamide for Treating Advanced or Metastatic Soft-tissue Sarcoma: A Prospective, Single-arm Phase II Study. **Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 28, n. 24, p. 5280–5289, 2022. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-22-1785. Disponível em: <https://aacrjournals.org/clincancerres/article/28/24/5280/711438/Pegylated-Liposomal-Doxorubicin-Combined-with>.

LIU, Zewen; ZHOU, Tingyang; ZIEGLER, Alexander C.; DIMITRION, Peter; ZUO, Li. **Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications**. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity** Hindawi Limited, , 2017. a. DOI: 10.1155/2017/2525967.

LIU, Zewen; ZHOU, Tingyang; ZIEGLER, Alexander C.; DIMITRION, Peter; ZUO, Li. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [S. l.], v. 2017, n. 1, 2017. b. DOI: 10.1155/2017/2525967. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2017/2525967>.

LUCANTONI, Federico; SALVUCCI, Manuela; DÜSSMANN, Heiko; LINDNER, Andreas U.; LAMBRECHTS, Diether; PREHN, Jochen H. M. BCL(X)L and BCL2 increase the metabolic fitness of breast cancer cells: a single-cell imaging study. **Cell Death & Differentiation**, [S. l.], v. 28, n. 5, p. 1512–1531, 2021. DOI: 10.1038/s41418-020-00683-x. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41418-020-00683-x>.

LUCIANÒ, Anna Maria; PÉREZ-OLIVA, Ana B.; MULERO, Victoriano; DEL BUFALO, Donatella. Bcl-xL: A Focus on Melanoma Pathobiology. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 22, n. 5, p. 2777, 2021. DOI: 10.3390/ijms22052777. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/5/2777>.

MAHARATI, Amirhosein; MOGHBELI, Meysam. PI3K/AKT signaling pathway as a critical regulator of epithelial-mesenchymal transition in colorectal tumor cells. **Cell Communication and Signaling**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 201, 2023. DOI: 10.1186/s12964-023-01225-x. Disponível em: <https://biosignaling.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12964-023-01225-x>.

MAIK-RACHLINE, Galia; HACOEN-LEV-RAN, Avital; SEGER, Rony. Nuclear ERK: Mechanism of Translocation, Substrates, and Role in Cancer. **International Journal**

of **Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 5, p. 1194, 2019. DOI: 10.3390/ijms20051194. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/5/1194>.

MAIK-RACHLINE, Galia; WORTZEL, Inbal; SEGER, Rony. Alternative Splicing of MAPKs in the Regulation of Signaling Specificity. **Cells**, [S. l.], v. 10, n. 12, p. 3466, 2021. DOI: 10.3390/cells10123466. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/10/12/3466>.

MAJTNEROVÁ, Pavlína; ROUŠAR, Tomáš. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. **Molecular Biology Reports**, [S. l.], v. 45, n. 5, p. 1469–1478, 2018. DOI: 10.1007/s11033-018-4258-9. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-018-4258-9>.

MALKI, Ahmed; ELBAYAA, Rasha Y.; ASHOUR, Hayam M. A.; LOFFREDO, Christopher A.; YOUSSEF, Amal M. Novel thiosemicarbazides induced apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells via JNK signaling. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 30, n. 5, p. 786–795, 2015. DOI: 10.3109/14756366.2014.971781. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/14756366.2014.971781>.

MANGUEIRA, Vivianne Mendes et al. A new acridine derivative induces cell cycle arrest and antiangiogenic effect on Ehrlich ascites carcinoma model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 90, p. 253–261, 2017. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.03.049. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332216312562>.

MANGUEIRA, Vivianne Mendes. Efeitos antitumoral e antinociceptivo do n'-(6-cloro-2-metoxiacridin- 9-il)-2-cianoacetohidrazide (ACS-AZ), um novo derivado acridínico. **Tese de Doutorado. Universidade Federal da Paraíba**, [S. l.], p. 144, 2019.

MARTÍNEZ-LIMÓN, Adrián; JOAQUIN, Manel; CABALLERO, María; POSAS, Francesc; DE NADAL, Eulàlia. The p38 Pathway: From Biology to Cancer Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 6, p. 1913, 2020. DOI: 10.3390/ijms21061913. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/6/1913>.

MATULIS, S. M.; GUPTA, V. A.; NOOKA, A. K.; HOLLEN, H. V.; KAUFMAN, J. L.; LONIAL, S.; BOISE, L. H. Dexamethasone treatment promotes Bcl-2 dependence in multiple myeloma resulting in sensitivity to venetoclax. **Leukemia**, [S. l.], v. 30, n. 5, p. 1086–1093, 2016. DOI: 10.1038/leu.2015.350. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/leu2015350>.

MATULIS, Shannon M.; BOISE, Lawrence H. BCL2 dependency in diffuse large B-cell lymphoma: it's a family affair. **Haematologica**, [S. l.], v. 105, n. 8, p. 1993–1996, 2020. DOI: 10.3324/haematol.2020.253591. Disponível em: <http://www.haematologica.org/lookup/doi/10.3324/haematol.2020.253591>.

MELLO, Marianne Regina Silva Potengy De; MOURA, Silmara Fernandes; MUZI, Camila Drumond; GUIMARÃES, Raphael Mendonça. CLINICAL EVALUATION AND PATTERN OF SYMPTOMS IN COLORECTAL CANCER PATIENTS. **Arquivos de Gastroenterologia**, [S. l.], v. 57, n. 2, p. 131–136, 2020. DOI: 10.1590/s0004-

2803.202000000-24. Disponível em:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-28032020000200131&tlng=en.

MENEZES, Thaís Meira; DE ALMEIDA, Sinara Mônica Vitalino; DE MOURA, Ricardo Olímpio; SEABRA, Gustavo; DE LIMA, Maria do Carmo Alves; NEVES, Jorge Luiz. Spiro-acridine inhibiting tyrosinase enzyme: Kinetic, protein-ligand interaction and molecular docking studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 122, p. 289–297, 2019. a. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.175. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.175>.

MENEZES, Thaís Meira; DE ALMEIDA, Sinara Mônica Vitalino; DE MOURA, Ricardo Olímpio; SEABRA, Gustavo; DE LIMA, Maria do Carmo Alves; NEVES, Jorge Luiz. Spiro-acridine inhibiting tyrosinase enzyme: Kinetic, protein-ligand interaction and molecular docking studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 122, n. 4, p. 289–297, 2019. b. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.175. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2018.01197/full>.

MERINO, Delphine; KELLY, Gemma L.; LESSENE, Guillaume; WEI, Andrew H.; ROBERTS, Andrew W.; STRASSER, Andreas. **BH3-Mimetic Drugs: Blazing the Trail for New Cancer Medicines**. Cancer Cell Press, , 2018. DOI: 10.1016/j.ccell.2018.11.004.

MIKUŁA-PIETRASIK, Justyna; WITUCKA, Anna; PAKUŁA, Martyna; URUSKI, Paweł; BEGIER-KRASIŃSKA, Beata; NIKLAS, Arkadiusz; TYKARSKI, Andrzej; KSIAŻEK, Krzysztof. **Comprehensive review on how platinum- and taxane-based chemotherapy of ovarian cancer affects biology of normal cells**. **Cellular and Molecular Life Sciences** Birkhauser Verlag AG, , 2019. DOI: 10.1007/s00018-018-2954-1.

MILKOVIC, Lidija; GASPAROVIC, Ana Cipak; CINDRIC, Marina; MOUTHUY, Pierre Alexis; ZARKOVIC, Neven. **Short overview of ROS as cell function regulators and their implications in therapy concepts**. **CellsMDPI**, , 2019. DOI: 10.3390/cells8080793.

MITALA, Athanasia; TSALIKIDIS, Christos; PITIAKOUDIS, Michail; SIMOPOULOS, Constantinos; TSAROUCHEA, Alexandra K. **Artificial intelligence in colorectal cancer screening, diagnosis and treatment. A new era**. **Current OncologyMDPI**, , 2021. DOI: 10.3390/curroncol28030149.

MOHAMMAD REZA, Zinatizadeh; ZAHRA, Masoumalinejad; AZIM, Nejatizadeh; MOHAMMAD, Shekari; FARZANEH, Parnak; FAEGHE, Zaree. A Review of NEMO Protein and its Relationship with Genetic Diseases. **Journal of Genetics and Genome Research**, [S. l.], v. 5, n. 1, 2018. DOI: 10.23937/2378-3648/1410033. Disponível em: <https://www.clinmedjournals.org/articles/jggr/journal-of-genetics-and-genome-research-jggr-5-033.php?jid=jggr>.

MOHEBALI, Nooshin; PANDURANGAN, Ashok Kumar; MUSTAFA, Mohd Rais; ANANDASADAGOPAN, Suresh Kumar; ALAGUMUTHU, Tamilselvi. Vernodalin induces apoptosis through the activation of ROS/JNK pathway in human colon

cancer cells. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, [S. l.], v. 34, n. 12, 2020. DOI: 10.1002/jbt.22587.

MOLL, Franziska et al. NoxO1 controls proliferation of colon epithelial cells. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 9, n. MAY, 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00973.

MOLONEY, Jennifer N.; COTTER, Thomas G. ROS signalling in the biology of cancer. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, [S. l.], v. 80, p. 50–64, 2018. DOI: 10.1016/j.semcdb.2017.05.023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.05.023>.

MORALES-MARTÍNEZ, Mario; VEGA, Mario I. Roles and Regulation of BCL-xL in Hematological Malignancies. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 23, n. 4, p. 2193, 2022. DOI: 10.3390/ijms23042193. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/4/2193>.

MORGAN, Dhakshayini; GARG, Manoj; TERGAONKAR, Vinay; TAN, Soo Yong; SETHI, Gautam. Pharmacological significance of the non-canonical NF-κB pathway in tumorigenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, [S. l.], v. 1874, n. 2, p. 188449, 2020. DOI: 10.1016/j.bbcan.2020.188449. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304419X20301682>.

NAGATA, Shigekazu. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. **Annual Review of Immunology**, [S. l.], v. 36, n. 1, p. 489–517, 2018. DOI: 10.1146/annurev-immunol-042617-053010. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-042617-053010>.

NAKAYAMA, Joji; MAKINOSHIMA, Hideki. Zebrafish-Based Screening Models for the Identification of Anti-Metastatic Drugs. **Molecules**, [S. l.], v. 25, n. 10, p. 2407, 2020. DOI: 10.3390/molecules25102407. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/10/2407>.

NAPOLI, Marco; FLORES, Elsa R. The p53 family reaches the final frontier: the variegated regulation of the dark matter of the genome by the p53 family in cancer. **RNA Biology**, [S. l.], v. 17, n. 11, p. 1636–1647, 2020. DOI: 10.1080/15476286.2019.1710054. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1710054>.

NASR, Fahd A.; SHAHAT, Abdelaaty A.; ALQAHTANI, Ali S.; AHMED, Mohammad Z.; QAMAR, Wajhul; AL-MISHARI, Abdullah A.; ALMOQBIL, Abdulaziz N. Centaurea bruguierana inhibits cell proliferation, causes cell cycle arrest, and induces apoptosis in human MCF-7 breast carcinoma cells. **Molecular Biology Reports**, [S. l.], v. 47, n. 8, p. 6043–6051, 2020. DOI: 10.1007/s11033-020-05679-x. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s11033-020-05679-x>.

NEGI, Ram Rattan; RANA, Satya Vati; GUPTA, Rajesh; GUPTA, Vikas; CHADHA, Vijayta D.; DHAWAN, Devinder K. Increased Nuclear Factor-κB/RelA Expression Levels in Human Colorectal Carcinoma in North Indian Patients. **Indian Journal of**

Clinical Biochemistry, [S. l.], v. 33, n. 4, p. 473–478, 2018. DOI: 10.1007/s12291-017-0703-0. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12291-017-0703-0>.

NICULESCU, Adelina-Gabriela; GRUMEZESCU, Alexandru Mihai. Novel Tumor-Targeting Nanoparticles for Cancer Treatment—A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 23, n. 9, p. 5253, 2022. DOI: 10.3390/ijms23095253. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/9/5253>.

NUNHART, Patrik et al. Fluorinated 3,6,9-trisubstituted acridine derivatives as DNA interacting agents and topoisomerase inhibitors with A549 antiproliferative activity. **Bioorganic Chemistry**, [S. l.], v. 94, p. 103393, 2020. DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.103393. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045206819314919>.

OBENG, E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. **Brazilian Journal of Biology**, [S. l.], v. 81, n. 4, p. 1133–1143, 2021. DOI: 10.1590/1519-6984.228437. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842021000401133&tlng=en.

OISHI, Naoki. Precursory or early lesions of follicular lymphoma: clinical features, pathology, and genetics. **Journal of Clinical and Experimental Hematopathology**, [S. l.], v. 63, n. 2, p. 23010, 2023. DOI: 10.3960/jslrt.23010. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jslrt/63/2/63_23010/_article.

OLIVEIRA, Maiara de S. et al. A novel platinum complex containing a piplartine derivative exhibits enhanced cytotoxicity, causes oxidative stress and triggers apoptotic cell death by ERK/p38 pathway in human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells. **Redox Biology**, [S. l.], v. 20, p. 182–194, 2019. DOI: 10.1016/j.redox.2018.10.006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213231718305512>.

PACHECO-PÉREZ, Luis Arturo; RUÍZ-GONZÁLEZ, Karla Judith; DE-LA-TORRE-GÓMEZ, Aldo César Gómez; GUEVARA-VALTIER, Milton Carlos; RODRÍGUEZ-PUENTE, Linda Azucena; GUTIÉRREZ-VALVERDE, Juana Mercedes. Fatores ambientais e conscientização sobre o câncer colorretal em pessoas com risco familiar. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, [S. l.], v. 27, 2019. DOI: 10.1590/1518-8345.3082.3195. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-11692019000100375&tlng=pt.

PARK, Hong-Beom; BAEK, Kwang-Hyun. E3 ligases and deubiquitinating enzymes regulating the MAPK signaling pathway in cancers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, [S. l.], v. 1877, n. 3, p. 188736, 2022. DOI: 10.1016/j.bbcan.2022.188736. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304419X22000610>.

PARK, Seojeong; KADAYAT, Tara Man; JUN, Kyu-Yeon; THAPA MAGAR, Til Bahadur; BIST, Ganesh; SHRESTHA, Aarajana; LEE, Eung-Seok; KWON, Youngjoo. Novel 2-aryl-4-(4'-hydroxyphenyl)-5H-indeno[1,2-b]pyridines as potent

DNA non-intercalative topoisomerase catalytic inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 125, p. 14–28, 2017. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.09.019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.09.019>.

PARRONDO, Ricardo D.; PAULUS, Aneel; AILAWADHI, Sikander. Updates in the Use of BCL-2-Family Small Molecule Inhibitors for the Treatment of Relapsed/Refractory Multiple Myeloma. **Cancers**, [S. l.], v. 14, n. 14, p. 3330, 2022. DOI: 10.3390/cancers14143330. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/14/14/3330>.

PASHIRZAD, Mehran et al. The Therapeutic Potential of MAPK/ERK Inhibitors in the Treatment of Colorectal Cancer. **Current Cancer Drug Targets**, [S. l.], v. 21, n. 11, p. 932–943, 2021. DOI: 10.2174/1568009621666211103113339. Disponível em: <https://www.eurekaselect.com/197646/article>.

PATEL, Sangita B.; CAMERON, Patricia M.; FRANTZ-WATTLEY, Betsy; O'NEILL, Edward; BECKER, Joseph W.; SCAPIN, Giovanna. Lattice stabilization and enhanced diffraction in human p38 α crystals by protein engineering. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, [S. l.], v. 1696, n. 1, p. 67–73, 2004. DOI: 10.1016/j.bbapap.2003.09.009. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570963903002954>.

PEDROSA, Leire; ESPOSITO, Francis; THOMSON, Timothy M.; MAUREL, Joan. The tumor microenvironment in colorectal cancer therapy. **Cancers**. MDPI AG, , 2019. DOI: 10.3390/cancers11081172.

PENG, Chao; OUYANG, Yaobin; LU, Nonghua; LI, Nianshuang. The NF- κ B Signaling Pathway, the Microbiota, and Gastrointestinal Tumorigenesis: Recent Advances. **Frontiers in Immunology**. Frontiers Media S.A, 2020. a. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01387.

PETER, Sijongesonke; ALVEN, Sibusiso; MASEKO, Rejoice Bethusile; ADERIBIGBE, Blessing Atim. Doxorubicin-Based Hybrid Compounds as Potential Anticancer Agents: A Review. **Molecules**, [S. l.], v. 27, n. 14, p. 4478, 2022. DOI: 10.3390/molecules27144478. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/14/4478>.

PETROVA, Varvara; ANNICCHIARICO-PETRUZZELLI, Margherita; MELINO, Gerry; AMELIO, Ivano. The hypoxic tumour microenvironment. **Oncogenesis**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 10, 2018. DOI: 10.1038/s41389-017-0011-9. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41389-017-0011-9>.

PFLUG, Kathryn M.; SITCHERAN, Raquel. Targeting NF- κ B-inducing kinase (NIK) in immunity, inflammation, and cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 22, p. 1–19, 2020. DOI: 10.3390/ijms21228470.

PICARDI, Marco et al. Liposomal doxorubicin supercharge-containing front-line treatment in patients with advanced-stage diffuse large B-cell lymphoma or classical Hodgkin lymphoma: Preliminary results of a single-centre phase II study. **British**

Journal of Haematology, [S. l.], v. 198, n. 5, p. 847–860, 2022. DOI: 10.1111/bjh.18348. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bjh.18348>.

PINZI, Luca; RASTELLI, Giulio. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 18, p. 4331, 2019. DOI: 10.3390/ijms20184331. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/18/4331>.

PIRES, Maria Eugênia de Paula; MEZZOMO, Delize Silva; LEITE, Fernanda Moema Mendes; LUCENA, Talytta Marinho De; SILVA, Juliana da Silva e; PINHEIRO, Maria Jessica Alves; VARGAS, Larissa Jardim; QUINTAIROS, Mídia Quaresma; OLIVEIRA, Marcela Carvalho. Rastreamento do Câncer Colorretal: Revisão de literatura / Colorectal Cancer Screening: Literature Review. **Brazilian Journal of Health Review**, [S. l.], v. 4, n. 2, p. 6866–6881, 2021. DOI: 10.34119/bjhrv4n2-233. Disponível em: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BJHR/article/view/27362/21657>.

PISTRITTO, Giuseppa; TRISCIUOGLIO, Daniela; CECI, Claudia; GARUFI, Alessia; D'ORAZI, Gabriella. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. **Aging**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 603–619, 2016. DOI: 10.18632/aging.100934. Disponível em: <https://www.aging-us.com/lookup/doi/10.18632/aging.100934>.

PORTER, John et al. Tetrahydroisoquinoline amide substituted phenyl pyrazoles as selective Bcl-2 inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 230–233, 2009. DOI: 10.1016/j.bmcl.2008.10.113. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960894X08013310>.

POUS, Joan et al. Structural basis of a redox-dependent conformational switch that regulates the stress kinase p38 α . **Nature Communications**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 7920, 2023. DOI: 10.1038/s41467-023-43763-5. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-023-43763-5>.

PRANTEDA, Angelina; PIASTRA, Valentina; STRAMUCCI, Lorenzo; FRATANTONIO, Deborah; BOSSI, Gianluca. The p38 MAPK Signaling Activation in Colorectal Cancer upon Therapeutic Treatments. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 8, p. 2773, 2020. DOI: 10.3390/ijms21082773. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/8/2773>.

PROSSOMARITI, Anna; PIAZZI, Giulia; ALQUATI, Chiara; RICCIARDIELLO, Luigi. **Are Wnt/ β -Catenin and PI3K/AKT/mTORC1 Distinct Pathways in Colorectal Cancer?** CMGHElsevier Inc, , 2020. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2020.04.007.

QIAN, Shanna; WEI, Zhong; YANG, Wanting; HUANG, Jinling; YANG, Yinfeng; WANG, Jinghui. The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. **Frontiers in Oncology**, [S. l.], v. 12, 2022. DOI: 10.3389/fonc.2022.985363. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2022.985363/full>.

QIN, Sida et al. XIAP inhibits mature Smac-induced apoptosis by degrading it through ubiquitination in NSCLC. **International Journal of Oncology**, [S. l.], v. 49, n. 4, p. 1289–1296, 2016. DOI: 10.3892/ijo.2016.3634. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2016.3634>.

RAHIMIAN, Arezoo; MAHDAVI, Majid; RAHBARGHAZI, Reza; CHAROUDEH, Hojjatollah N. 4t-CHQ a Spiro-Quinazolinone Benzenesulfonamide Derivative Induces G0/G1 Cell Cycle arrest and Triggers Apoptosis Through Down-Regulation of Survivin and Bcl2 in the Leukemia Stem-Like KG1-a Cells. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 19, n. 11, p. 1340–1349, 2019. DOI: 10.2174/1871520619666190313165130. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/170703/article>.

RAHMAN, Masum et al. Selective Vulnerability of Senescent Glioblastoma Cells to Bcl-XL Inhibition. , 2020. DOI: 10.1101/2020.06.03.132712. Disponível em: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.06.03.132712>.

RAI, Sachchida Nand; DILNASHIN, Hagera; BIRLA, Hareram; SINGH, Saumitra Sen; ZAHRA, Walia; RATHORE, Aaina Singh; SINGH, Brijesh Kumar; SINGH, Surya Pratap. The Role of PI3K/Akt and ERK in Neurodegenerative Disorders. **Neurotoxicity Research**, [S. l.], v. 35, n. 3, p. 775–795, 2019. DOI: 10.1007/s12640-019-0003-y. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12640-019-0003-y>.

RAMDHANI, Danni; MUSTARICHIE, Resmi. ANTICANCER ACTIVITY OF BREVILIN A BY MOLECULAR DOCKING METHOD. **World Journal of Pharmaceutical Research www.wjpr.net** |, [S. l.], v. 10, n. 2, 2021. DOI: <https://doi.org/10.17605/OSF.IO/PD96M>. Disponível em: <https://doi.org/10.17605/OSF.IO/PD96M>.

RASCIO, Federica; SPADACCINO, Federica; ROCCHETTI, Maria Teresa; CASTELLANO, Giuseppe; STALLONE, Giovanni; NETTI, Giuseppe Stefano; RANIERI, Elena. The pathogenic role of PI3K/AKT pathway in cancer onset and drug resistance: an updated review. **Cancers** MDPI, 2021. DOI: 10.3390/cancers13163949.

REDZA-DUTORDOIR, Maureen; AVERILL-BATES, Diana A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, [S. l.], v. 1863, n. 12, p. 2977–2992, 2016. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2016.09.012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488916302324>.

REN, Xiaoshuang; ZHANG, Lan; ZHANG, Yanning; MAO, Liangang; JIANG, Hongyun. Mitochondria response to camptothecin and hydroxycamptothecine-induced apoptosis in *Spodoptera exigua* cells. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 140, p. 97–104, 2017. DOI: 10.1016/j.pestbp.2017.07.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.07.003>.

REN, Yijing et al. Alantolactone exhibits antiproliferative and apoptosis-promoting properties in colon cancer model via activation of the MAPK-JNK/c-Jun signaling

pathway. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [S. l.], v. 476, n. 12, p. 4387–4403, 2021. DOI: 10.1007/s11010-021-04247-6.

ROBAK, Tadeusz; SMOLEWSKI, Piotr; ROBAK, Pawel; DREYLING, Martin. Mantle cell lymphoma: therapeutic options in transplant-ineligible patients. **Leukemia & Lymphoma**, [S. l.], v. 60, n. 11, p. 2622–2634, 2019. DOI: 10.1080/10428194.2019.1605511. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10428194.2019.1605511>.

ROBERTS, Andrew W.; WEI, Andrew H.; HUANG, David C. S. BCL2 and MCL1 inhibitors for hematologic malignancies. **Blood**, [S. l.], v. 138, n. 13, p. 1120–1136, 2021. DOI: 10.1182/blood.2020006785.

ROUFAYEL, Rabih; YOUNES, Khaled; AL-SABI, Ahmed; MURSHID, Nimer. BH3-Only Proteins Noxa and Puma Are Key Regulators of Induced Apoptosis. **Life MDPI**, 2022. DOI: 10.3390/life12020256.

S. , Prakash S. et al. Bioequivalence of a hybrid pegylated liposomal doxorubicin hydrochloride injection and Caelyx®: A single-dose, randomized, multicenter, open-label, two-period crossover study in patients with advanced ovarian cancer. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 176, p. 106248, 2022. DOI: 10.1016/j.ejps.2022.106248. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928098722001336>.

SAHASRABUDHE, Siddhee A.; TERLUK, Marcia R.; KARTHA, Reena V. N-acetylcysteine Pharmacology and Applications in Rare Diseases—Repurposing an Old Antioxidant. **Antioxidants**, [S. l.], v. 12, n. 7, p. 1316, 2023. DOI: 10.3390/antiox12071316. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-3921/12/7/1316>.

SAJADIMAJD, Soraya; KHAZAEI, Mozafar. Oxidative Stress and Cancer: The Role of Nrf2. **Current Cancer Drug Targets**, [S. l.], v. 18, n. 6, p. 538–557, 2018. DOI: 10.2174/1568009617666171002144228. Disponível em: <https://www.eurekaselect.com/156072/article>.

SALEEM, Suraiya; KANNAN, Rajaretnam Rajesh. Zebrafish: an emerging real-time model system to study Alzheimer's disease and neurospecific drug discovery. **Cell Death Discovery**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 45, 2018. DOI: 10.1038/s41420-018-0109-7. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41420-018-0109-7>.

SALEM, Othman M.; VILKOVÁ, Mária; JANOČKOVÁ, Jana; JENDŽELOVSKÝ, Rastislav; FEDOROČKO, Peter; IMRICH, Ján; KOŽURKOVÁ, Mária. Synthesis, spectral characterization, DNA binding ability and anti-cancer screening of new acridine-based derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, [S. l.], v. 26, n. 10, p. 2309–2321, 2017. DOI: 10.1007/s00044-017-1931-9. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00044-017-1931-9>.

SAMARA, Pinelopi; ATHANASOPOULOS, Michail; MASTRONIKOLIS, Stylianos; KYRODIMOS, Efthymios; ATHANASOPOULOS, Ioannis; MASTRONIKOLIS, Nicholas S. The Role of Oncogenic Viruses in Head and Neck Cancers:

Epidemiology, Pathogenesis, and Advancements in Detection Methods.

Microorganisms, [S. l.], v. 12, n. 7, p. 1482, 2024. DOI:

10.3390/microorganisms12071482. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/12/7/1482>.

SAMRA, Bachar; KONOPLEVA, Marina; ISIDORI, Alessandro; DAVER, Naval; DINARDO, Courtney. Venetoclax-Based Combinations in Acute Myeloid Leukemia: Current Evidence and Future Directions. **Frontiers in Oncology**, [S. l.], v. 10, n. November, p. 1–13, 2020. DOI: 10.3389/fonc.2020.562558.

SANTOS, Jeferson Antônio; NASCIMENTO FILHO, Antonio Carlos Maniglia; HISSAYASSU, Gabriela Yaeko; PIASSA, João Pedro Monteiro; SILVA, Pedro Henrique de Souza Sandim. Câncer colorretal - uma revisão abrangente sobre a epidemiologia, fatores de risco, fisiopatologia, diagnóstico e tratamento. **Brazilian Journal of Health Review**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. e68695, 2024. DOI: 10.34119/bjhrv7n2-294. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJHR/article/view/68695>.

SARASWATHY, Sundra Dhakshinamurthy; MIRUNALINI, Arumugam; KARTHIKEYAN, Kandasamy; PREMKUMAR, Kumpati. BH3 Mimetic Peptides: An Effective Strategy to Complement Anticancer Therapy. **Current Protein & Peptide Science**, [S. l.], v. 24, n. 10, p. 853–864, 2023. DOI: 10.2174/1389203724666230822100131. Disponível em: <https://www.eurekaselect.com/220155/article>.

SATOH, Ryosuke; HAMADA, Naoya; YAMADA, Ami; KANDA, Yuki; ISHIKAWA, Fumihiro; TAKASAKI, Teruaki; TANABE, Genzoh; SUGIURA, Reiko. Discovery of new benzhydrol biscarbonate esters as potent and selective apoptosis inducers of human melanomas bearing the activated ERK pathway: SAR studies on an ERK MAPK signaling modulator, ACA-28. **Bioorganic Chemistry**, [S. l.], v. 103, n. July, p. 104137, 2020. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.104137. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104137>.

SCHERR, Anna Lena et al. Identification of BCL-XL as highly active survival factor and promising therapeutic target in colorectal cancer. **Cell Death and Disease**, [S. l.], v. 11, n. 10, 2020. DOI: 10.1038/s41419-020-03092-7.

SEJIC, Nenad et al. BCL-XL inhibition by BH3-mimetic drugs induces apoptosis in models of Epstein-Barr virus-associated T/NK-cell lymphoma. **Blood advances**, [S. l.], v. 4, n. 19, p. 4775–4787, 2020. DOI: 10.1182/bloodadvances.2020002446. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33017468>.

SEYMOUR, John F. et al. Venetoclax–Rituximab in Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 378, n. 12, p. 1107–1120, 2018. DOI: 10.1056/nejmoa1713976.

SHAH, Seema; BROCK, Ethan J.; JI, Kyungmin; MATTINGLY, Raymond R. Ras and Rap1: A tale of two GTPases. **Seminars in Cancer Biology**, [S. l.], v. 54, n. 3, p. 29–39, 2019. DOI: 10.1016/j.semcancer.2018.03.005. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044579X18300038>.

SHAH, Shailja C.; ITZKOWITZ, Steven H. Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease: Mechanisms and Management. **Gastroenterology**, [S. l.], v. 162, n. 3, p. 715- 730.e3, 2022. DOI: 10.1053/j.gastro.2021.10.035. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508521037070>.

SHAKERI, Raheleh; KHEIROLLAHI, Asma; DAVOODI, Jamshid. Contribution of Apaf-1 to the pathogenesis of cancer and neurodegenerative diseases. **Biochimie**, [S. l.], v. 190, p. 91–110, 2021. DOI: 10.1016/j.biochi.2021.07.004. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908421001784>.

SHANKAR, Eswar; GUPTA, Karishma; GUPTA, Sanjay. Dietary and Lifestyle Factors in Epigenetic Regulation of Cancer. *Em: **Epigenetics of Cancer Prevention***. [s.l.] : Elsevier, 2019. p. 361–394. DOI: 10.1016/B978-0-12-812494-9.00017-2. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-812494-9.00017-2>.

SHARIATI, Maryam; MERIC-BERNSTAM, Funda. Targeting AKT for cancer therapy. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, [S. l.], v. 28, n. 11, p. 977–988, 2019. DOI: 10.1080/13543784.2019.1676726. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13543784.2019.1676726>.

SHARMA, Aditi; BOISE, Lawrence; SHANMUGAM, Mala. Cancer Metabolism and the Evasion of Apoptotic Cell Death. **Cancers**, [S. l.], v. 11, n. 8, p. 1144, 2019. DOI: 10.3390/cancers11081144. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/11/8/1144>.

SHEKOUHI, Ramin; CHIM, Harvey. Patient demographics, tumor characteristics, and outcomes following surgical treatment of benign and malignant brachial plexus tumors: a systematic review. **International Journal of Surgery**, [S. l.], v. 109, n. 4, p. 972–981, 2023. DOI: 10.1097/JS9.0000000000000309. Disponível em: <https://journals.lww.com/10.1097/JS9.0000000000000309>.

SHEN, Chao; ZUO, Zhenghong. Zebrafish (*Danio rerio*) as an excellent vertebrate model for the development, reproductive, cardiovascular, and neural and ocular development toxicity study of hazardous chemicals. **Environmental Science and Pollution Research**, [S. l.], v. 27, n. 35, p. 43599–43614, 2020. DOI: 10.1007/s11356-020-10800-5. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s11356-020-10800-5>.

SHEN, Yamei; XUE, Chunling; LI, Xuechun; BA, Li; GU, Junjie; SUN, Zhao; HAN, Qin; ZHAO, Robert Chunhua. Effects of Gastric Cancer Cell-Derived Exosomes on the Immune Regulation of Mesenchymal Stem Cells by the NF-κB Signaling Pathway. **Stem Cells and Development**, [S. l.], v. 28, n. 7, p. 464–476, 2019. DOI: 10.1089/scd.2018.0125. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/scd.2018.0125>.

SHIN, Alice E.; GIANCOTTI, Filippo G.; RUSTGI, Anil K. Metastatic colorectal cancer: mechanisms and emerging therapeutics. **Trends in Pharmacological Sciences**, [S. l.], v. 44, n. 4, p. 222–236, 2023. DOI: 10.1016/j.tips.2023.01.003. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165614723000184>.

SIDDIQUI, Imtiaz A.; SANNA, Vanna; AHMAD, Nihal; SECHI, Mario; MUKHTAR, Hasan. Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [S. l.], v. 1348, n. 1, p. 20–31, 2015. DOI: 10.1111/nyas.12811. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/nyas.12811>.

SIEGEL, Rebecca L.; MILLER, Kimberly D.; FUCHS, Hannah E.; JEMAL, Ahmedin. Cancer statistics, 2022. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [S. l.], v. 72, n. 1, p. 7–33, 2022. DOI: 10.3322/caac.21708. Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21708>.

SILVA, DAIANA. 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**, [S. l.], p. 182, 2020.

SILVA, Daiana K. Frade et al. Antitumor Effect of a Novel Spiro-Acridine Compound is Associated with Up-Regulation of Th1-Type Responses and Antiangiogenic Action. **Molecules**, [S. l.], v. 25, n. 1, p. 29, 2019. a. DOI: 10.3390/molecules25010029. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/1/29>.

SIMANSHU, Dharendra K.; NISSLEY, Dwight V.; MCCORMICK, Frank. RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. **Cell**, [S. l.], v. 170, n. 1, p. 17–33, 2017. DOI: 10.1016/j.cell.2017.06.009. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867417306505>.

SINHA, Tarini. Tumors: Benign and Malignant. **Cancer therapy & Oncology International Journal**, [S. l.], v. 10, n. 3, 2018. DOI: 10.19080/CTOIJ.2018.10.555790. Disponível em: <https://juniperpublishers.com/ctoj/CTOIJ.MS.ID.555790.php>.

SMITH, Sarah; PREWETT, Sarah. Principles of chemotherapy and radiotherapy. **Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Medicine**, [S. l.], v. 27, n. 7, p. 206–212, 2017. DOI: 10.1016/j.ogrm.2017.04.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ogrm.2017.04.006>.

SNEZHKINA, Anastasiya V.; KUDRYAVTSEVA, Anna V.; KARDYMON, Olga L.; SAVVATEEVA, Maria V.; MELNIKOVA, Nataliya V.; KRASNOV, George S.; DMITRIEV, Alexey A. ROS Generation and Antioxidant Defense Systems in Normal and Malignant Cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [S. l.], v. 2019, p. 1–17, 2019. DOI: 10.1155/2019/6175804. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2019/6175804/>.

SNEZHKINA, Anastasiya V.; KUDRYAVTSEVA, Anna V.; KARDYMON, Olga L.; SAVVATEEVA, Maria V.; MELNIKOVA, Nataliya V.; KRASNOV, George S.; DMITRIEV, Alexey A. ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Hindawi Limited, , 2020. DOI: 10.1155/2019/6175804.

SOARES-SILVA, Mercedes; DINIZ, Flavia F.; GOMES, Gabriela N.; BAHIA, Diana. The Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Pathway: Role in Immune Evasion by

Trypanosomatids. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 7, n. FEB, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00183. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.00183/abstract>.

SOLEIMANI, Atena; RAHMANI, Farzad; FERNS, Gordon A.; RYZHIKOV, Mikhail; AVAN, Amir; HASSANIAN, Seyed Mahdi. Role of the NF- κ B signaling pathway in the pathogenesis of colorectal cancer. **Gene**, [S. l.], v. 726, p. 144132, 2020. DOI: 10.1016/j.gene.2019.144132. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111919307917>.

SOLOMON, V. Raja; ALMNAYAN, Danah; LEE, Hoyun. Design, synthesis and characterization of novel quinacrine analogs that preferentially kill cancer over non-cancer cells through the down-regulation of Bcl-2 and up-regulation of Bax and Bad. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 137, p. 156–166, 2017. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.05.052. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S022352341730421X>.

SOUSA, TATYANNA KÉLVIA GOMES. 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**, [S. l.], p. 175, 2019.

SRINIVAS, Upadhyayula Sai; TAN, Bryce W. Q.; VELLAYAPPAN, Balamurugan A.; JEYASEKHARAN, Anand D. ROS and the DNA damage response in cancer. **Redox Biology**, [S. l.], v. 25, p. 101084, 2019. DOI: 10.1016/j.redox.2018.101084. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213231718309017>.

SRITHARAN, Sruthi; SIVALINGAM, Nageswaran. A comprehensive review on time-tested anticancer drug doxorubicin. **Life Sciences**, [S. l.], v. 278, p. 119527, 2021. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.119527. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320521005129>.

STEFANI, Constantin; MIRICESCU, Daniela; STANESCU-SPINU, Iulia-Ioana; NICA, Remus Iulian; GREABU, Maria; TOTAN, Alexandra Ripszky; JINGA, Mariana. Growth Factors, PI3K/AKT/mTOR and MAPK Signaling Pathways in Colorectal Cancer Pathogenesis: Where Are We Now? **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 22, n. 19, p. 10260, 2021. DOI: 10.3390/ijms221910260. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/19/10260>.

STEINHART, Zachary; ANGERS, Stephane. **Wnt signaling in development and tissue homeostasis. Development (Cambridge, England)**, 2018. DOI: 10.1242/dev.146589.

STRZESZEWSKA, Anna; ALSTER, Olga; MOSIENIAK, Grażyna; CIOLKO, Agata; SIKORA, Ewa. Insight into the role of PIKK family members and NF- κ B in DNA damage-induced senescence and senescence-associated secretory phenotype of colon cancer cells. **Cell Death & Disease**, [S. l.], v. 9, n. 2, p. 44, 2018. DOI: 10.1038/s41419-017-0069-5. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41419-017-0069-5>.

SU, Chin-Chuan et al. Involvement of AMPK α and MAPK-ERK/-JNK Signals in Docetaxel-Induced Human Tongue Squamous Cell Carcinoma Cell Apoptosis. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 23, n. 22, p. 13857, 2022. DOI: 10.3390/ijms232213857. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/22/13857>.

SU, Hua; PENG, Chao; LIU, Yang. **Regulation of ferroptosis by PI3K/Akt signaling pathway: a promising therapeutic axis in cancer**. **Frontiers in Cell and Developmental Biology** Frontiers Media SA, , 2024. DOI: 10.3389/fcell.2024.1372330.

SUBAIEA, Gehad; RIZVI, Syed Mohd Danish; YADAV, Hemant Kumar Singh; AL HAGBANI, Turki; ABDALLAH, Marwa Helmy; KHAFAGY, El-Sayed; GANGADHARAPPA, Hosahalli Veerabhadrapa; HUSSAIN, Talib; ABU LILA, Amr Selim. Ganetespib with Methotrexate Acts Synergistically to Impede NF- κ B/p65 Signaling in Human Lung Cancer A549 Cells. **Pharmaceuticals**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 230, 2023. DOI: 10.3390/ph16020230. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1424-8247/16/2/230>.

SUGARA, T. H.; JUMINA; SOLIKHAH, E. N.; PRANOWO, H. D. QSAR AND MOLECULAR DOCKING APPROACHES FOR DEVELOPMENT OF HALOXANTHONES AS THE ANTICANCER AGENT AGAINST MCF-7 AND HepG2. **Rasayan Journal of chemistry**, [S. l.], v. 14, n. 03, p. 1927–1937, 2021. DOI: 10.31788/RJC.2021.1436214. Disponível em: http://rasayanjournal.co.in/admin/php/upload/3282_pdf.pdf.

SUGIURA, Reiko; SATOH, Ryosuke; TAKASAKI, Teruaki. ERK: A Double-Edged Sword in Cancer. ERK-Dependent Apoptosis as a Potential Therapeutic Strategy for Cancer. **Cells**, [S. l.], v. 10, n. 10, p. 2509, 2021. DOI: 10.3390/cells10102509. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/10/10/2509>.

SUN, Emily; MOTOLANI, Aishat; CAMPOS, Leonardo; LU, Tao. The Pivotal Role of NF- κ B in the Pathogenesis and Therapeutics of Alzheimer's Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 23, n. 16, p. 8972, 2022. DOI: 10.3390/ijms23168972. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/16/8972>.

SUN, Shao-Cong. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, [S. l.], v. 17, n. 9, p. 545–558, 2017. DOI: 10.1038/nri.2017.52. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nri.2017.52>.

SUN, Shuqiang; ZHANG, Chunxiao; GAO, Jiahao; QIN, Qiongyu; ZHANG, Yaya; ZHU, Hua; YANG, Xinjun; YANG, Dongren; YAN, Hongtao. Benzoquinone induces ROS-dependent mitochondria-mediated apoptosis in HL-60 cells. **Toxicology and Industrial Health**, [S. l.], v. 34, n. 4, p. 270–281, 2018. DOI: 10.1177/0748233717750983. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0748233717750983>.

SUN, Yue-Li; JIANG, Wen-Qi; LUO, Qiu-Yun; YANG, Da-Jun; CAI, Yu-Chen; HUANG, Hui-Qiang; SUN, Jian. A novel Bcl-2 inhibitor, BM-1197, induces apoptosis

in malignant lymphoma cells through the endogenous apoptotic pathway. **BMC Cancer**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 1, 2020. DOI: 10.1186/s12885-019-6169-0. Disponível em: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-019-6169-0>.

SUPLATOV, Dmitry; KOPYLOV, Kirill; SHARAPOVA, Yana; ŠVEDAS, Vytas. Human p38 α mitogen-activated protein kinase in the Asp168-Phe169-Gly170-in (DFG-in) state can bind allosteric inhibitor Doramapimod. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, [S. l.], v. 37, n. 8, p. 2049–2060, 2019. DOI: 10.1080/07391102.2018.1475260. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07391102.2018.1475260>.

SUVARNA, Vasanti; SINGH, Vikas; MURAHARI, Manikanta. Current overview on the clinical update of Bcl-2 anti-apoptotic inhibitors for cancer therapy. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 862, p. 172655, 2019. DOI: 10.1016/j.ejphar.2019.172655. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299919306077>.

SZAFRAN, Marcin J.; KOŁODZIEJ, Marta; SKUT, Patrycja; MEDAPI, Brahmam; DOMAGAŁA, Agnieszka; TROJANOWSKI, Damian; ZAKRZEWSKA-CZERWIŃSKA, Jolanta; SRIRAM, Dharmarajan; JAKIMOWICZ, Dagmara. Amsacrine Derivatives Selectively Inhibit Mycobacterial Topoisomerase I (TopA), Impair *M. smegmatis* Growth and Disturb Chromosome Replication. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 9, n. JUL, p. 1–13, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01592. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.01592/full>.

TACIAK, B.; PRUSZYŃSKA, I.; KIRAGA, L.; BIALASEK, M.; KROL, M. Wnt signaling pathway in development and cancer. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, [S. l.], v. 69, n. 2, p. 185–196, 2018. DOI: 10.26402/jpp.2018.2.07. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29980141>.

TAKAC, Peter; KELLO, Martin; PILATOVA, Martina Bago; KUDLICKOVA, Zuzana; VILKOVA, Maria; SLEPICKOVA, Pavlina; PETIK, Peter; MOJZIS, Jan. New chalcone derivative exhibits antiproliferative potential by inducing G2/M cell cycle arrest, mitochondrial-mediated apoptosis and modulation of MAPK signalling pathway. **Chemico-Biological Interactions**, [S. l.], v. 292, n. May, p. 37–49, 2018. DOI: 10.1016/j.cbi.2018.07.005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.07.005>.

TAKAC, Peter; KELLO, Martin; VILKOVA, Maria; VASKOVA, Janka; MICHALKOVA, Radka; MOJZISOVA, Gabriela; MOJZIS, Jan. Antiproliferative Effect of Acridine Chalcone Is Mediated by Induction of Oxidative Stress. **Biomolecules**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 345, 2020. DOI: 10.3390/biom10020345. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2218-273X/10/2/345>.

TAKATA, Tsuyoshi; ARAKI, Shoma; TSUCHIYA, Yukihiro; WATANABE, Yasuo. Oxidative Stress Orchestrates MAPK and Nitric-Oxide Synthase Signal. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 22, p. 8750, 2020. DOI: 10.3390/ijms21228750. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/22/8750>.

TAKIMOTO-SHIMOMURA, Tomoko et al. Dual targeting of bromodomain-containing 4 by AZD5153 and BCL2 by AZD4320 against B-cell lymphomas concomitantly overexpressing c-MYC and BCL2. **Investigational New Drugs**, [S. l.], v. 37, n. 2, p. 210–222, 2019. DOI: 10.1007/s10637-018-0623-8.

TAM, Shing Yau; WU, Vincent W. C.; LAW, Helen K. W. Hypoxia-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancers: HIF-1 α and Beyond. **Frontiers in Oncology**, [S. l.], v. 10, 2020. DOI: 10.3389/fonc.2020.00486. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2020.00486/full>.

TARIQ, Kamran; LUIKART, Bryan W. Striking a balance: PIP2 and PIP3 signaling in neuronal health and disease. **Exploration of Neuroprotective Therapy**, [S. l.], v. 1, n. 2, 2021. DOI: 10.37349/ent.2021.00008.

TEAME, Tsegay et al. The use of zebrafish (Danio rerio) as biomedical models. **Animal Frontiers**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 68–77, 2019. DOI: 10.1093/af/vfz020. Disponível em: <https://academic.oup.com/af/article/9/3/68/5522877>.

TESSOULIN, Benoît et al. Whole-exon sequencing of human myeloma cell lines shows mutations related to myeloma patients at relapse with major hits in the DNA regulation and repair pathways. **Journal of Hematology & Oncology**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 137, 2018. DOI: 10.1186/s13045-018-0679-0. Disponível em: <https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-018-0679-0>.

THOMAS-JARDIN, Shayna E.; DAHL, Haley; NAWAS, Afshan F.; BAUTISTA, Monica; DELK, Nikki A. NF- κ B signaling promotes castration-resistant prostate cancer initiation and progression. **Pharmacology & Therapeutics**, [S. l.], v. 211, p. 107538, 2020. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2020.107538. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725820300668>.

THOMSEN, René; CHRISTENSEN, Mikael H. MolDock: A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 49, n. 11, p. 3315–3321, 2006. DOI: 10.1021/jm051197e. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm051197e>.

TOWNSEND, Paul A.; KOZHEVNIKOVA, Maria V.; CEXUS, Olivier N. F.; ZAMYATNIN, Andrey A.; SOOND, Surinder M. BH3-mimetics: recent developments in cancer therapy. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research** BioMed Central Ltd, , 2021. DOI: 10.1186/s13046-021-02157-5.

TRENDOWSKI, Matthew. Recent Advances in the Development of Antineoplastic Agents Derived from Natural Products. **Drugs**, [S. l.], v. 75, n. 17, p. 1993–2016, 2015. DOI: 10.1007/s40265-015-0489-4. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s40265-015-0489-4>.

TRUEBESTEIN, Linda et al. Structure of autoinhibited Akt1 reveals mechanism of PIP 3-mediated activation. [S. l.], v. 118, 2021. DOI: 10.1073/pnas.2101496118/-/DCSupplemental.

UMEKI, Yuka; OGAWA, Noriaki; UEGAKI, Yuko; SAGA, Kotaro; KANEDA, Yasufumi; NIMURA, Keisuke. DNA barcoding and gene expression recording reveal the presence of cancer cells with unique properties during tumor progression. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [S. l.], v. 80, n. 1, p. 17, 2023. DOI: 10.1007/s00018-022-04640-4. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s00018-022-04640-4>.

UREN, Rachel T.; IYER, Sweta; KLUCK, Ruth M. Pore formation by dimeric Bak and Bax: an unusual pore? **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, [S. l.], v. 372, n. 1726, p. 20160218, 2017. DOI: 10.1098/rstb.2016.0218. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.2016.0218>.

VARGA, Dóra; HAJDINÁK, Péter; MAKK-MERCZEL, Kinga; SZARKA, András. The Possible Connection of Two Dual Function Processes: The Relationship of Ferroptosis and the JNK Pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 23, n. 19, 2022. DOI: 10.3390/ijms231911004.

VASAN, Neil; BASELGA, José; HYMAN, David M. A view on drug resistance in cancer. **Nature**, [S. l.], v. 575, n. 7782, p. 299–309, 2019. DOI: 10.1038/s41586-019-1730-1. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41586-019-1730-1>.

VAZ, Rita L.; OUTEIRO, Tiago F.; FERREIRA, Joaquim J. Zebrafish as an Animal Model for Drug Discovery in Parkinson's Disease and Other Movement Disorders: A Systematic Review. **Frontiers in Neurology**, [S. l.], v. 9, n. JUN, 2018. DOI: 10.3389/fneur.2018.00347. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fneur.2018.00347/full>.

VENDRAMIN, Roberto et al. Activation of the integrated stress response confers vulnerability to mitoribosome-targeting antibiotics in melanoma. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 218, n. 9, 2021. DOI: 10.1084/jem.20210571. Disponível em: <https://rupress.org/jem/article/218/9/e20210571/212494/Activation-of-the-integrated-stress-response>.

VILKOVÁ, Mária; HUDÁČOVÁ, Monika; PALUŠEKOVÁ, Nikola; JENDŽELOVSKÝ, Rastislav; ALMÁŠI, Miroslav; BÉRES, Tibor; FEDOROČKO, Peter; KOŽURKOVÁ, Mária. Acridine Based N-Acylhydrazone Derivatives as Potential Anticancer Agents: Synthesis, Characterization and ctDNA/HSA Spectroscopic Binding Properties. **Molecules**, [S. l.], v. 27, n. 9, 2022. DOI: 10.3390/molecules27092883.

VU, Milan; KASSOUF, Nick; OFILI, Rosemary; LUND, Torben; BELL, Celia; APPIAH, Sandra. Doxorubicin selectively induces apoptosis through the inhibition of a novel isoform of Bcl-2 in acute myeloid leukaemia MOLM-13 cells with reduced Beclin 1 expression. **International Journal of Oncology**, [S. l.], v. 57, n. 1, p. 113–121, 2020. DOI: 10.3892/ijo.2020.5052. Disponível em: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2020.5052>.

WANG, Fei; WU, Peng; QIN, Siying; DENG, Yushan; HAN, Pan; LI, Xiao; FAN, Caixin; XU, Ying. Curcumin C inhibit osteosarcoma cell line U2OS proliferation by ROS induced apoptosis, autophagy and cell cycle arrest through activating JNK signal pathway. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 195, p.

433–439, 2022. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.11.156. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813021025642>.

WANG, Hsiuying. MicroRNAs and Apoptosis in Colorectal Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 15, p. 5353, 2020. DOI: 10.3390/ijms21155353. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/15/5353>.

WANG, Jin; LIANG, Dong; ZHANG, Xue Pei; HE, Chen Fei; CAO, Lei; ZHANG, San Qi; XIAO, Xue; LI, Shui Jie; CAO, Yong Xiao. Novel PI3K/Akt/mTOR signaling inhibitor, W922, prevents colorectal cancer growth via the regulation of autophagy. **International Journal of Oncology**, [S. l.], v. 58, n. 1, p. 70–82, 2021. DOI: 10.3892/ijo.2020.5151.

WANG, Jing-Quan et al. Venetoclax, a BCL-2 Inhibitor, Enhances the Efficacy of Chemotherapeutic Agents in Wild-Type ABCG2-Overexpression-Mediated MDR Cancer Cells. **Cancers**, [S. l.], v. 12, n. 2, p. 466, 2020. DOI: 10.3390/cancers12020466. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/2/466>.

WANG, Zhanyu et al. Surgery, radiotherapy, chemotherapy, targeted therapy, and immunotherapy of rectal adenocarcinoma with penile metastasis: a case report. **Journal of Gastrointestinal Oncology**, [S. l.], v. 14, n. 2, p. 1155–1165, 2023. DOI: 10.21037/jgo-23-84. Disponível em: <https://jgo.amegroups.com/article/view/74740/html>.

WANG, Ziqian et al. Proteolysis Targeting Chimeras for the Selective Degradation of Mcl-1/Bcl-2 Derived from Nonselective Target Binding Ligands. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 62, n. 17, p. 8152–8163, 2019. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b00919. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.9b00919>.

WEI, Jiaen; LIU, Ruining; HU, Xiyun; LIANG, Tingen; ZHOU, Zhiran; HUANG, Zunnan. MAPK signaling pathway-targeted marine compounds in cancer therapy. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, [S. l.], v. 147, n. 1, p. 3–22, 2021. DOI: 10.1007/s00432-020-03460-y. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00432-020-03460-y>.

WEI, Tian; XIAOJUN, Xie; PEILONG, Cao. Magnoflorine improves sensitivity to doxorubicin (DOX) of breast cancer cells via inducing apoptosis and autophagy through AKT/mTOR and p38 signaling pathways. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 121, p. 109139, 2020. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109139. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332219300630>.

WEI, Zuzhuang; LIN, Xiaomin; WANG, Siyi; ZHANG, Jiahui; JI, Dongsheng; GONG, Xue; HUANG, Zhi-Shu; SHU, Bing; LI, Ding. Syntheses and evaluation of acridone derivatives as anticancer agents targeting Kras promoter i-motif structure. **Bioorganic Chemistry**, [S. l.], v. 136, p. 106526, 2023. DOI:

10.1016/j.bioorg.2023.106526. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045206823001864>.

WELLER, Sandra et al. The BCL-2 inhibitor ABT-199/venetoclax synergizes with proteasome inhibition via transactivation of the MCL-1 antagonist NOXA. **Cell Death Discovery**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 215, 2022. DOI: 10.1038/s41420-022-01009-1. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41420-022-01009-1>.

WENG, Qiannan; LIU, Zequn; LI, Bojiang; LIU, Kaiqing; WU, Wangjun; LIU, Honglin. Oxidative Stress Induces Mouse Follicular Granulosa Cells Apoptosis via JNK/FoxO1 Pathway. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 11, n. 12, p. e0167869, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0167869. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0167869>.

WHITAKER, Robert H.; PLACZEK, William J. Regulating the BCL2 Family to Improve Sensitivity to Microtubule Targeting Agents. **Cells**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 346, 2019. DOI: 10.3390/cells8040346. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/4/346>.

WOLF, Philipp; SCHOENIGER, Axel; EDLICH, Frank. Pro-apoptotic complexes of BAX and BAK on the outer mitochondrial membrane. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, [S. l.], v. 1869, n. 10, p. 119317, 2022. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2022.119317. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488922001094>.

WU, Qinghua; WU, Wenda; FU, Bishi; SHI, Lei; WANG, Xu; KUCA, Kamil. JNK signaling in cancer cell survival. **Medicinal Research Reviews**, [S. l.], v. 39, n. 6, p. 2082–2104, 2019. DOI: 10.1002/med.21574. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/med.21574>.

WU, Xuesong; SUN, Liang; XU, Fangying. NF- κ B in Cell Deaths, Therapeutic Resistance and Nanotherapy of Tumors: Recent Advances. **Pharmaceuticals**, [S. l.], v. 16, n. 6, p. 783, 2023. DOI: 10.3390/ph16060783. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1424-8247/16/6/783>.

WU, Yangsheng et al. Atractylenolide II combined with Interferon- γ synergistically ameliorates colorectal cancer progression in vivo and in vitro by blocking the NF- κ B p65/PD-L1 pathway. **Journal of Cancer**, [S. l.], v. 15, n. 13, p. 4328–4344, 2024. DOI: 10.7150/jca.96647. Disponível em: <https://www.jcancer.org/v15p4328.htm>.

XU, Jiaxuan; DONG, Xiaoqing; HUANG, David C. S.; XU, Peipei; ZHAO, Quan; CHEN, Bing. Current Advances and Future Strategies for BCL-2 Inhibitors: Potent Weapons against Cancers. **Cancers**, [S. l.], v. 15, n. 20, p. 4957, 2023. DOI: 10.3390/cancers15204957. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/15/20/4957>.

XU, Ruiyuan; HU, Jieping. The role of JNK in prostate cancer progression and therapeutic strategies. **Biomedicine and Pharmacotherapy** Elsevier Masson SAS, , 2020. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109679.

XU, Xuebo; LAI, Yueyang; HUA, Zi-Chun. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. **Bioscience Reports**, [S. l.], v. 39, n. 1, p. 1–17, 2019. DOI: 10.1042/BSR20180992. Disponível em: <https://portlandpress.com/bioscirep/article/39/1/BSR20180992/191/Apoptosis-and-apoptotic-body-disease-message-and>.

YAMAMOTO, Tsuyoshi; NAKANO, Hirofumi; SHIOMI, Kazuro; WANIBUCHI, Kiyofumi; MASUI, Hisashi; TAKAHASHI, Takashi; URANO, Yasuteru; KAMATA, Tohru. Identification and Characterization of a Novel NADPH Oxidase 1 (Nox1) Inhibitor That Suppresses Proliferation of Colon and Stomach Cancer **Cells Biol. Pharm. Bull.** [s.l: s.n.].

YANG, Bowen; CHEN, Yu; SHI, Jianlin. Reactive oxygen species (ROS)-based nanomedicine. **Chemical Reviews**American Chemical Society, , 2019. a. DOI: 10.1021/acs.chemrev.8b00626.

YANG, Bowen; CHEN, Yu; SHI, Jianlin. Reactive Oxygen Species (ROS)-Based Nanomedicine. **Chemical Reviews**, [S. l.], v. 119, n. 8, p. 4881–4985, 2019. b. DOI: 10.1021/acs.chemrev.8b00626. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrev.8b00626>.

YANG, Jing; CRON, Peter; THOMPSON, Vivienne; GOOD, Valerie M.; HESS, Daniel; HEMMING, Brian A.; BARFORD, David. Molecular Mechanism for the Regulation of Protein Kinase B/Akt by Hydrophobic Motif Phosphorylation. **Molecular Cell**, [S. l.], v. 9, n. 6, p. 1227–1240, 2002. DOI: 10.1016/S1097-2765(02)00550-6. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276502005506>.

YANG, Jing; NIE, Ji; MA, Xuele; WEI, Yuquan; PENG, Yong; WEI, Xiawei. Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials. **Molecular Cancer**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 26, 2019. a. DOI: 10.1186/s12943-019-0954-x. Disponível em: <https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-019-0954-x>.

YANG, Runlin; LI, Yaoqi; WANG, Xinyu; YAN, Junjie; PAN, Donghui; XU, Yuping; WANG, Lizhen; YANG, Min. Doxorubicin loaded ferritin nanoparticles for ferroptosis enhanced targeted killing of cancer cells. **RSC Advances**, [S. l.], v. 9, n. 49, p. 28548–28553, 2019. b. DOI: 10.1039/C9RA04478G. Disponível em: <https://xlink.rsc.org/?DOI=C9RA04478G>.

YANG, Sufang; LIU, Guohua. Targeting the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in hepatocellular carcinoma. **Oncology Letters**, [S. l.], v. 13, n. 3, p. 1041–1047, 2017. DOI: 10.3892/ol.2017.5557. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2017.5557>.

YANG, Xue; LI, Parker; KANG, Zhuang; LI, Wenbin. Targeted therapy, immunotherapy, and chemotherapy for chordoma. **Current Medicine**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 3, 2023. DOI: 10.1007/s44194-022-00017-8. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s44194-022-00017-8>.

YU, Hui; LIN, Liangbin; ZHANG, Zhiqiang; ZHANG, Huiyuan; HU, Hongbo. Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study. **Signal**

Transduction and Targeted TherapySpringer. **Nature**, 2020. DOI: 10.1038/s41392-020-00312-6.

YU, Zhongjie; LI, Qi; AN, Yi; CHEN, Xiatian; LIU, Ziqian; LI, Zhe; GAO, Jinning; AUNG, Lynn; LI, Peifeng. Role of apoptosis repressor with caspase recruitment domain (arc) in cancer (Review). **Oncology Letters**, [S. l.], p. 5691–5698, 2019. DOI: 10.3892/ol.2019.10981. Disponível em: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2019.10981>.

YUAN, Jimin; DONG, Xiaoduo; YAP, Jiajun; HU, Jiancheng. The MAPK and AMPK signalings: interplay and implication in targeted cancer therapy. **Journal of Hematology & Oncology**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 113, 2020. DOI: 10.1186/s13045-020-00949-4. Disponível em: <https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-020-00949-4>.

YUAN, Yeqin; LONG, Huizhi; ZHOU, Ziwei; FU, Yuting; JIANG, Binyuan. PI3K–AKT-Targeting Breast Cancer Treatments: Natural Products and Synthetic Compounds. **Biomolecules**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 93, 2023. DOI: 10.3390/biom13010093. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2218-273X/13/1/93>.

YUAN, Yongfeng; BAI, Xiangyun; LUO, Cunjin; WANG, Kuanquan; ZHANG, Henggui. The virtual heart as a platform for screening drug cardiotoxicity. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 172, n. 23, p. 5531–5547, 2015. DOI: 10.1111/bph.12996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25363597>.

YUE, Jicheng; LÓPEZ, José M. Understanding MAPK Signaling Pathways in Apoptosis. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 7, p. 2346, 2020. a. DOI: 10.3390/ijms21072346. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/7/2346>.

ZEFFERINO; PICCOLI; GIOIA; CAPITANIO; CONESE. Gap Junction Intercellular Communication in the Carcinogenesis Hallmarks: Is This a Phenomenon or Epiphenomenon? **Cells**, [S. l.], v. 8, n. 8, p. 896, 2019. DOI: 10.3390/cells8080896. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/8/896>.

ZENG, Weiwei; LUO, Yuning; GAN, Dali; ZHANG, Yaofeng; DENG, Huan; LIU, Guohui. Advances in Doxorubicin-based nano-drug delivery system in triple negative breast cancer. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [S. l.], v. 11, 2023. DOI: 10.3389/fbioe.2023.1271420. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2023.1271420/full>.

ZHANG, Bin; DOU, Zhende; XIONG, Zheng; WANG, Ning; HE, Shan; YAN, Xiaojun; JIN, Haixiao. Design, synthesis and biological research of novel N-phenylbenzamide-4-methylamine acridine derivatives as potential topoisomerase I/II and apoptosis-inducing agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S. l.], v. 29, n. 23, p. 126714, 2019. a. DOI: 10.1016/j.bmcl.2019.126714. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.126714>.

ZHANG, Chong; QU, Yan; NIU, Bingxuan. Design, synthesis and biological evaluation of lapachol derivatives possessing indole scaffolds as topoisomerase I

inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 24, n. 22, p. 5781–5786, 2016. DOI: 10.1016/j.bmc.2016.09.034. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2016.09.034>.

ZHANG, Guangya et al. β -Thujaplicin induces autophagic cell death, apoptosis, and cell cycle arrest through ROS-mediated Akt and p38/ERK MAPK signaling in human hepatocellular carcinoma. **Cell Death & Disease**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 255, 2019. b. DOI: 10.1038/s41419-019-1492-6. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41419-019-1492-6>.

ZHANG, Jixiang; WANG, Xiaoli; VIKASH, Vikash; YE, Qing; WU, Dandan; LIU, Yulan; DONG, Weiguo. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [S. l.], v. 2016, n. Figure 1, p. 1–18, 2016. DOI: 10.1155/2016/4350965. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/4350965/>.

ZHANG, Leisi et al. The pan-Bcl2 Inhibitor AT101 Activates the Intrinsic Apoptotic Pathway and Causes DNA Damage in Acute Myeloid Leukemia Stem-Like Cells. **Targeted Oncology**, [S. l.], v. 12, n. 5, p. 677–687, 2017. DOI: 10.1007/s11523-017-0509-2. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11523-017-0509-2>.

ZHANG, Linlin; LU, Zaiming; ZHAO, Xiangxuan. Targeting Bcl-2 for cancer therapy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, [S. l.], v. 1876, n. 1, p. 188569, 2021. DOI: 10.1016/j.bbcan.2021.188569. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304419X21000664>.

ZHANG, Qian; LENARDO, Michael J.; BALTIMORE, David. 30 Years of NF- κ B: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology. **Cell**, [S. l.], v. 168, n. 1–2, p. 37–57, 2017. DOI: 10.1016/j.cell.2016.12.012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867416317263>.

ZHANG, Tao; MA, Chao; ZHANG, Zhiqiang; ZHANG, Huiyuan; HU, Hongbo. NF- κ B signaling in inflammation and cancer. **MedComm**, [S. l.], v. 2, n. 4, p. 618–653, 2021. a. DOI: 10.1002/mco2.104. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mco2.104>.

ZHANG, Zhenghua. Nobiletin sensitizes colorectal cancer cells to oxaliplatin by PI3K Akt MTOR pathway. **Frontiers in Bioscience**, [S. l.], v. 24, n. 2, p. 4719, 2019. DOI: 10.2741/4719. Disponível em: <https://imrpress.com/journal/FBL/24/2/10.2741/4719>.

ZHANG, Ziwen; ZHANG, Han; LI, Dongbo; ZHOU, Xiaoping; QIN, Qi; ZHANG, Qingyuan. Caspase-3-mediated GSDME induced Pyroptosis in breast cancer cells through the ROS/JNK signalling pathway. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, [S. l.], v. 25, n. 17, p. 8159–8168, 2021. c. DOI: 10.1111/jcmm.16574. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jcmm.16574>.

ZHONG, Jiateng; DING, Shuang; ZHANG, Xinyu; DI, Wenyu; WANG, Xiaohui; ZHANG, Hui; CHEN, Yiyang; ZHANG, Yongxi; HU, Yuhan. To Investigate the Occurrence and Development of Colorectal Cancer Based on the PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, [S. l.], v. 28, n. 2, 2023.

DOI: 10.31083/j.fbl2802037. Disponível em:
<https://www.imrpess.com/journal/FBL/28/2/10.31083/j.fbl2802037>.

ZHOU, Huiping; SUN, Yang; ZHENG, Hongnan; FAN, Lei; MEI, Qibing; TANG, Yuan; DUAN, Xiaoqun; LI, Yuhua. Paris saponin VII extracted from trillium tschonoskii suppresses proliferation and induces apoptosis of human colorectal cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 239, p. 111903, 2019. DOI: 10.1016/j.jep.2019.111903. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037887411930710X>.

ZHOU, Qian; YOU, Chaoqun; ZHENG, Cong; GU, Yawen; GU, Hongchao; ZHANG, Rui; WU, Hongshuai; SUN, Baiwang. 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**, [S. l.], v. 206, n. 2017, p. 1–9, 2018. DOI: 10.1016/j.lfs.2018.05.010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.05.010>.

ZHU, Lusha; LIN, Mei. The Synthesis of Nano-Doxorubicin and its Anticancer Effect. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 21, n. 18, p. 2466–2477, 2020. DOI: 10.2174/1871520621666201229115612.

ZHU, Yaoyao; LI, Xia. Advances of Wnt Signalling Pathway in Colorectal Cancer. **Cells** MDPI, 2023. DOI: 10.3390/cells12030447.

ZINATIZADEH, Mohammad Reza; SCHOCK, Bettina; CHALBATANI, Ghanbar Mahmoodi; ZARANDI, Peyman Kheirandish; JALALI, Seyed Amir; MIRI, Seyed Rouhollah. The Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) signaling in cancer development and immune diseases. **Genes & Diseases**, [S. l.], v. 8, n. 3, p. 287–297, 2021. DOI: 10.1016/j.gendis.2020.06.005. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352304220300775>.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO 1 - Certidão da Comissão de Ética no Uso de Animais para peixe-zebra (*Danio rerio*)



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais

Reitoria



João Pessoa, 12 de março de 2021
CEUA N 5900310718

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Marianna Vieira Sobral
Área: Ciências Farmacêuticas

Título da proposta: "AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE NOVOS ANÁLOGOS SINTÉTICOS PIPERIDÍNICOS, QUINOLÍNICOS E ACRIDÍNICOS EM MODELO DE PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UFPB (ID 000422)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 02/março/2021) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "O projeto em vigência tem como objetivo geral avaliar os efeitos tóxicos de análogos sintéticos piperidínicos, quinolínicos e acridínicos em modelo de peixe-zebra (*Danio rerio*). Tais experimentos toxicológicos desempenham um papel importante em todo o processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, permitindo uma seleção precoce de candidatos a medicamentos com os perfis de segurança mais aceitáveis. A execução do presente projeto foi interrompida em virtude da pandemia causada pela COVID-19 e pelas consequentes medidas preventivas propostas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e Ministério da Saúde do Brasil. Tais medidas incluem o distanciamento social que forçou a suspensão das atividades acadêmicas presenciais e, desta forma, impossibilitou a realização dos procedimentos experimentais necessários para a execução deste projeto, tendo em vista que, além dos trabalhos realizados no Laboratório de Avaliação de Risco de Novas Tecnologias (LabRisco), o presente projeto envolve a colaboração de outros laboratórios, como aqueles que fornecem as substâncias teste, e que, no momento, também encontram-se com suas atividades paralisadas em consequência da pandemia. "

Comentário da CEUA: "PARECER CONSUBSTANCIADO CEUA Nº 5900310718 - (Emenda) A pesquisadora solicita uma prorrogação de 12 meses para a execução do projeto de pesquisa, justificando que as atividades sofreram atraso e/ou estão paralisadas em consequência da pandemia da COVID-19. Ante ao exposto, somos de parecer favorável a prorrogação, assim o período de vigência será até o mês de setembro de 2022. À Comissão."

Prof. Dra. Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ivira Carmem Talieri
Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

ANEXO 2 – Artigos publicados durante a vigência do doutorado (1/6)



molecules



Communication

AMTAC-19, a Spiro-Acridine Compound, Induces In Vitro Antitumor Effect via the ROS-ERK/JNK Signaling Pathway

Valgria Matias de Sousa ¹, Sâmia Sousa Duarte ¹, Rafael Carlos Ferreira ¹, Natália Ferreira de Sousa ¹, Marcus Tullius Scotti ¹, Luciana Scotti ¹, Marcelo Sobral da Silva ¹, Josean Fachine Tavares ¹, Ricardo Olimpio de Moura ², Juan Carlos Ramos Gonçalves ¹ and Marianna Vieira Sobral ^{1,*}

¹ Postgraduate Program in Natural Products and Bioactive Synthetics, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-970, PB, Brazil

² Drug Development and Synthesis Laboratory, Department of Pharmacy, State University of Paraíba, João Pessoa 58070-450, PB, Brazil

* Correspondence: mariannavbs@gmail.com



Citation: Sousa, V.M.d.; Duarte, S.S.; Ferreira, R.C.; Sousa, N.F.d.; Scotti, M.T.; Scotti, L.; Silva, M.S.d.; Tavares, J.E.; Moura, R.O.d.; Gonçalves, J.C.R.; et al. AMTAC-19, a Spiro-Acridine Compound, Induces In Vitro Antitumor Effect via the ROS-ERK/JNK Signaling Pathway. *Molecules* **2024**, *29*, 5344. <https://doi.org/10.3390/molecules29225344>

Academic Editor: Diego Muñoz-Torres

Received: 22 October 2024

Revised: 6 November 2024

Accepted: 12 November 2024

Published: 13 November 2024

Abstract: Colorectal cancer remains a significant cause of mortality worldwide. A spiro-acridine derivative, (E)-1'-((4-bromobenzylidene)amino)-5'-oxo-1',5'-dihydro-10H-spiro[acridine-9,2'-pyrrole]-4'-carbonitrile (AMTAC-19), showed significant cytotoxicity in HCT-116 colorectal carcinoma cells (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀ = 10.35 ± 1.66 μM) and antioxidant effects after 48 h of treatment. In this study, Molegro Virtual Docker v.6.0.1 software was used to investigate the interactions between AMTAC-19 and the Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 (ERK1), c-Jun N-terminal Kinase 1 (JNK1), and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase α (p38α MAPK). In vitro assays were conducted in HCT-116 cells to evaluate the effect of AMTAC-19 on the modulation of these proteins' activities using flow cytometry. Furthermore, the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay in the presence or absence of ERK1/2, JNK, and p38 MAPK inhibitors was used to evaluate the involvement of these enzymes in AMTAC-19 cytotoxicity. ROS production was assessed using the 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay at various incubation times (30 min, 1 h, 6 h, 12 h, and 24 h), and the MTT assay using N-acetyl-L-cysteine (NAC) was performed. In silico results indicated that AMTAC-19 interacts with ERK1, JNK1, and p38α MAPK. Additionally, AMTAC-19 activated ERK1/2 and JNK1 in HCT-116 cells, and its cytotoxicity was significantly reduced in the presence of ERK1/2 and JNK inhibitors. AMTAC-19 also induced a significant increase in ROS production (30 min and 1 h), while NAC pretreatment reduced its cytotoxicity. These findings support AMTAC-19's in vitro antitumor effect through ROS-dependent activation of ERK and JNK pathways.

Keywords: colorectal carcinoma; oxidative stress; MAPKs

1. Introduction

Colorectal cancer (CRC) has a high mortality rate, with 0.9 million deaths in 2020 [1]. Over the next two decades, a 70% increase in CRC mortality is expected [2], highlighting the need for advancements in treatment and the development of new drugs. In this context,

ANEXO 2 – Artigos publicados durante a vigência do doutorado (2/6)

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology
https://doi.org/10.1007/s00210-023-02686-0

BRIEF REPORT



Cytotoxicity of a new spiro-acridine derivative: modulation of cellular antioxidant state and induction of cell cycle arrest and apoptosis in HCT-116 colorectal carcinoma

Valgrícia Matias de Sousa¹ · Sâmia Sousa Duarte¹ · Daiana Karla Frade Silva¹ · Rafael Carlos Ferreira¹ · Ricardo Olímpio de Moura² · Miguel Angelo Santos Pinheiro Segundo³ · Davi Farias⁴ · Leonardo Vieira⁴ · Juan Carlos Ramos Gonçalves^{1,5} · Marianna Vieira Sobral^{1,5}

Received: 20 June 2023 / Accepted: 21 August 2023

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2023

Introduction

Colorectal cancer (CRC) ranks as the third most common primary malignancy. Epidemiological data projected approximately 1.9 million new cases and 0.9 million deaths globally in 2020. Moreover, it is anticipated that by 2030, there will be around 2.2 million new cases of CRC diagnosed and 1.1 million deaths (Billir and Schrag 2021; Sawicki et al. 2021; Xi and Xu 2021).

CRC treatment has significantly advanced in recent decades, incorporating various approaches such as surgery, immunotherapy, targeted therapy and cytotoxic chemotherapy, either individually or in combination. Despite these advancements, CRC continues to be the second leading cause of cancer-related deaths globally (Bray et al. 2018; Sung et al. 2021; Xi and Xu 2021). As a result, the substantial morbidity and mortality associated with CRC present a significant public health challenge, prompting ongoing efforts to explore and develop novel therapeutic strategies.

Compounds containing the acridine scaffold have been recognized for their potential anticancer agents. Amsacrine and pyrazoloacridine are notable examples of acridine-based drugs employed in cancer treatment (Sing et al. 2022). Due to the high versatility of the acridine ring, researchers have focused on obtaining new derivatives primarily through the introduction of lateral groups (Zhang et al. 2014; de Almeida et al. 2017). Acridines are known for their ability to induce cell cycle arrest and apoptosis by intercalating into DNA and inhibiting topoisomerases due to the planar aromatic structure of the acridine ring (de Almeida et al. 2017; Mangueira et al. 2017; Chen et al. 2018, 2019; Haider et al. 2019; Sing et al. 2022). Moreover, acridine derivatives have been considered multitargeted inhibitory compounds for cancer therapy. Their actions include inhibition of histone deacetylase (Chen et al. 2018) and poly (ADP-ribose) polymerases (Dai et al. 2020), in addition to acting as multitarget inhibitors of VEGFR-2 and EGFR, and Src and MEK kinase (Luan et al. 2011; Cui et al. 2016, 2017; Hu et al. 2022). Multitarget agents modulate different targets simultaneously; which can provide a greater therapeutic advantage than single-target agents for cancer treatment (Morphy et al. 2004; Morphy and Rankovic 2005; Makhoba et al. 2020).

Spiro-acridine compounds are a new and promising class of acridine derivatives. They are synthesized through cyclization reactions, resulting in a five- or six-membered spiro ring attached to acridine C-9 carbon (Vilková et al. 2014). These compounds have been reported in the literature as inhibitors of topoisomerase and tyrosinase enzymes, DNA binders, and cytostatic and antiproliferative agents (Almeida et al. 2016; de Almeida et al. 2017; Salem et al. 2017; Gouveia et al. 2018; Menezes et al. 2019; Gobinath et al. 2020). In addition, our previous studies have demonstrated the antitumor effects of two spiro-acridine compounds, AMTAC-17 and AMTAC-06, which were

✉ Marianna Vieira Sobral
mariannavbs@gmail.com

¹ Postgraduation Program in Bioactive Natural and Synthetic Products, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

² Drug Development and Synthesis Laboratory, Department of Pharmacy, State University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

³ Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

⁴ Laboratory for Risk Assessment of Novel Technologies, Department of Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

⁵ Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

ANEXO 2 – Artigos publicados durante a vigência do doutorado (3/6)



pharmaceuticals



Article

The Essential Oil from *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (Asteraceae) Exerts an In Vitro Antimelanoma Effect by Inducing Apoptosis and Modulating the MAPKs, NF- κ B, and PKB/AKT Signaling Pathways

Rafael Carlos Ferreira , Sâmia Sousa Duarte, Valgéria Matias de Sousa, Ramon Ramos Marques de Souza, Karinne Kelly Gadelha Marques, Renata Albuquerque de Abrantes, Yuri Mangueira do Nascimento , Natália Ferreira de Sousa, Marcus Tullius Scotti , Luciana Scotti , Josean Fachine Tavares , Juan Carlos Ramos Gonçalves , Marcelo Sobral da Silva and Marianna Vieira Sobral *

Postgraduate Program in Natural Products and Bioactive Synthetics, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-970, PB, Brazil; ramonramos.rm@gmail.com (R.R.M.d.S.); karinnegadelha@hotmail.com (K.K.G.M.)

* Correspondence: mariannavbs@gmail.com



Citation: Ferreira, R.C.; Duarte, S.S.; de Sousa, V.M.; de Souza, R.R.M.; Marques, K.K.G.; de Abrantes, R.A.; do Nascimento, Y.M.; de Sousa, N.F.; Scotti, M.T.; Scotti, L.; et al. The Essential Oil from *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (Asteraceae) Exerts an In Vitro Antimelanoma Effect by Inducing Apoptosis and Modulating the MAPKs, NF- κ B, and PKB/AKT Signaling Pathways. *Pharmaceuticals* **2023**, *16*, 1553. <https://doi.org/10.3390/ph16111553>

Academic Editor: Riccardo Petrelli

Received: 5 October 2023

Revised: 21 October 2023

Accepted: 25 October 2023

Published: 2 November 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The characterization and cytotoxicity of the essential oil from *Conyza bonariensis* (L.) aerial parts (CBEO) were previously conducted. The major compound was (Z)-2-lachnophyllum ester (EZ), and CBEO exhibited significant ROS-dependent cytotoxicity in the melanoma cell line SK-MEL-28. Herein, we employed the Molegro Virtual Docker v.6.0.1 software to investigate the interactions between the EZ and Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs), the Nuclear Factor κ B (NF- κ B), and the Protein Kinase B (PKB/AKT). Additionally, in vitro assays were performed in SK-MEL-28 cells to assess the effect of CBEO on the cell cycle, apoptosis, and these signaling pathways by flow cytometry and the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay using MAPKs inhibitors. CBEO induced a significant increase in the sub-G1 peak, as well as biochemical and morphological changes characteristic of apoptosis. The in-silico results indicated that EZ interacts with Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 (ERK1), c-Jun N-terminal Kinase 1 (JNK1), p38 α MAPK, NF- κ B, and PKB/AKT. Moreover, CBEO modulated the ERK1/2, JNK, p38 MAPK, NF- κ B, and PKB/AKT activities in SK-MEL-28 cells. Furthermore, CBEO's cytotoxicity against SK-MEL-28 cells was significantly altered in the presence of MAPKs inhibitors. These findings support the in vitro antimelanoma effect of CBEO through apoptosis induction, and the modulation of ERK, JNK, p38 MAPK, NF- κ B, and PKB/AKT activities.

Keywords: natural products; essential oil; antitumor effect

1. Introduction

Cutaneous melanoma is the most aggressive type of skin cancer [1], originating from the malignant transformation of melanocytes [2]. This cancer represents a global public health problem, with 57,000 recorded deaths in 2020 [3].

Chemotherapy remains a significant pharmacological modality for the treatment of many cancer types [4], including melanoma [5]. However, issues are associated with antineoplastic chemotherapy, such as chemoresistance [6–8]. Therefore, research should be conducted to obtain new therapeutic agents [9]. In this context, natural products stand out as a valuable source of molecules with potential applications for cancer treatment [10].

Essential oils (EOs) are oily and volatile liquids [11], isolated from various parts of plants such as bark, flowers, and leaves [12,13]. The components of EOs include terpenes, terpenoids, esters, and aromatic phenols [14,15]. *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (Asteraceae) is a common weed in South America [16]. EOs from *Conyza bonariensis* exhibit

ANEXO 2 – Artigos publicados durante a vigência do doutorado (4/6)

Pharmacological Reports
<https://doi.org/10.1007/s43440-022-00357-0>

SHORT COMMUNICATION



Apoptotic and antioxidant effects in HCT-116 colorectal carcinoma cells by a spiro-acridine compound, AMTAC-06

Sâmia Sousa Duarte¹ · Daiana Karla Frade Silva¹ · Thaís Mangeon Honorato Lisboa¹ · Rawny Galdino Gouveia¹ · Camyla Caroliny Neves de Andrade¹ · Valgrícia Matias de Sousa¹ · Rafael Carlos Ferreira¹ · Ricardo Olimpio de Moura² · Joilly Nilce Santana Gomes² · Patricia Mirella da Silva³ · Fátima de Lourdes Assunção Araújo de Azevedo⁴ · Tatjana S. L. Keesen⁵ · Juan Carlos Ramos Gonçalves⁶ · Leônia Maria Batista^{1,6} · Marianna Vieira Sobral^{1,6,7}

Received: 27 October 2021 / Revised: 5 February 2022 / Accepted: 7 February 2022
 © The Author(s) under exclusive licence to Maj Institute of Pharmacology Polish Academy of Sciences 2022

Abstract

Background Acridine compounds have been described as promising anticancer agents. Previous studies showed that (*E*)-1'-((4-chlorobenzylidene)amino)-5'-oxo-1',5'-dihydro-10H-spiro[acridine-9,2'-pyrrole]-4'-carbonitrile (AMTAC-06), a spiro-acridine compound, has antitumor activity on Ehrlich tumor and low toxicity. Herein, we investigated its antitumor effect against human cells in vitro.

Methods MTT assay was used to assess cytotoxicity of AMTAC-06 (3.125–200 µM) against tumor and non-tumor cells, and the half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) and the selectivity index (SI) were calculated. The effects on the cell cycle (propidium iodide—PI—staining), apoptosis (Annexin V-FITC/PI double staining by flow cytometry), and production of reactive oxygen species, ROS (DCFH assay) were also evaluated. Statistical analysis was achieved using ANOVA followed by Tukey's post-test.

Results AMTAC-06 showed higher cytotoxicity against colorectal carcinoma HCT-116 cells (IC₅₀: 12.62 µM). The SI showed that AMTAC-06 was more selective for HCT-116 cells (HaCaT SI: 1.41; PBMC SI: 0.62) than doxorubicin (HaCaT SI: 0.10; PBMC SI: 0.01). AMTAC-06 (15 and 30 µM) induced an increase in the sub-G1 peak ($p < 0.000001$) and cell cycle arrest in S phase ($p = 0.003547$). Moreover, treatment with this compound (15 and 30 µM) resulted in increased early ($p < 0.000001$) and late apoptotic cells ($p < 0.000001$). In addition, there was a reduction on ROS production ($p < 0.000001$).

Conclusions AMTAC-06 presents anticancer activity against HCT-116 cells by regulating the cell cycle, inducing apoptosis and an antioxidant action.

Keywords Spiro-acridine · Antioxidant action · Antitumor activity · Cell cycle · Apoptosis · Colorectal cancer

✉ Marianna Vieira Sobral
 mariannavbs@ltf.ufpb.br

¹ Postgraduation Program in Bioactive Natural and Synthetic Products, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

² Drug Development and Synthesis Laboratory, Department of Pharmacy, State University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

³ Invertebrate Immunology and Pathology Laboratory, Department of Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

⁴ Cardiovascular Pharmacology Laboratory, Postgraduation Program in Bioactive Natural and Synthetic Products, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

⁵ Immunology of Infectious Diseases Laboratory, Biotechnology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

⁶ Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

⁷ Laboratório de Oncofarmacologia (Oncofar), Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPEFarM). Cidade Universitária, Campus I, João Pessoa, Paraíba 58051-900, Brazil

Published online: 17 March 2022

Springer

ANEXO 2 – Artigos publicados durante a vigência do doutorado (5/6)



SCIENTIA PLENA
www.scientiaplena.org.br

VOL. 17, NUM. 03

2021

doi: 10.14808/sci.plena.2021.034901

Valores de referência de parâmetros bioquímicos e hematológicos de *Rattus norvegicus* (Wistar) da Unidade de Produção Animal do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba

Reference values of biochemical and hematological parameters of *Rattus norvegicus* (Wistar) from the Animal Production Unit of the Research Institute for Drugs and Medicines of the Federal University of Paraíba

F. A. S. Oliveira¹; R. C. Ferreira²; R. N. Parentoni³; C. C. N. Andrade²; A. L. O. Lopes²; A. L. G. Cruz⁴; S. S. Duarte²; D. K. F. Silva²; V. M. de Sousa²; T. M. Batista²; I. B. S. Gomes⁵; M. V. Sobral^{2*}

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife-Pernambuco, Brasil

²Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900, João Pessoa-Paraíba, Brasil

³Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900, João Pessoa-Paraíba, Brasil

⁴Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900, João Pessoa-Paraíba, Brasil

⁵Laboratório de Bioquímica Clínica, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900, João Pessoa-Paraíba, Brasil

*mariannavbs@gmail.com

(Recebido em 01 de outubro de 2020; aceito em 22 de março de 2021)

Animais de diferentes criadouros podem apresentar variações em seus parâmetros fisiológicos. Os objetivos desse trabalho foram determinar o intervalo de valores de referência de parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos e ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) da Unidade de Produção Animal do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba (UPA/IPeFarM/UFPB), bem como comparar os dados encontrados com dados publicados para outras unidades de produção animal nacionais e internacionais. Foram utilizados animais saudáveis (n=40/gênero), com 8 a 12 semanas de idade e peso entre 150 e 300 g. Amostras de sangue total foram obtidas por punção intracardiaca e utilizadas para a quantificação de eritrócitos, leucócitos, plaquetas e dos índices hematimétricos. Foram determinadas as concentrações séricas de glicose, triglicérides, colesterol, proteínas totais, ureia, albumina, creatinina, ácido úrico e a atividade enzimática da aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e fosfatase alcalina. Ao comparar os gêneros, foram observadas diferenças significativas entre todos os parâmetros avaliados. Além disso, foram encontradas discrepâncias entre os valores obtidos (exceto proteínas totais, ácido úrico e hemácias) e resultados de outros criadouros. É necessário, portanto, que cada biotério determine os valores de referência do perfil fisiológico de seus animais, considerando os fatores intrínsecos e extrínsecos na homeostase dos mesmos, a fim de fornecer dados reais para os experimentos de suas instituições. Palavras-chave: ratos Wistar, bioquímica, hematologia.

Animals from different breeding sites may show variations in their physiological parameters. The aims of this study were to determine the range of reference values for biochemical and hematological parameters of Wistar rats (*Rattus norvegicus*) from the Animal Production Unit of the Research Institute for Drugs and Medicines at the Federal University of Paraíba (UPA/IPeFarM/UFPB), as well as comparing the data found with published data for other national and international animal production units. Healthy animals (n=40/gender) with 8 to 12 weeks of age and weight between 150 and 300 g were used. Whole blood samples were obtained by intracardiac puncture and used for the quantification of erythrocytes, leukocytes, platelets and hematimetric indices. Serum concentrations of glucose, triglycerides, cholesterol, total proteins, urea, albumin, creatinine, uric acid and the enzymatic activity of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and alkaline phosphatase were determined. When comparing the genders, significant differences were observed between all parameters evaluated. In addition, discrepancies were found between the values obtained (except total proteins, uric acid and red blood cells) and results from other breeding sites. Therefore, it is necessary that each bioterium determines the reference values of the physiological profile of

ANEXO 2 – Artigos publicados durante a vigência do doutorado (6/6)

<http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170529>

Quim. Nova, Vol. 43, No. 6, 692-696, 2020

DOIS NOVOS ALCALOIDES AZAFENANTRENO DE *Anaxagorea dolichocarpa* Sprague & Sandwith

Kaio A. Sales^a, Anderson A. V. Pinheiro^a, Diego I. A. F. Araújo^a, Rodrigo S. de Andrade^a, Maria de Fátima Agra^a, Marianna V. Sobral^a, Hemerson I. F. Magalhães^a, Valgrácia M. de Sousa^a, Raimundo Braz-Filho^c, Marcelo S. da Silva^a e Josean F. Tavares^{a,*}

^aCentro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900 João Pessoa – PB, Brasil

^bDepartamento de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900 João Pessoa – PB, Brasil

^cDepartamento de Química, Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 23890-000 Seropédica – RJ, Brasil

Recebido em 01/11/2019; aceito em 09/03/2020; publicado na web em 20/04/2020

TWO NEW AZAPHENANTHRENE ALKALOIDS FROM *Anaxagorea dolichocarpa* Sprague & Sandwith. A chemical investigation of *Anaxagorea dolichocarpa* Sprague & Sandwith, a member of Annonaceae family, was carried out. The ethanolic extract from the roots of this plant led, by chromatography techniques, to isolation of the new azaphenanthrene alkaloids dolichocarpine (1) and 9-methoxyeupolauramine (2), besides the known alkaloids eupolauramine (3), 3-methoxyeupolauridine (4), eupolauramine (5) and 4-methylsampingine (6). The structures of isolated compounds were established by 1D and 2D NMR, HRESIMS, tandem MSⁿ and IR data. The cytotoxicity of compounds 1 – 5 was evaluated against HCT-116 (human colorectal carcinoma) and L929 (murine fibroblast) cell lines.

Keywords: Annonaceae; *Anaxagorea*; alkaloid; cytotoxicity.

INTRODUÇÃO

Annonaceae é uma família de árvores floríferas, arbustos e cipós com distribuição pantropical, sendo composta por 110 gêneros e aproximadamente 2.430 espécies.^{1,2} No Brasil apresenta ampla distribuição, com cerca de 390 espécies encontradas principalmente na Região Amazônica e Mata Atlântica.^{3,4} As espécies da família são conhecidas pela biossíntese de alcaloides e os estudos demonstraram considerável diversidade estrutural, além de notáveis atividades biológicas para esses metabólitos secundários.^{5,6} Com relação ao gênero, *Anaxagorea* compreende 26 espécies,⁷ ocorrendo nas regiões neotropical e paleotropical, e no Brasil é encontrado principalmente no Norte e Nordeste.⁸⁻¹⁰ Das espécies do gênero investigadas até o presente momento, foram identificados principalmente alcaloides, terpenoides, xantonas, flavonoides e lignoides.¹¹⁻¹⁶ Ao passo que em *Anaxagorea dolichocarpa* Sprague & Sandwith, estudos fitoquímicos prévios permitiram o isolamento de alcaloides azafenantrenos e aporfínicos.^{11,17} Diversos compostos dessas duas subclasses de alcaloides já foram testados em ensaios de atividade citotóxica e

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo químico do extrato etanólico das raízes de *A. dolichocarpa* levou ao isolamento de seis compostos (1–6) (Figura 1), sendo esse o primeiro relato das substâncias 1 e 2 na literatura. Suas estruturas químicas foram determinadas com base na análise dos dados espectroscópicos de RMN uni e bidimensionais, espectrometria de massa de alta resolução com ionização por *electrospray* (EMAR-IES) e comparação com dados da literatura. Os dados de RMN de ¹H e ¹³C dos compostos 1 e 2 estão compilados na Tabela 1.

O composto 1 foi isolado como cristais amarelados. O espectro de EMAR-IES mostrou o pico do íon [M+H]⁺ com *m/z* 283,1073 (calcd. para C₁₈H₁₇N₂O₂, 283,1077), compatível com a fórmula molecular C₁₈H₁₇N₂O₂. O espectro de infravermelho mostrou absorção de duas bandas em 3306 e 3139 cm⁻¹ de estiramento N-H₂, banda de carbonila de amida em 1646 cm⁻¹, absorções em 1618 e 1582 cm⁻¹ de C=C de aromático, além do sinal em 1055 cm⁻¹ de estiramento C-O. O espectro de RMN de ¹H (CD₃OD, 400 MHz) mostrou seis sinais de prótons aromáticos, sendo dois dupletos em δ_H 8,95 (d; J = 4,8 Hz)