

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

Ramon Ramos Marques de Souza

**Um novo complexo sulfonilditiocarbimato de índio(III) apresenta atividade
anticâncer *in vitro* contra células de câncer colorretal**

**João Pessoa, PB
2025**

Ramon Ramos Marques de Souza

Um novo complexo sulfonilditiocarbimato de índio(III) apresenta atividade anticâncer *in vitro* contra células de câncer colorretal

Dissertação 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 Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dr^a. Marianna Vieira Sobral

Coorientador: Dr. Rafael Carlos Ferreira

João Pessoa, PB

2025

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

S729n Souza, Ramon Ramos Marques de.

Um novo complexo sulfonilditiocarbimato de
índio(III) apresenta atividade anticâncer in vitro
contra células de câncer colorretal / Ramon Ramos
Marques de Souza. - João Pessoa, 2025.

125 f. : il.

Orientação: Marianna Vieira Sobral.

Coorientação: Rafael Carlos Ferreira.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Câncer colorretal. 2. Estresse oxidativo. 3.
Complexo de índio(III). 4. Apoptose. 5. HCT-116. 6.
MAPKs. I. Sobral, Marianna Vieira. II. Ferreira, Rafael
Carlos. III. Título.

UFPB/BC

CDU 616-006.6(043)



Ata da 522^a (quingentésima vigésima segunda) Dissertação de Mestrado do(a) aluno(a) do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos **Ramon Ramos Marques de Souza**, candidato(a) ao Título de “Mestre” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia.

Às quatorze horas (14h30) do dia vinte e sete de agosto do ano de dois mil e vinte e cinco (27/08/2025), no Auditório do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos, da Universidade Federal da Paraíba, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar o(a) discente **Ramon Ramos Marques de Souza**, candidato(a) ao Título de “MESTRE” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia. Foram componentes da Comissão Examinadora os pesquisadores Gláucia Veríssimo Faheina Martins, Ph.D em Biotecnologia; Adriano Francisco Alves, Ph.D em Patologia; Rafael Carlos Ferreira, Ph.D em Farmacologia e Marianna Vieira Sobral, Ph.D em Farmacologia. Sendo o penúltimo, docente do Centro Universitário Maurício de Nassau e os demais integrantes do corpo docente da Universidade Federal da Paraíba. Dando início aos trabalhos, o(a) Presidente da Comissão, professor(a) Marianna Vieira Sobral, após declarar os objetivos da reunião, apresentou o(a) candidato(a) **Ramon Ramos Marques de Souza**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado “**Um novo complexo sulfonilditiocarbimato de índio(III) apresenta atividade anticâncer *in vitro* contra células de câncer colorretal**”. Após discorrer sobre o referido tema durante cerca de quarenta 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) **Ramon Ramos Marques de Souza** legalmente habilitado(a) a receber o Título de “MESTRE” 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. Rafael Carlos Ferreira (Coorientador)

Prof.^a Dr.^a Gláucia Veríssimo Faheina Martins (Examinadora)

Prof. Dr. Adriano Francisco Alves (Examinador)

Ramon Ramos Marques de Souza (Discente)

Aos meus pais, o amor que vocês têm por mim é um dos motivos que me estimula a lutar e vencer todos os dias.

AGRADECIMENTOS

Painho e Mainha, dedico esta, bem como todas as minhas demais conquistas a vocês. Obrigado por nunca terem medido esforços para me proporcionar a melhor qualidade de vida e ensino, e compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho.

Ao meu irmão, Samuel, que com muita felicidade e pouca paciência, trouxe-me alegria em cada momento compartilhado.

À minha família pelas palavras de apoio, confiança e incentivo. Amo muito vocês!

Lela, eu te agradeço demais por sempre me acolher como um filho, você e sua família (Amanda, Emeson, Diego, Thaty, Tardely, Neide, Cleide e Joseph): obrigado por sempre estarem de braços abertos aqui em João Pessoa, permitindo que cada fim de semana longe de casa, fosse um momento de aconchego.

Às minhas tias Teca e Judite, por todo amor e carinho fortemente demonstrados. Bem como, à minha madrinha, Elizete, e toda a sua família, em especial Elizanne, que sempre estiveram ao meu lado dando apoio desde sempre.

À minha orientadora, Prof.^a Marianna. Muito obrigado por todo amor demonstrado, todo o conhecimento compartilhado, por sempre cobrar o meu melhor, pela força e principalmente pelo carinho. Obrigado pelo acolhimento, por fazer do ONCOFAR minha segunda casa. A senhora sempre será a minha melhor referência, a vozinha na minha cabeça dizendo “isso tá certo, isso tá errado! Não podemos afirmar isso, isso são vozes da sua cabeça!”. A confiança em meu trabalho, na minha pesquisa e minha postura como pesquisador existem hoje graças a você.

À minha amiga e parceira de laboratório, Karinne Gadelha. Agradeço por continuar sendo um porto seguro para mim. Seu futuro é brilhante e sem você esse trabalho não existiria, te amo!

Ao meu coorientador, Dr. Rafael Carlos, você é uma das minhas fontes de inspiração. Agradeço cada conselho e momentos de ensino e apoio dentro e fora da universidade. Vou te levar para sempre comigo!

É com muita admiração e enorme respeito que agradeço a participação dos membros da banca examinadora, Prof.^a Dr.^a Gláucia Veríssimo Faheina Martins e Prof. Dr. Adriano Francisco Alves, que aceitaram o convite para avaliar, acrescentar e contribuir para que este trabalho se tornasse ainda melhor, e por concordarem em

eternizar este momento de obtenção de título. Bem como aos membros suplentes, Prof. Dr. Claudio Roberto Bezerra dos Santos e Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe.

À equipe ONCOFAR - Ana Paula, Sâmia Duarte, Prof. Juan Carlos, Rafael Carlos, Paulo Bruno, Mariana Dantas, Moisés Wanderley, Karinne, Isione Oliveira, Geovana, Victor Hugo, Gabriela, Isabela Cristina, Júnior Abreu, Heivila, Erika Raisla, Pablo, Patricianny - pelos diversos momentos que viabilizaram e tornaram possível a realização deste trabalho. Agradeço especialmente a Ana Paula pelo perfeito exemplo de positividade e afetividade.

Ao meu amigo, Igor Gabriel que está sempre me incentivando, compartilhando sua felicidade e animando todos mesmo nos momentos difíceis.

Aos amigos com quem convivi intensamente durante os últimos anos, pelo companheirismo e pela troca de experiências que possibilitou o meu entendimento e evolução. Obrigado por dividirem o seu melhor! Vocês tornaram essa jornada mais leve e me deram autoconfiança para não desistir.

Agradeço a todos os colaboradores, a participação de todos vocês foi o que permitiu a conclusão deste trabalho.

Aos meus professores, técnicos e auxiliares da pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, bem como a Universidade Federal da Paraíba da UFPB, que oportunizaram a construção de um futuro que valoriza a ciência e a saúde pública de qualidade.

Agradeço ao povo brasileiro pelo apoio à ciência e à educação, pilares que tornam possíveis pesquisas como esta, mesmo em momentos em que o conhecimento foi desacreditado e tratado como secundário. Mantemos, contudo, a esperança em um país que reconheça o valor da ciência e invista, de forma contínua, em educação, pesquisa e transformação social.

Aos órgãos de financiamento e incentivo a pesquisa, CNPq, CAPES e FAPESQ, essenciais para a construção deste e de muitos outros trabalhos.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desta pesquisa: **muito obrigado!**

“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.”

Albert Einstein (1879 – 1955)

SOUZA, R.R.M. **Um novo complexo sulfonilditiocarbimato de índio(III) apresenta atividade anticâncer *in vitro* contra células de câncer colorretal.** 2025. 127 f. **Dissertação** (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB/CCS, João Pessoa.

RESUMO

O câncer colorretal (CCR) figura entre os tumores mais incidentes e letais no mundo. Apesar dos avanços terapêuticos, as opções disponíveis ainda apresentam limitações relacionadas à toxicidade e à quimiorresistência, evidenciando a necessidade de novas alternativas. O objetivo deste estudo foi investigar o efeito citotóxico e os mecanismos moleculares associados à ação do complexo de índio(III) com sulfonilditiocarbimato (InFP) em linhagens de CCR. Por meio do ensaio de MTT, a concentração capaz de inibir 50% a viabilidade celular (IC_{50}) foi avaliada nas linhagens HCT-116, HT-29, LoVo e HEK-293 revelando que o InFP foi mais citotóxico para a linhagem HCT-116 (IC_{50} : $2,87 \pm 0,14\mu M$). A doxorrubicina (DXR) foi usada como a droga padrão para os experimentos apresentando IC_{50} de $2,53 \pm 0,14\mu M$. Ao comparar com a linhagem não tumoral HEK-293 (IC_{50} : $107,7 \pm 2,07\mu M$), o índice de seletividade (IS) foi de 37,53 e 0,20 para o InFP e DXR, respectivamente, indicando que composto é mais seletivo que a droga padrão. O InFP induziu morte celular por apoptose, a partir da presença da condensação e fragmentação da cromatina e formação de blebs de membrana, observados por meio de microscopia de fluorescência confocal a laser, utilizando o laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP). A quantificação mostrou um aumento significativo de células em apoptose inicial na menor concentração testada ($1,5 \mu M$: $71,62 \pm 3,76\%$; $p < 0,05$), enquanto nas maiores concentrações houve um aumento significativo de apoptose tardia/necrose ($76,57 \pm 1,15\%$ e $84,29 \pm 1,03\%$, para 3 e $6 \mu M$, respectivamente; $p < 0,05$). O Hoechst 34580 reiterou a condensação da cromatina, aumentando em $122,1 \pm 12,36\%$ e $173,0 \pm 12,53\%$ (3 e $6 \mu M$, respectivamente; $p < 0,01$), o percentual de fluorescência emitido pelas células HCT-116. Por meio da marcação com JC-1, foi possível observar que o InFP induz perda do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), assim a apoptose é por meio da via intrínseca. Além disso, o efeito citotóxico do InFP é dependente de estresse oxidativo. O pré-tratamento com o antioxidante N-acetilcisteína (NAC, 5 mM) previu significativamente a citotoxicidade induzida pelo composto (viabilidade $> 80\%$ para $3 \mu M$ do InFP). Investigou-se também o envolvimento das vias de sinalização MAPKs por meio dos inibidores SP600125 (JNK), U0126 (MEK/ERK1/2) e PD169316 (p38). Observou-se que a inibição de JNK (viabilidade $< 23\%$ para $1,5 \mu M$ do InFP) e p38 (viabilidade $< 45\%$ para $1,5 \mu M$ do InFP) potencializou o efeito citotóxico do InFP. Esses achados apontam que o InFP induz apoptose em células HCT-116 de forma dependente de estresse oxidativo e modulado por MAPKs, configurando-se como um candidato promissor para o tratamento do CCR.

Palavras-chave: HCT-116; complexo de índio(III); apoptose; estresse oxidativo; MAPKs.

SOUZA, R.R.M. **A new indium(III) sulfonyldithiocarbamate complex exhibits in vitro anticancer activity against colorectal cancer cells.** 2025. 127 f. Dissertation (Master's in Natural and Synthetic Bioactive Products) – UFPB/CCS, João Pessoa.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) ranks among the most prevalent and lethal tumors worldwide. Despite therapeutic advances, available options still present limitations related to toxicity and chemoresistance, highlighting the need for novel alternatives. The aim of this study was to investigate the cytotoxic effect and molecular mechanisms associated with the action of the indium(III) sulfonyldithiocarbamate complex (InFP) in CRC cell lines. Using the MTT assay, the concentration capable of inhibiting 50% of cell viability (IC_{50}) was evaluated in HCT-116, HT-29, LoVo, and HEK-293 cell lines, revealing that InFP was more cytotoxic to HCT-116 cells (IC_{50} : $2.87 \pm 0.14 \mu\text{M}$). Doxorubicin (DXR) was used as the reference drug, showing an IC_{50} of $2.53 \pm 0.14 \mu\text{M}$. When compared to the non-tumorigenic HEK-293 cell line (IC_{50} : $107.7 \pm 2.07 \mu\text{M}$), the selectivity index (SI) was 37.53 and 0.20 for InFP and DXR, respectively, indicating that the compound is more selective than the reference drug. InFP induced cell death by apoptosis, evidenced by chromatin condensation and fragmentation, as well as membrane blebbing, observed through confocal laser fluorescence microscopy using acridine orange (AO) and propidium iodide (PI). Quantification showed a significant increase in early apoptotic cells at the lowest concentration tested ($1.5 \mu\text{M}$: $71.62 \pm 3.76\%$; $p < 0.05$), whereas higher concentrations significantly increased late apoptosis/necrosis ($76.57 \pm 1.15\%$ and $84.29 \pm 1.03\%$ for 3 and $6 \mu\text{M}$, respectively; $p < 0.05$). Hoechst 34580 staining confirmed chromatin condensation, with fluorescence increasing by $122.1 \pm 12.36\%$ and $173.0 \pm 12.53\%$ (3 and $6 \mu\text{M}$, respectively; $p < 0.01$) in HCT-116 cells. JC-1 staining revealed that InFP induces loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\text{Ψ}_m$), indicating that apoptosis occurs via the intrinsic pathway. Moreover, the cytotoxic effect of InFP was dependent on oxidative stress. Pretreatment with the antioxidant N-acetylcysteine (NAC, 5 mM) significantly prevented compound-induced cytotoxicity (viability $> 80\%$ for $3 \mu\text{M}$ InFP). The involvement of MAPK signaling pathways was also investigated using the inhibitors SP600125 (JNK), U0126 (MEK/ERK1/2), and PD169316 (p38). Inhibition of JNK (viability $< 23\%$ at $1.5 \mu\text{M}$ InFP) and p38 (viability $< 45\%$ at $1.5 \mu\text{M}$ InFP) enhanced the cytotoxic effect of InFP. These findings demonstrate that InFP induces apoptosis in HCT-116 cells in an oxidative stress-dependent manner, modulated by MAPKs, establishing it as a promising candidate for CRC treatment.

Keywords: HCT-116; indium(III) complex; apoptosis; oxidative stress; MAPK.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Os <i>hallmarks</i> associados ao câncer colorretal (CCR).....	25
Figura 2. Homeostase e regeneração do epitélio intestinal.....	29
Figura 3. Evolução do câncer colorretal (CCR).....	31
Figura 4. Progressão e estadiamento do câncer colorretal (CCR).....	37
Figura 5. Mecanismo de ação do 5-fluorouracil (5-FU) e seus principais metabólitos ativos.....	39
Figura 6. Vias intrínseca e extrínseca da apoptose.....	43
Figura 7. Sinalização celular induzida por ROS no câncer.....	48
Figura 8. Cascatas de sinalização das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs).....	51
Figura 9. Estrutura e mecanismo de ativação das cinases RAS e RAF na cascata de sinalização RAS/RAF/MAPK.....	53
Figura 10. Cascata de sinalização das proteínas cinases c-Jun N-terminal (JNKs).....	56
Figura 11. Cascata de sinalização das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos p38 (p38 MAPK).....	58
Figura 12. Estrutura molecular bis(N-metilsulfonilditiocarbamato)índio(III) tetrafenilfosfônio (InFP).....	62
Figura 13. Síntese do bis(N-metilsulfonilditiocarbamato)índio(III) tetrafenilfosfônio (InFP).....	66
Figura 14. Avaliação morfológica da morte celular por coloração com laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP) em células HCT-116 tratadas com InFP ou doxorrubicina (DXR) por 48h.....	77
Figura 15. Imagens representativas das características da apoptose em células de câncer colorretal HCT-116 após 48 h de tratamento com composto de coordenação de índio (InFP), marcadas com laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP).....	79
Figura 16. Efeito do composto de coordenação de índio (InFP) ou doxorrubicina (DXR) em células de câncer colorretal humano HCT-116, após 48 h de tratamento, analisada por coloração de laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP).....	80
Figura 17. Imagens representativas de células de câncer colorretal humano HCT-116 marcadas com Hoechst 34580 após 48h de tratamento com composto de coordenação de índio (InFP) ou doxorrubicina (DXR).....	82

Figura 18. Efeito do composto de coordenação de índio (InFP) ou doxorrubicina (DXR) em células de câncer colorretal humano HCT-116, após 48 h de tratamento, marcadas com Hoechst 34580.....	83
Figura 19. Imagens representativas de células de câncer colorretal HCT-116 após 48 h de tratamento com composto de coordenação de índio (InFP) e marcadas com JC-1.....	84
Figura 20. Razão da fluorescência do JC-1 em células de câncer colorretal HCT-116 tratadas com o composto de coordenação de índio (InFP) após 48 h.....	85
Figura 21. Citotoxicidade do composto de coordenação de índio (InFP) ou doxorrubicina (DXR) na linhagem de câncer colorretal HCT-116 na presença ou ausência N-acetilcisteína (NAC) após 72 h de tratamento.....	86
Figura 22. Citotoxicidade do composto de coordenação de índio (InFP) ou doxorrubicina (DXR) na presença ou ausência dos inibidores de MAPK na linhagem de câncer colorretal HCT-116 após 72 h de tratamento, através do ensaio do MTT.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Citotoxicidade e Índice de seletividade (IS) do composto de coordenação de índio (InFP) ou doxorrubicina (DXR) em linhagens de células de câncer colorretal e na linhagem não tumoral HEK-293 após 72 h de tratamento, por meio do ensaio do MTT.....	76
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Fatores de risco associados ao câncer colorretal (CCR).....	26
Quadro 2. Sistema TNM de estadiamento para o CCR.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA	Análise de variância
LA	Laranja de acridina
APAF1	Fator 1 ativador de protease apoptótica
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
ATF2	Fator de transcrição ativador-2
CAT	Catalase
CBiotec	Centro de Biotecnologia
CCEN	Centro de Ciências Exatas e da Natureza
CCR	Câncer Colorretal
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CDK	Cinase dependentes de ciclina
Cl₅₀	Concentração inibitória média
CKI	Inibidor de CDK
CCU	Câncer do colo do útero
Cys	Cisteína
DCFH-DA	2'7-dicloro dihidrofluoresceína diacetato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERK	Proteína cinase regulada por sinal extracelular
DXR	Doxorrubicina
EGF	Fator de crescimento epidérmico
GDP	Difosfato de guanosina
GEF	Fator de troca de nucleotídeo de guanina
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutâmico
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
GPx	Glutationa peroxidase

GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa
GST	Glutationa transferase
GTP	Trifosfato de guanosina
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico
His	Histidina
IARC	<i>International Agency for Research of Cancer</i>
IκB	Inibidor de κ appa B
IKK	Complexo I κ B cinase
INCA	Instituto Nacional de Câncer
InFP	bis(N-metilsulfonilditiocarbamato)índio(III) tetrafenilfosfônio
IPeFarM	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
JNK	Proteína cinase c-Jun N-terminal
LDH	Lactato desidrogenase
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
mTORC	Complexo 2 do alvo da rapamicina em mamíferos
NAC	N-acetilcisteína
NIK	Proteína indutora de NF- κ B
NF-κB	Fator Nuclear κ appa B
NOS	Óxido nítrico sintase
NOX	NADPH oxidase
OncoFar	Laboratório de Oncofarmacologia
p38 MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno p38
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PBS	Solução tampão fostato
PDK1	Proteína cinase dependente de fosfoinositídeo-1
PI3K	Fosfoinositídeo 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
PTEN	Homólogo de fosfatase e tensina
Rb	Retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucleico
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RSK	Proteína cinase ativada por ERK
RTK	Receptor tirosina cinase
SAPK	Proteína cinase ativada por estresse
SBF	Soro fetal bovino
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Ser	Serina
SIH	Sistema de Informações Hospitalares
SOD	Superóxido dismutase
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
Tyr	Tirosina
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
Val	Valina
Tyr	Tirosina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	23
2.1. Aspectos gerais do câncer colorretal (CCR).....	24
2.2. Patogênese do Câncer colorretal.....	28
2.3. Diagnóstico e tratamento do CCR.....	35
2.4. Morte celular programada ou apoptose.....	44
2.5. Estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio (ROS)	47
2.6. Proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs).....	50
2.6.1. Via de sinalização intracelular das Proteínas Cinases Reguladas por Sinais Extracelulares (ERK) e o câncer.....	51
2.6.2. Via de sinalização intracelular das Proteínas Cinases c-Jun N-terminal (JNK) e o câncer.....	54
2.6.3. Via de sinalização intracelular das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos p38 (p38 MAPK) e o câncer.....	57
2.7. O índio(III) e drogas metálicas.....	60
3. OBJETIVOS.....	64
3.1. Objetivos gerais.....	64
3.2. Objetivos específicos.....	64
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	66
4.1. Local da pesquisa.....	66
4.2. Material.....	66
4.2.1. Amostra teste.....	66
4.2.2. Substâncias e reagentes.....	67
4.2.3. Equipamentos.....	68
4.2.4. Linhagens celulares tumorais e não tumoral humanas.....	68
4.3. Métodos.....	69
4.3.1. Preparo da amostra.....	69
4.3.2. Avaliação da citotoxicidade do InFP em linhagens de células tumorais e não tumoral humanas e determinação do Índice de Seletividade (IS)	69
4.3.3. Investigação do tipo de morte celular induzida pelo InFP por microscopia de fluorescência confocal a <i>laser</i>	70

4.3.3.1. Análise morfológica de células HCT-116 utilizando laranja de acridina e iodeto de propídeo.....	70
4.3.3.2. Análise de alterações nucleares em células HCT-116 após marcação com Hoechst 34580.....	71
4.3.3.3. Análise de células HCT-116 marcadas com JC-1	72
4.3.4. Avaliação da citotoxicidade do InFP na presença ou ausência de N acetilcisteína (NAC).....	72
4.3.5. Avaliação da citotoxicidade do InFP na presença ou ausência de inibidores de MAPKs (iMAPKs).....	73
4.3.6. Análise estatística.....	73
5. RESULTADOS.....	76
5.1. Citotoxicidade do InFP em diferentes linhagens de câncer colorretal.....	76
5.2. Morfologia das células HCT-116 por análise de microscopia de fluorescência confocal a <i>laser</i> após marcação com laranja de acridina e iodeto de propídeo.....	77
5.3. Alterações nucleares induzidas por InFP em células HCT-116 analisadas por microscopia confocal a <i>laser</i> após coloração com Hoechst 34580.....	81
5.4. Efeito do InFP no potencial de membrana mitocondrial em células HCT-116.....	83
5.5. Citotoxicidade do InFP em células HCT-116 na presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC).....	85
5.6. Citotoxicidade do InFP em células HCT-116 na presença ou ausência de inibidores das MAPKs.....	86
6. DISCUSSÃO.....	90
7. CONCLUSÃO.....	104
REFERÊNCIAS.....	106
ANEXOS.....	120

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um conjunto de mais de 100 doenças órgão específica caracterizadas pelo crescimento celular descontrolado e pela capacidade de invadir tecidos e se espalhar pelo organismo de forma espontânea, causando metástase. Essa progressão da célula tumoral resulta de alterações genéticas e epigenéticas que comprometem vias fundamentais, como reparo do DNA, proliferação e resistência à morte celular (Ahmad; Ahsan, 2020; Hanahan, 2022). Estas e outras características fazem do câncer um grande desafio de saúde pública global, com cerca de 20 milhões de novos casos e 9,7 milhões de mortes registradas em 2022 no mundo (Bray et al., 2024). No Brasil, estimam-se mais de 700 mil novos casos por ano no triênio de 2023 a 2025 (INCA, 2022).

O câncer colorretal (CCR) é um dos tipos mais prevalentes, com alta incidência e uma origem ligada à transformação de lesões benignas em malignas que afetam a parte final do intestino grosso (cólon e reto) (INCA, 2022; Murphy; Zaki, 2024). Sua natureza heterogênea influencia diretamente no seu prognóstico e tratamento que pode envolver a retirada cirúrgica do tumor, radioterapia, imunoterapia e, principalmente, quimioterapia (Abedizadeh et al., 2024; Salva de Torres et al., 2024).

Apesar de sua ampla aplicação, os esquemas quimioterápicos convencionais para o tratamento do CCR impõem diferentes limitações, como toxicidade sistêmica e a resistência adquirida pelas células tumorais. O que tem impacto negativo direto no prognóstico dos pacientes, especialmente em casos metastáticos (Salva de Torres et al., 2024). Diante desse cenário, torna-se essencial a busca por novas moléculas bioativas que apresentem maior seletividade, eficácia antitumoral e menor toxicidade.

Assim, a química medicinal tem se dedicado ao desenvolvimento de compostos sintéticos com alta seletividade e menor toxicidade, entre os quais se destacam os complexos metálicos, como os de platina, ouro, cobre e rutênio. Esses compostos apresentam propriedades estruturais e atividade redox que permite a indução da apoptose e inibição da proliferação celular (Alhoshani et al., 2021; Lucaci et al., 2022; Zhang et al., 2022; Kazimir et al., 2024).

Atualmente, complexos metálicos têm ganhado destaque na área biomédica devido às suas propriedades químicas e potencial crescente de uso no diagnóstico e tratamento de várias doenças. Os complexos de índio(III) apresentam maior biodisponibilidade e menores efeitos colaterais em comparação aos sais inorgânicos

(Ajiboye et al., 2023). Dentre as diferentes classes de ligantes que podem ser exploradas, os ditiocarbimatos têm se destacado por sua elevada capacidade de coordenação, estabilidade e propriedades farmacológicas relevantes, representando uma estratégia promissora no desenvolvimento de novas moléculas bioativas contra o câncer (Alhoshani et al., 2021; Ajiboye et al., 2023).

Frente à urgência por tratamentos mais eficazes e seguros, o grupo de pesquisa recentemente testou uma série de seis complexos de sulfonilditiocarbimato de índio(III) em diferentes linhagens tumorais e o bis(N-metilsulfonilditiocarbamato)índio(III) tetrafenilfosfônio (InFP) foi o composto mais ativo para a linhagem de câncer colorretal HCT-116 com IC_{50} de 3,02 μM em 72 horas (Carvalho et al., 2025). Assim, levantamos a hipótese de que o InFP é capaz de induzir morte celular programada de forma seletiva para células de câncer colorretal e modular vias de sinalização específicas necessárias para a sobrevivência ou morte celular, configurando-se como uma alternativa promissora à quimioterapia convencional.

Fundamentação teórica

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Aspectos gerais do câncer colorretal (CCR)

O câncer é uma neoplasia maligna e é caracterizada pelo crescimento celular anormal, com potencial para invadir o órgão de origem e se espalhar para outras partes do corpo (Hanahan, 2022). A natureza espontânea invasiva ou metastática do câncer ocorre por meio do acúmulo de múltiplos fenótipos malignos, resultado de alterações genéticas e epigenéticas que interrompem vias celulares essenciais, como aquelas envolvidas em danos e reparos no DNA, controle da proliferação celular e evasão da resposta imunológica (Ahmad; Ahsan, 2020; Hanahan, 2022).

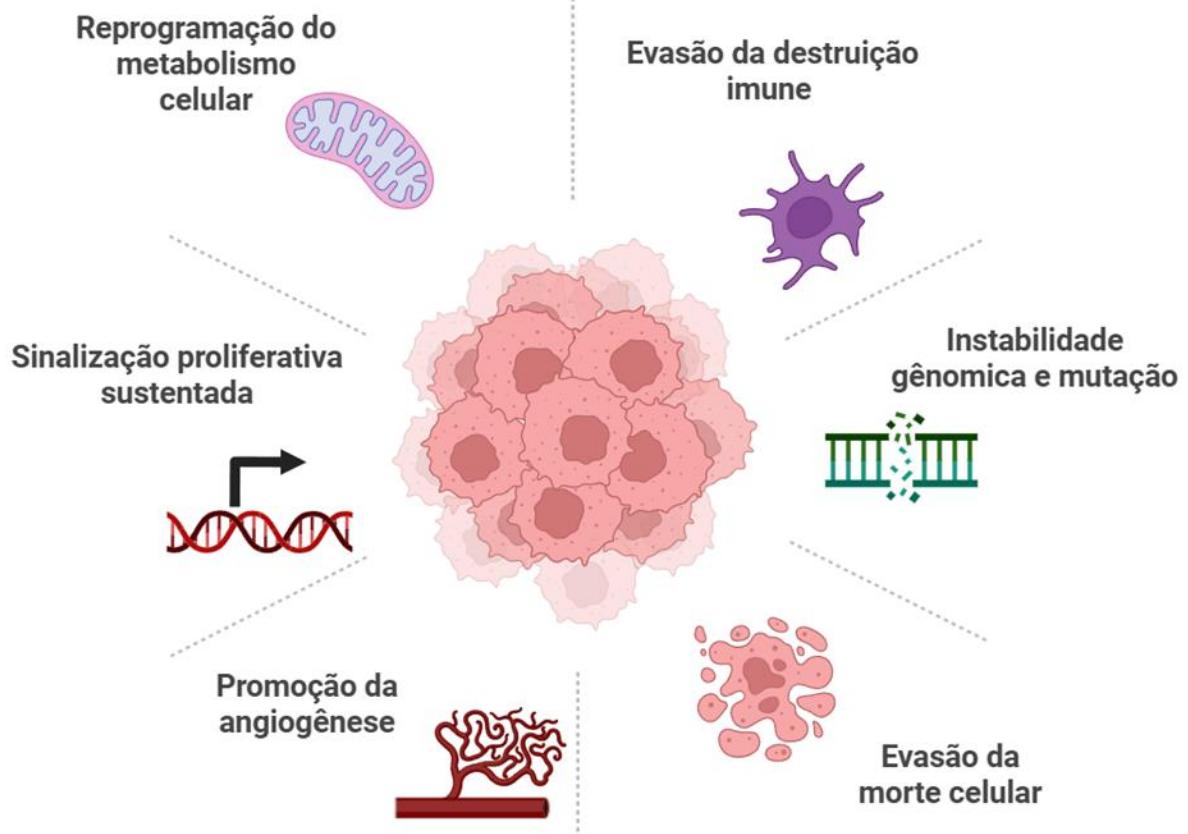
A descrição feita por Hanahan e Weinberg em 2000 de "*The Hallmarks of Cancer*" forneceu uma unificação para as características funcionais cruciais que as células adquirem ao transitar do estado normal para o crescimento neoplásico, identificando o conjunto de características que definem a malignidade. Inicialmente, seis aspectos foram descritos: sinalização proliferativa sustentada, evasão de supressores de crescimento e da apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada e invasão tecidual e metástase (Hanahan; Weinberg, 2000).

Posteriormente, mais dois aspectos foram adicionados: reprogramação do metabolismo celular e evasão da resposta imune. Além disso, a instabilidade do genoma e a inflamação promotora de tumores foram propostas como meios pelos quais as células tumorais poderiam adquirir essas características, denominadas "enabling characteristics" (Hanahan; Weinberg, 2011). A atualização mais recente incorpora novos parâmetros aos *Hallmarks*, incluindo plasticidade fenotípica, reprogramação epigenética não mutacional, microbioma polimórfico e células senescentes (Hanahan, 2022).

Entre os diferentes tipos de câncer, o colorretal se destaca por apresentar grande parte dessas características, que, em conjunto, desempenham papel central em sua iniciação, progressão e resposta às terapias (Ionescu et al., 2023; Salva de Torres et al., 2024) (figura 1).

O câncer colorretal (CCR) surge na mucosa do cólon e do reto, manifestando-se inicialmente como um crescimento anormal de células (pólipsos) não tumorais (Svec; Onhajzer; Korinek, 2024; Yang et al., 2024).

Figura 1. Os *hallmarks* associados ao câncer colorretal (CCR).



Fonte: elaborado pelo autor. Criada com BioRender.com

Nas últimas décadas, avanços significativos foram alcançados na compreensão dos processos celulares e moleculares que sustentam a patogênese do CCR. Globalmente, esse conhecimento tem servido de base para programas atuais de rastreamento, estratégias de prevenção e manejo terapêutico (Gharib; Robichaud, 2024). A natureza altamente heterogênea do CCR exerce influência direta na resposta às terapias e no prognóstico clínico (INCA, 2022; Murphy; Zaki, 2024; Yang et al., 2024).

Apesar dos avanços, estima-se que, em 2020, ocorreram cerca de 2 milhões de novos casos de câncer colorretal e aproximadamente 1 milhão de mortes pela doença, representando 10,7% de todos os casos novos de câncer e 9,5% de todos os óbitos por câncer no mundo, respectivamente (GLOBOCAN, 2022; Morgan et al., 2022). O Brasil segue essa tendência global e o CCR corresponde ao terceiro tipo de câncer mais incidente, sendo estimados mais de 45 mil novos casos para cada ano do triênio de 2023 a 2025 (INCA, 2022).

Em termos de mortalidade no Brasil, dados do INCA revelam um aumento expressivo no número de óbitos por câncer colorretal ao longo dos anos: em 2017, foram registrados 16.696 óbitos, número que subiu para 20.245 em 2020 (INCA, 2017; INCA, 2022). Esses dados refletem não apenas o aumento da incidência, mas também desafios persistentes relacionados ao diagnóstico precoce e ao acesso aos tratamentos, o que mais uma vez destaca a presença de lacunas críticas que podem ser plenamente exploradas para otimizar os desfechos clínicos (YU; HEMMINKI, 2020).

O envelhecimento populacional e as mudanças na prevalência e distribuição dos fatores de risco associados ao desenvolvimento socioeconômico são os principais fatores relacionados a incidência e mortalidade por CCR (GLOBOCAN, 2022; Munteanu; Schwartz, 2024). O desenvolvimento do CCR é influenciado por uma combinação de fatores de risco não modificáveis (idade avançada, sexo, presença de doença inflamatória intestinal (DII) e predisposição genética) e fatores modificáveis, (sobre peso ou obesidade, o tabagismo, o sedentarismo e padrões alimentares inadequados) (Seppälä; Burkhart; Katona, 2023; Ionescu et al., 2023) (Quadro 1).

Quadro 1. Fatores de risco associados ao câncer colorretal (CCR).

Fatores de risco não modificáveis	Fatores de risco modificáveis
Etnia, sexo e idade	Estilo de vida sedentário
Mutações e canceres hereditários	Obesidade
Doenças inflamatórias intestinais	Dieta
Radioterapia abdominal	Tabagismo
Fibrose cística	Consumo de álcool
Acromegalia	Diabetes e resistência à insulina
Colecistectomia	Microbiota intestinal
Uso de hormônios androgênicos ou derivados	

Fonte: Adaptado de Ionescu et al., 2023.

Juntos, esses fatores contribuem para a complexa etiologia multifatorial do CCR. A incidência do adenocarcinoma colorretal varia entre os diferentes grupos populacionais, sendo ligeiramente mais elevada em indivíduos negros em comparação com brancos (La Vecchia et al., 2024). No entanto, essa diferença parece refletir determinantes sociais de saúde, como acesso a serviços médicos, renda,

escolaridade e padrões alimentares, mais do que fatores genéticos propriamente ditos (Gharib; Robichaud, 2024; La Vecchia et al., 2024).

A idade segue como um dos principais fatores de risco, com maior incidência em indivíduos acima dos 65 anos (Svec; Onhajzer; Korinek, 2024). Porém, o crescimento de casos em faixas etárias mais jovens reforça a necessidade de atenção aos fatores de risco modificáveis, incluindo os ambientais e biológicos. Além disso, homens apresentam risco cerca de 1,5 vez maior do que as mulheres, embora a taxa de mortalidade seja maior para o público feminino (Abedizadeh et al., 2024; Chu et al., 2025).

Cerca de 30% dos indivíduos diagnosticados com CCR apresentam um componente familiar, sendo que até 5% possuem uma variante patogênica distinta associada a síndromes hereditárias de CCR já conhecidas (Aoun; Kalady, 2024; Yamada; Kondo, 2025). O câncer hereditário refere-se a uma predisposição aumentada ao desenvolvimento de tumores malignos em decorrência de defeitos genéticos herdados, risco poligênico, fatores epigenéticos ou características ainda não completamente elucidadas (Seppälä; Burkhardt; Katona, 2023). Entre as principais síndromes hereditárias associadas ao aumento do risco gastrointestinal, destacam-se a síndrome de Lynch (SL) e a polipose adenomatosa familiar (PAF), ambas condições pré-neoplásicas e relacionadas à carcinogênese colorretal precoce e agressiva (Aoun; Kalady, 2024; Yamada; Kondo, 2025).

Dentre as condições predisponentes, destacam-se as doenças inflamatórias intestinais, como colite ulcerativa e doença de Crohn, especialmente em casos de inflamação extensa e duradoura (Yu; Hemminki, 2020; Seppälä; Burkhardt; Katona, 2023; Yamada; Kondo, 2025). O risco é potencializado pelo histórico de radioterapia abdominal, fibrose cística e colecistectomia. Fatores comportamentais e metabólicos, como dieta pró-inflamatória, obesidade, tabagismo, etilismo e diabetes mellitus tipo 2, também são implicados na carcinogênese colorretal, por promoverem inflamação crônica, alterações no eixo insulina/IGF-1 e disbiose (La Vecchia et al., 2024; Svec; Onhajzer; Korinek, 2024; Chu et al., 2025).

Nesse contexto, o microbioma intestinal exerce papel crítico (Hanahan, 2022), com desequilíbrio entre microrganismos benéficos e patobiontes, favorecendo a inflamação, o metabolismo tumoral e a progressão neoplásica (Li et al., 2021; Hanahan, 2022). Evidências crescentes indicam que alterações na microbiota

intestinal, a comunidade de microrganismos que habita o trato gastrointestinal (TGI), estão implicadas na iniciação e promoção do CCR (Permain et al., 2024).

2.2. Patogênese do Câncer colorretal

O carcinoma colorretal surge a partir de alterações genéticas em enterócitos da porção final do intestino. O intestino grosso mede aproximadamente 1,5 metro de comprimento. É composto pelo ceco e apêndice, cólon, reto e ânus. O cólon pode ser dividido em ascendente, transverso, descendente e sigmoide. Sua principal função é a absorção de água e eletrólitos, a formação das fezes e a fermentação de resíduos não digeridos por ação da microbiota intestinal (BRASIL, 2024).

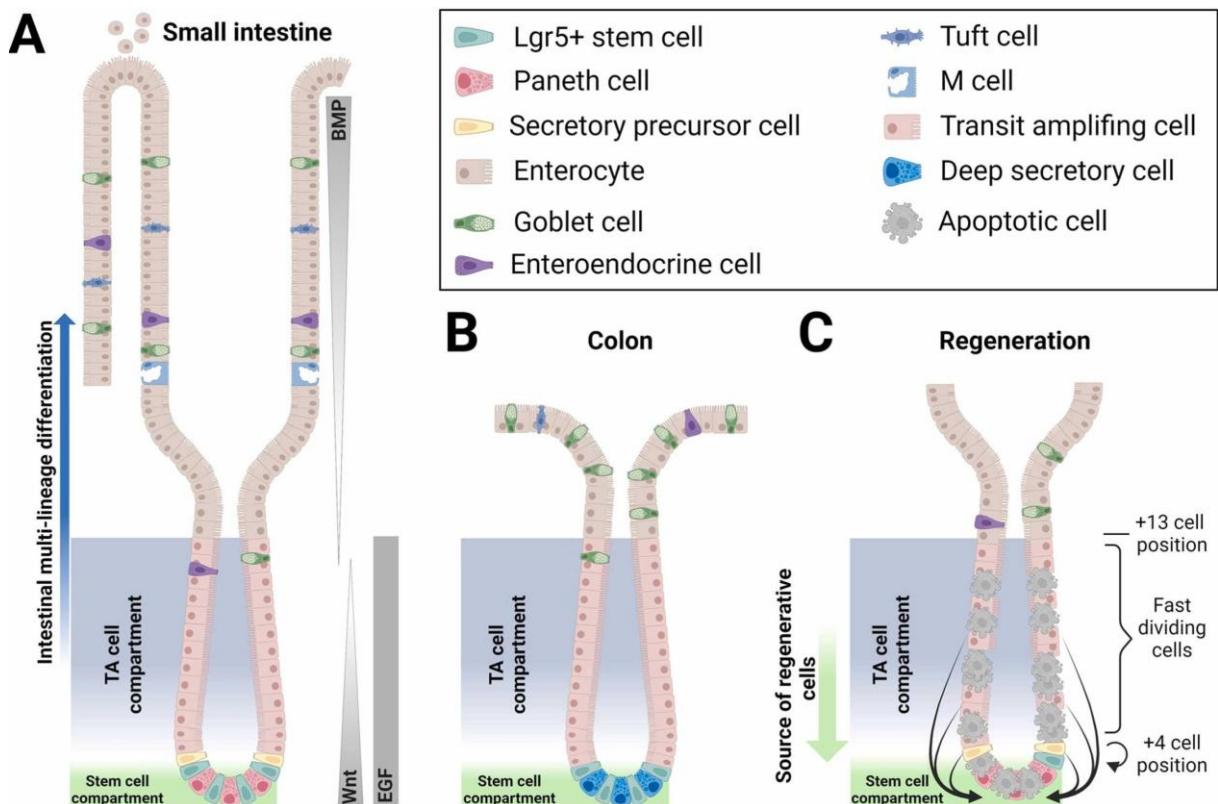
A parede do intestino grosso apresenta as camadas típicas dos órgãos do trato gastrointestinal: mucosa, submucosa, camada muscular e serosa (Svec; Onhajzer; Korinek, 2024). A mucosa do cólon é composta por epitélio, lámina própria e muscular da mucosa. O epitélio normal do cólon é formado por estruturas chamadas “criptas de *Lieberkühn*”, que são numerosas invaginações da mucosa e desempenham um papel fundamental na função adequada do intestino grosso (Gharib; Robichaud, 2024). É composto por diferentes tipos celulares altamente especializados, que atuam de maneira coordenada para manter a integridade funcional do cólon. Os principais tipos celulares encontrados nas criptas incluem células absorptivas (enterócitos), células caliciformes, células enteroendócrinas, células de Paneth e células-tronco (Bonis; Rossell; Gehart, 2021; Santucci; Velez, 2023; Gharib; Robichaud, 2024) (figura 2).

Os enterócitos representam a população celular mais numerosa e absorve água, eletrólitos e nutrientes. Intercaladas a esses, as células caliciformes são responsáveis pela secreção de muco, fundamental para a lubrificação da mucosa intestinal protegendo contra o atrito mecânico e possíveis danos químicos provocados pelo conteúdo fecal (Santucci; Velez, 2023). Outro tipo celular relevante são as células enteroendócrinas que regulam digestão e a motilidade intestinal, secretando hormônios (Gharib; Robichaud, 2024).

Embora sejam classicamente encontradas no intestino delgado, células de Paneth podem estar presentes na base das criptas do cólon e secretam enzimas, fatores de crescimento e peptídeos antimicrobianos, como defensinas, participando na defesa e controle da microbiota da mucosa. Ainda na base das criptas, encontram-se as células-tronco epiteliais intestinais (ISCs) multipotentes, que expressam

receptor 5 acoplado a proteína G, ricas em leucina ($LGR5^+$) e são responsáveis pela renovação contínua do epitélio, garantindo a manutenção da arquitetura e da função epitelial (Bonis; Rossell; Gehart, 2021; Choi; Augenlicht, 2024) (figura 2).

Figura 2. Homeostase e regeneração do epitélio intestinal.



Fonte: Svec; Onhajzer; Korinek, 2024.

Representação esquemática da morfologia e dos tipos celulares do intestino delgado (A) e do intestino grosso (B). (C) Regeneração do epitélio do intestino delgado danificado. O epitélio intestinal se regenera após o dano por meio da desdiferenciação celular, desde as células amplificadoras de trânsito (TA) até a base da cripta. Este processo permite a regeneração completa das criptas intestinais danificadas e a restauração de sua função. As vias de sinalização mais importantes que controlam a homeostase intestinal também são mostradas como gradientes. Proteína morfogenética óssea (BMP); Fator de crescimento epidérmico (EGF).

As ISC s $LGR5^+$ são responsáveis por renovar o epitélio das criptas constitutivamente. Elas residem no fundo das criptas, região conhecida como posição +4, juntamente com as células de Paneth. As células-filhas das células-tronco proliferam e formam uma população de células amplificadoras de trânsito (TA), que estão na região de rápida proliferação e dão origem as diversas células presentes no parênquima intestinal (Testa; Pelosi; Castelli, 2018; Choi; Augenlicht, 2024). O processo de diferenciação e autorrenovação das ISC s é regulado por vias de sinalização, como as mediadas por Wnt, proteína morfogenética óssea (BMP) e fator de crescimento epidérmico (EGF) (Svec; Onhajzer; Korinek, 2024).

A sinalização Wnt é fundamental para a manutenção do fenótipo proliferativo das células-tronco, sendo sustentada por uma comunicação parácrina. Essa regulação ocorre por meio de uma complexa interação entre o microambiente intestinal e sinais moleculares específicos, como os ligantes Wnt e as proteínas da família R-spondina (RSPOs), secretados principalmente por células de Paneth. As RSPOs, ao interagirem com o receptor LGR5, amplificam e potencializam a via Wnt (Choi; Augenlicht, 2024). A sinalização BMP, por sua vez, atua como mecanismo contraposto à via Wnt, favorecendo a diferenciação celular e evitando a hiperproliferação epitelial. O EGF completa esse sistema regulatório promovendo a sobrevivência celular e estimulando a proliferação (Xue et al., 2025).

A via Wnt pode ser classificada em duas grandes categorias: canônica, dependente de β -catenina, e não canônica, independente dessa proteína. Na via canônica, na ausência de sinalização, a β -catenina é continuamente degradada por um complexo destruidor formado pelas proteínas glicogênio sintase quinase 3 β (GSK3 β), caseína quinase 1 α (CK1 α), polipose adenomatosa coli (APC), proteína fosfatase 2 A (PP2A). Quando os ligantes Wnt se ligam aos seus receptores, esse complexo é inibido, permitindo o acúmulo de β -catenina no citoplasma e sua translocação ao núcleo, onde se associa aos fatores de células T/intensificador linfoide (TCF/LEF) para induzir a transcrição de genes relacionados à proliferação e manutenção das células-tronco. Já nas vias não canônicas, como as vias Wnt/PCP (plano de polaridade celular) e Wnt/Ca $^{2+}$, os efeitos são mediados por mecanismos alternativos, modulando processos como polaridade celular, migração e adesão intercelular, que são igualmente relevantes para a morfologia e funcionalidade do epitélio (Svec; Onhajzer; Korinek, 2024; Xue et al., 2025).

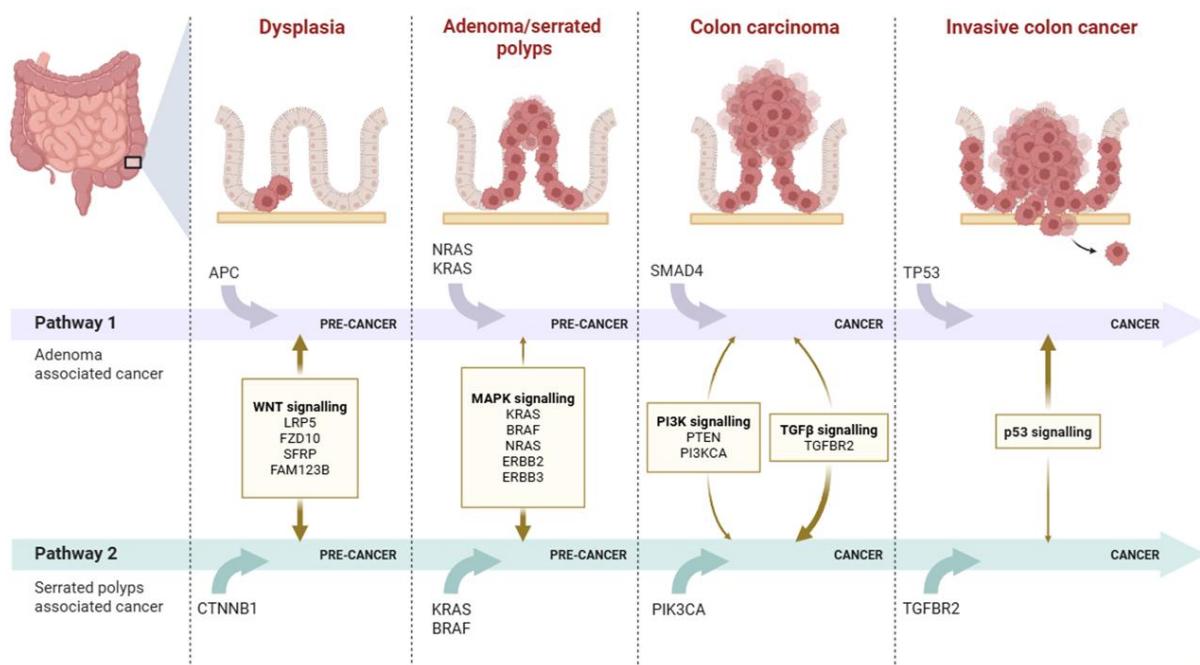
No contexto da carcinogênese colorretal, a ativação aberrante da via Wnt representa um dos eventos iniciais e mais críticos (Svec; Onhajzer; Korinek, 2024) (Figura 3). A carcinogênese é caracterizada pela transformação progressiva de células normais em células malignas, resultado da acumulação de alterações genéticas e epigenéticas que afetam genes reguladores do ciclo celular, apoptose, diferenciação, reparo do DNA e sinalização celular (Orlandi et al., 2023).

Embora existam várias vias pelas quais o CCR pode se desenvolver, a via mais comum envolve a progressão de uma cripta aberrante para um pólipos adenomatoso benigno e, finalmente, para CCR (figura 3). Mutações no gene APC ocorrem precocemente em aproximadamente 70% dos pacientes com adenomas colorretais,

o que leva ao primeiro passo da carcinogênese, a iniciação (Ionescu et al., 2023). Mutações que inativam no gene APC, comprometem a ubiquitinação da β -catenina, resultando em sua estabilização e ativação constitutiva da via canônica da Wnt (JIANG et al., 2023; Gharib; Robichaud, 2024; Yang et al., 2024).

As células iniciadas começam a sofrer crescimento anormal (expansão clonal) e formam pólipos benignos chamados adenomas, que podem variar em tamanho e forma (Figura 3). Etapa conhecida como promoção, segundo passo da carcinogênese. Com o tempo, alguns adenomas podem progredir para uma maior desdiferenciação celular (displasia) que favorece o surgimento de células pré-malignas com maior instabilidade genômica e capacidade proliferativa aumentada (Gharib; Robichaud, 2024; Zhou et al., 2025). Por fim, se não forem tratados, alguns adenomas displásicos na fase de progressão podem se transformar em carcinoma, onde as células anormais invadem as camadas do cólon ou reto e potencialmente se espalham para linfonodos próximos inicialmente ou órgãos distantes. O potencial proliferativo e invasivo do CCR é associado a mutações em KRAS e TP53 (Zhou et al., 2025).

Figura 3. Evolução do câncer colorretal (CCR).



Fonte: Adaptado de Martín-García; García-Aranda; Redondo, 2024

A evolução do CCR envolve duas vias principais. Primeiramente, a via adenoma-carcinoma, caracterizada pelo acúmulo de mutações nas vias de sinalização WNT, MAPK, PI3K, TGF β e p53, levando a uma progressão sequencial de adenoma para carcinoma. Por outro lado, há a via serrilhada (serrated pathway), que apresenta mutações específicas nos genes KRAS ou BRAF, resultando na hiperativação da via de sinalização MAPK. Os estágios do CCR são determinados pela extensão do tumor e pela presença de metástases. Criada com BioRender.com

A mutação em KRAS resulta na ativação contínua de vias que promovem o crescimento e a sobrevivência celular, levando à transição de adenoma para carcinoma (Ionescu et al., 2023). A alteração genética final é a inativação do gene TP53, que desempenha um papel crítico no reparo do DNA, na regulação do ciclo celular e na apoptose (JIANG et al., 2023; Yang et al., 2024). Esses eventos são frequentemente chamados de via "APC-KRAS-TP53" ou modelo de *Vogelstein* de transição fenotípica adenoma-carcinoma-metástase (Fearon; Vogelstein, 1990; Nakanishi; Diaz-Meco; Moscat, 2019; Zhou et al., 2025). Vale ressaltar que o modelo de *Vogelstein* representa uma estrutura simplificada para a compreensão dos eventos genéticos envolvidos na progressão do CCR e que alterações genéticas adicionais e interações complexas entre vários genes e vias podem corroborar a patogênese dessa doença (Abedizadeh et al., 2024).

Um mecanismo alternativo à via adenoma-carcinoma convencional envolve o surgimento do câncer colorretal a partir de pólipos serrilhados (Li et al., 2021). O modelo de *Vogelstein* afirma que o surgimento do CCR é na base das criptas intestinais se desenvolvendo no sentido do lúmen do órgão, traçando o perfil "bottom-up". Os pólipos ou adenomas serrilhados representam um grupo heterogêneo de lesões neoplásicas, caracterizadas por uma arquitetura epitelial com morfologia em "dente de serra", evidenciada principalmente pelo padrão serrilhado do epitélio das criptas intestinais (O'Brien; Gibbons, 1996; Ma et al., 2018). A via serrilhada pode se originar de diferentes populações celulares do epitélio intestinal, caracterizando assim, um processos de metaplasia (Chen et al., 2021; Martín-García; García-Aranda; Redondo, 2024) (figura 3).

Foi proposto que a neoplasia serrilhada possa surgir por meio de uma transformação associada à metaplasia de células diferenciadas localizadas na porção superior das criptas do colón, podendo adquirir características neoplásicas em resposta a alterações no microambiente e estímulos inflamatórios (Svec; Onhajzer; Korinek, 2024). Caracterizando um modelo de tumorigênese denominado "top-down". Nesse contexto, o papel do microambiente tumoral e a influência da microbiota intestinal têm sido alvo de intensas investigações, sugerindo que comunidades microbianas distintas podem modular vias de carcinogênese específicas (Chen et al., 2021; Avelar-Barragán et al., 2022).

As principais alterações moleculares observadas nessas lesões envolvem mutações no gene BRAF (*B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*), sendo a

$BRAF^{V600E}$ a mais relevante (Aiderus et al., 2024). Essa mutação leva à ativação constitutiva da proteína quinase BRAF, impactando diretamente a sinalização da via MAPK/ERK 1/2. Cerca de 10% dos casos de câncer colorretal evoluem por essa via serrilhada de neoplasia (Aiderus et al., 2024; Chen et al., 2021) (figura 3).

O câncer associado à colite (CAC) é uma forma específica de CCR relacionada à inflamação crônica do cólon, especialmente em pacientes com doença inflamatória intestinal (DII), como a retocolite ulcerativa (RCU) persistente ou severa (Li et al., 2021), que passa a promover alterações genéticas e moleculares no epitélio do colón, aumentando o risco de transformações malignas (Hanahan, 2022; Marynczak et al., 2022). Esse risco é proporcional ao tempo e à extensão da inflamação (Marynczak et al., 2022). O CAC apresenta particularidades etiológicas, genéticas e terapêuticas (Lichtenstern et al., 2020.). Pacientes com RCU extensa e duradoura, especialmente com acometimento de todo o cólon, estão entre os mais suscetíveis. No entanto, a maioria dos indivíduos com DII não desenvolve CAC, que representa cerca de 2% de todos os casos de CCR (Gharib; Robichaud, 2024).

Podemos observar que, semelhante aos outros tipos de câncer, o CCR é uma doença complexa caracterizada predominantemente por alterações genômicas (JIANG et al., 2023). O acúmulo de mutações em genes e de aberrações cromossômicas durante o desenvolvimento e progressão dos tumores é chamado de instabilidade genômica (Hanahan, 2022). Este processo se refere a uma maior propensão para alterações genéticas dentro das células e desempenha um papel significativo no desenvolvimento e progressão do CCR. Existem duas formas principais de instabilidade do genoma no CRC: instabilidade cromossômica (CIN, do inglês *chromosomal instability*) e instabilidade de microssatélites (MSI, do inglês *microsatellite instability*) (Li et al., 2021; JIANG et al., 2023; Martín-García; García-Aranda; Redondo, 2024).

A CIN está presente em aproximadamente 85% dos casos de CCR e caracterizada por alterações no número (aneuploidia) e na estrutura dos cromossomos, como deleções, inserções, amplificações e translocações, resultando em perda de heterozigosidade (LOH) e variações no número de cópias gênicas. No CCR, esse processo afeta diretamente genes-chave, como APC, TP53, KRAS e BRAF. A progressão do adenoma ao carcinoma, conforme descrito no modelo de Vogelstein, é um reflexo típico da instabilidade cromossômica (Dunne; Arends, 2024; Yang et al., 2024)

Por outro lado, cerca de 15–20% dos CRCs evoluem pela via da instabilidade de microssatélites (MSI) (Yamada; Kondo, 2025). Microssatélites são regiões repetitivas curtas do DNA que representam cerca de 3% do genoma humano. Essas regiões, devido à sua natureza repetitiva, são particularmente suscetíveis a erros durante a replicação do DNA (Yang et al., 2024). Normalmente, esses erros são corrigidos pelo sistema de reparo de pareamento incorreto (MMR, do inglês *mismatch repair*) de bases.

MLH1 (do inglês, MutL homolog 1), MSH2 e MSH6 (do inglês, MutS homolog 2 e 6), PMS2 (do inglês, Postmeiotic segregation increased 2) e EPCAM (do inglês, Epithelial Cell Adhesion Molecule) são exemplos de proteínas que em condições normais formam dímeros que reconhecem os erros e conduzem o reparo (Ambrosini et al., 2025). No entanto, mutações ou hipermetilação nos genes MMR comprometem esse reparo, caracterizando assim um fenótipo de MSI deficiente (dMSI) ou ineficaz. Uma alta instabilidade de microssatélites (MSI-H) é intrinsecamente relacionada a síndrome de Lynch. Além de MSI-H, a MSI pode ser classificada em baixa (MSI-L) ou estável (MSS). A presença de MSI em pacientes com CCR está associada a uma maior taxa de sobrevida e a um prognóstico mais favorável quando comparada à instabilidade microssatélite estável (MSS) (Dunne; Arends, 2024).

O fenótipo metilador de ilhas CpG (CIMP, do inglês CpG Island Methylator Phenotype) é um processo epigenético caracterizado por metilações anormais de regiões ricas em citosina-guanina (CpG) próximas de promotores de genes. Esse processo resulta no silenciamento de genes supressores tumorais, como MLH1, MGMT (do inglês, *O-6-methylguanine-DNA methyltransferase*) e CDKN2A (do inglês, *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) (Kim; Bodmer, 2022; Sadien et al., 2024). Tumores positivos para o CIMP estão comumente relacionados à via serrilhada de tumorogênese e podem ser subclassificados em alto ou baixo CIMP, frequentemente associado a mutações em BRAF ou KRAS, respectivamente (He et al., 2025).

Apesar da ampla utilização dos marcadores moleculares isolados, sua tradução clínica nem sempre é consistente (Yamada; Kondo, 2025). Com o avanço do sequenciamento molecular e o maior entendimento dos mecanismos envolvidos no câncer, tornou-se possível adotar uma abordagem mais organizada e padronizada para caracterizar os tumores (Wang et al., 2023; Yang et al., 2024). Nesse contexto, a classificação por subtipos moleculares consensuais (CMS, do inglês *Consensus Molecular Subtypes*) representou uma transição do modelo tradicional centrado em

mutações para uma tipagem baseada no transcriptoma. Esse modelo ganhou relevância na era da medicina de precisão por permitir um entendimento mais refinado da heterogeneidade do CCR, além de auxiliar na definição de prognóstico e escolha terapêutica (Yamada; Kondo, 2025).

Em 2015, um consórcio internacional propôs a classificação molecular consensual do CCR, a partir da análise de dados transcriptômicos de aproximadamente 4.000 pacientes. Foram definidos quatro subtipos principais, CMS1 a CMS4, com características moleculares e clínicas distintas (Guinney et al., 2015; Abedizadeh et al., 2023). O CMS1, conhecido como “imune” ou “MSI-imune”, representa cerca de 14% dos casos e é caracterizado por MSI-H, hipermetilação e forte infiltração de células imunes, apresentando um melhor prognóstico (Shen et al., 2024). O CMS2, chamado “canônico”, é o mais prevalente (cerca de 37% dos casos) e exibe ativação das vias WNT e MYC, além de diferenciação epitelial clássica. Já o CMS3, “metabólico”, corresponde a aproximadamente 13% dos casos e apresenta desregulação de vias metabólicas, mutações em KRAS, além de possível associação com MSI e o CIMP. Por fim, o CMS4, denominado “mesenquimal”, compreende cerca de 23% dos casos, sendo marcado por intensa infiltração estromal, ativação da via TGF-β, transição epitélio-mesenquimal (EMT) e angiogênese, estando frequentemente associado a piores desfechos clínicos e resistência ao tratamento convencional (Guinney et al., 2015; Shen et al., 2024; Yamada; Kondo, 2025).

A tipagem por CMS representa um marco importante na compreensão da complexidade biológica do CCR, sendo considerada uma ferramenta promissora na prática clínica por oferecer um panorama mais integrado do comportamento tumoral. Ela complementa e, em muitos casos, supera a abordagem baseada exclusivamente em alterações genéticas, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais específicas e eficazes (Gharib; Robichaud, 2024; Matsuda; Fujimoto; Igarashi, 2025).

2.3. Diagnóstico e tratamento do CCR

Os avanços na compreensão da biologia tumoral do CCR, incluindo a identificação de vias moleculares distintas e a caracterização dos subtipos moleculares, têm ampliado significativamente o conhecimento sobre a heterogeneidade da doença (Cañellas-Socias; Sancho; Batlle, 2024). Essa evolução

tem repercutido diretamente na prática clínica, especialmente no campo diagnóstico e terapêutico, impulsionando o desenvolvimento de novos fármacos direcionados e estratégias de tratamento mais personalizadas (Salva de Torres et al., 2024).

No entanto, apesar desse progresso, lacunas importantes ainda persistem, particularmente em relação à tradução clínica da complexidade molecular observada (Abedizadeh et al., 2023; Mosele et al., 2024). Um dos principais entraves é a heterogeneidade tumoral, tanto em função dos diferentes pacientes (intertumoral), como as diferentes células num mesmo tumor (intratumoral), o que dificulta a identificação de biomarcadores universalmente válidos e a padronização de abordagens terapêuticas eficazes (Kim; Bodmer, 2022; Sadien et al., 2024; Yang et al., 2024). Assim, o aprofundamento no entendimento dos mecanismos moleculares e o refinamento das ferramentas diagnósticas tornam-se essenciais para o avanço da medicina de precisão no manejo do CCR (Ciardiello et al., 2022; Martín-García; García-Aranda; Redondo, 2024).

A detecção precoce do câncer colorretal é fundamental para melhorar o prognóstico e ampliar as opções terapêuticas (BRASIL, 2024). Nesse contexto, distinguem-se duas principais estratégias: o diagnóstico precoce e o rastreamento (Murphy; Zaki, 2024). O diagnóstico precoce envolve a investigação ativa em indivíduos com sinais e sintomas sugestivos, como alterações no hábito intestinal, dor abdominal persistente, emagrecimento inexplicado, anemia ferropriva e presença de sangue nas fezes. Já o rastreamento tem como foco indivíduos assintomáticos, por meio de exames periódicos capazes de identificar lesões precursoras, como pólipos, ou mesmo tumores em estágio inicial, aumentando as chances de cura e permitindo intervenções menos invasivas (BRASIL, 2024; Liu; Zhang, 2024; Wang, 2024; DISTRITO FEDERAL, 2025).

A confirmação diagnóstica do CCR é realizada por meio do exame anatomo-patológico de amostras tumorais obtidas por colonoscopia, biópsias direcionadas ou durante cirurgias. O sistema TNM de estadiamento é o mais utilizado e o quadro 2 demonstra de forma simplificada essa classificação para o CCR. Elaborado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC), esse sistema utiliza as categorias T (tamanho e extensão do tumor primário), N (acometimento do linfonodo) e M (metástase a distância) para a classificação dos tumores malignos, a partir da peça cirúrgica coletada (Chen et al., 2021; BRASIL, 2024).

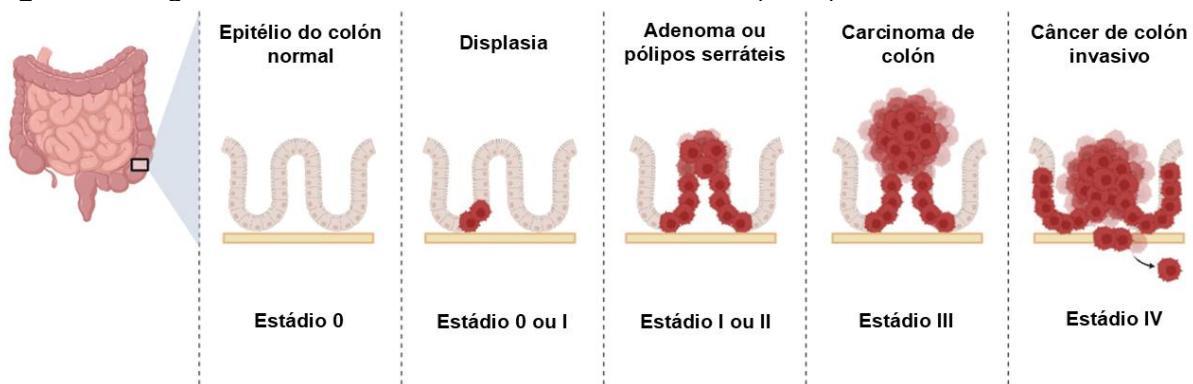
Quadro 2. Sistema TNM de estadiamento para o CCR.

Estadiamento	Tumor Primário (T)	Linfonodos Regionais (N)	Metástases à Distância (M)
Estádio 0	Tis	N0	M0
Estádio I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
Estádio II	T3	N0	M0
	T4	N0	M0
Estádio III	Qualquer T	N1	M0
	Qualquer T	N2	M0
Estádio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: elaborado pelo autor, com base em BRASIL, 2024.

São utilizadas três categorias para a classificação dos tumores malignos: T para o tamanho e extensão do tumor primário, podendo ser de T1-4; N, designando acometimento linfonodal (N0-2); e M para indicar (M1) ou não (M0) metástase a distância. Tis: Carcinoma *in situ*.

O tamanho do tumor primário está diretamente relacionado à profundidade da invasão da parede intestinal (Figura 4). Quando restrito a mucosa, classifica-se como carcinoma *in situ* (Tis). A partir da invasão das camadas mais profundas, o estadiamento progride de T1 a T4, sendo que o T4 representa lesões mais agressivas, associadas à invasão do peritônio visceral e/ou estruturas adjacentes, geralmente compatível com estágios mais avançados da doença (Estadiamento III) (BRASIL, 2024).

Figura 4. Progressão e estadiamento do câncer colorretal (CCR).

Fonte: elaborado pelo autor

Legenda: O sistema de estadiamento varia de 0 a IV de acordo com o comprometimento da lesão, presença de células tumorais nos linfonodos ou em órgãos mais distantes (metástase). Criada com BioRender.com.

Mesmo lesões primárias menores (T1 ou T2) podem apresentar prognóstico desfavorável na presença de comprometimento linfonodal, especialmente quando há invasão de 1 a 3 linfonodos regionais (N1). A presença de metástases à distância (M1), comumente no fígado, pulmões ou peritônio, também indica pior desfecho clínico,

independentemente da extensão tumoral local (Abedizadeh et al., 2023; Cañellas-Socias; Sancho; Batlle, 2024).

Após a confirmação do estadiamento, é essencial a avaliação da doença com tomografias de contraste do tórax, abdome e pelve, especialmente antes da abordagem cirúrgica, para avaliação da presença de metástases (Breekveldt, et al., 2022; Dunne; Arends, 2024). Em situações específicas, exames como a ressonância magnética e a tomografia por emissão de pósitrons/tomografia computadorizada (PET/CT) podem ser indicados, especialmente para avaliação hepática ou detalhamento anatômico em tumores de reto. Além disso, o exame de antígeno carcinoembrionário (CEA) sérico, embora não diagnóstico, pode auxiliar no acompanhamento terapêutico e no prognóstico (Dunne; Arends, 2024; Liu; Zhang, 2024; DISTRITO FEDERAL, 2025).

A análise molecular também tem ganhado relevância no cenário clínico (Fernández-Montes et al., 2024.). A avaliação da MSI ou da eficiência dos sistemas de reparo de DNA é recomendada para todos os casos confirmados de adenocarcinoma colorretal, permitindo não apenas a identificação de síndromes hereditárias como a de Lynch, mas também contribuindo para decisões terapêuticas (Chen et al., 2021; Shen et al., 2024; Yamada; Kondo, 2025).

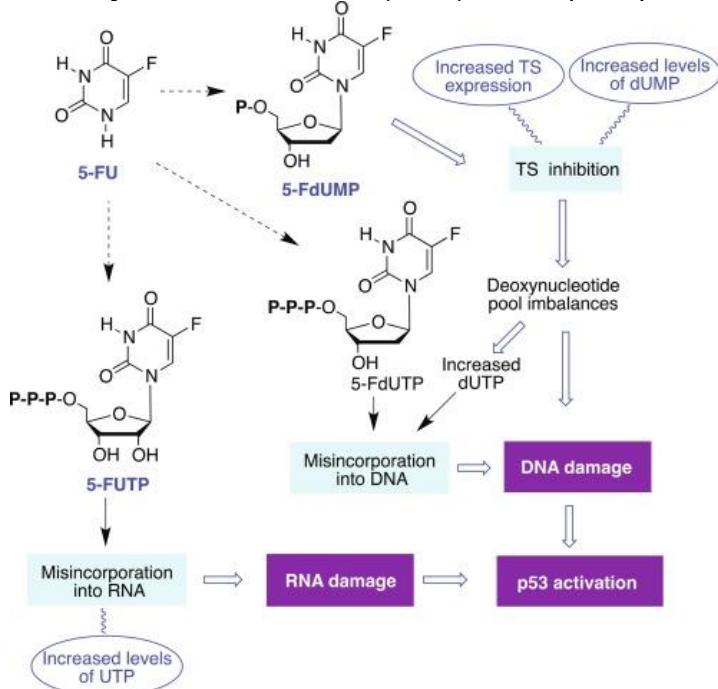
No contexto terapêutico do adenocarcinoma colorretal, a ressecção cirúrgica permanece como a única abordagem com potencial curativo, especialmente nos casos de tumor localizado (BRASIL, 2024). A cirurgia consiste na remoção do tumor primário e dos linfonodos regionais, estando condicionada às características anatomo-patológicas da lesão, incluindo: extensão, margens comprometidas, número e localização de linfonodos acometidos, bem como o envolvimento de órgãos adjacentes (BRASIL, 2014; Chen et al., 2021; BRASIL, 2022).

Em situações específicas, como na presença de metástases hepáticas ou pulmonares ressecáveis, a cirurgia pode ser adotada com intenção curativa. Já nos casos de doença disseminada e irressecável, o procedimento pode assumir caráter paliativo (Ambrosini et al., 2025). Nestes casos, a quimiorradioterapia representa uma importante abordagem complementar, podendo ser administrada de forma neoadjuvante, antes do procedimento para redução da massa tumoral e melhora das taxas de ressecabilidade, ou adjuvante, com o objetivo de eliminar micrometástases residuais e reduzir o risco de recidiva pós cirúrgicas (BRASIL, 2024).

Nos casos em que a cirurgia está contraindicada ou não é possível devido à extensão da doença ou ao estado clínico do paciente, o tratamento pode incluir esquemas combinados de radioterapia ou terapias sistêmicas, como quimioterapia, terapia-alvo e/ou imunoterapia (Smith et al., 2024; Ambrosini et al., 2025). A quimioterapia permanece como uma das principais modalidades terapêuticas no CCR, contribuindo significativamente para o controle da evolução da doença (Mosele et al., 2024). Sua ação baseia-se no uso de agentes citotóxicos capazes de interromper a rápida proliferação das células tumorais, atuando no material genético da célula, em diferentes fases do ciclo celular ou induzindo morte celular (Hussein et al., 2024; Muñoz et al., 2025).

O 5-fluorouracil (5-FU) representa a base dos esquemas terapêuticos utilizados no CCR. Descoberto em 1957, trata-se de um análogo nucleosídico pertencente à classe dos antimetabólitos, mais especificamente aos análogos da pirimidina, capaz de interferir nas vias biossintéticas essenciais para a replicação e reparo do DNA (Hussein et al., 2024) (figura 5).

Figura 5. Mecanismo de ação do 5-fluorouracil (5-FU) e seus principais metabólitos ativos.



Fonte: Avendaño; Menéndez, 2023.

Os principais metabólitos ativos do 5-fluorouracil (5-FU) são 5-fluoro-2'-desoxiuridina monofosfato (5-FdUMP) e 5-fluorouridina trifosfato (5-FUTP). O esquema destaca a inibição da timidilato sintase (TS), o aumento dos níveis de desoxiuridina monofosfato (dUMP) e de uridina trifosfato (UTP), o desequilíbrio no total de desoxinucleotídeos, a incorporação errônea de 5-fluoro-2'-desoxiuridina trifosfato (5-FdUTP) no DNA e de 5-FUTP no RNA, resultando em danos no DNA e no RNA, além da ativação da via da proteína supressora de tumor p53.

Uma vez metabolizado a 5-fluoro-2'-desoxiuridina monofosfato (FdUMP), o fármaco mimetiza a estrutura do seu equivalente fisiológico e exerce ação multidirecional, tanto pela incorporação de seus metabólitos no RNA e no DNA, quanto pela inibição da enzima timidilato sintase (TS). Como a timidina é indispensável para a síntese e reparo do DNA, o bloqueio da TS leva à redução acentuada dos níveis de timidina trifosfato (dTTP) e ao acúmulo significativo de desoxiuridina trifosfato (dUTP). Esse excesso de dUTP favorece sua incorporação equivocada no DNA, substituindo o dTTP, o que provoca interrupção da replicação e desencadeia ciclos de reparo fúteis, resultando em quebras de fita e morte celular programada (Hussein et al., 2024; Shaham; Vij; Tripathi, 2025).

A associação de leucovorina (ácido folínico ou 5-formil-THF) intensifica a ação do 5-FU, sendo essa combinação o primeiro tratamento sistêmico comprovadamente eficaz para o câncer colorretal metastático (mCCR) desde a década de 1980 (Smith et al., 2024; Singh; Kokkanti; Patnaik, 2025). Por ser uma forma reduzida de folato, o 5-formil-THF não necessita da ação da diidrofolato redutase para participar do ciclo do folato, elevando a concentração intracelular de 5,10-metilenotetrahidrofolato, cofator essencial para a ligação do FdUMP à TS. Isso torna o complexo FdUMP–TS–folato mais estável, prolongando a inativação enzimática e ampliando o efeito citotóxico do 5-FU (Avendaño; Menéndez, 2023; Hussein et al., 2024).

Para contornar problemas de alta toxicidade e baixa biodisponibilidade do 5-FU, foi desenvolvida a capecitabina, um pró-fármaco administrado por via oral que se converte seletivamente no tumor em 5-FU ativo. Essa característica aumenta a concentração intratumoral do fármaco, melhora a tolerabilidade e oferece maior conveniência ao paciente ao dispensar infusões intravenosas contínuas (Smith et al., 2024). O 5-FU isolado apresenta taxas de resposta entre 10% e 15%, mas quando associado a outros agentes antineoplásicos, como nos esquemas FOLFOX (5-FU, leucovorina e oxaliplatina) (Wang et al., 2025) e FOLFIRI (5-FU, leucovorina e irinotecano) (Sirittientong et al., 2025), essas taxas podem alcançar 40% a 50% (Paldino et al., 2014; Sethy; Kundu, 2021; Muñoz et al., 2025).

A oxaliplatina é um composto de coordenação à base de platina que penetra nas células por meio do transportador de cobre (Cu^{2+}) de alta afinidade (CTR1), induzindo a degradação desse transportador. No meio intracelular, os ligantes oxalato da molécula são substituídos por moléculas de água, originando um composto carregado positivamente que reage com sítios nucleofílicos presentes no DNA e nas

proteínas (Wang et al., 2025). Diferentemente de outros análogos de platina, a citotoxicidade da oxaliplatina não depende dos sistema de reparo MMR funcional, o que pode explicar sua maior eficácia no tratamento do CCR (Fan et al., 2025; Wang et al., 2025).

As camptotecinas são potentes agentes antineoplásicos citotóxicos, originalmente isolados da árvore *Camptotheca acuminata*, que têm como alvo a enzima nuclear topoisomerase I. Entre seus derivados, apenas o irinotecano e o topotecano estão atualmente aprovados para uso clínico, sendo o primeiro utilizado no CCR (Hussein et al., 2024; Bugano et al., 2024; Siritientong et al., 2025). As topoisomerases (I e II) são enzimas nucleares que aliviam o estresse torcional no DNA superenovelado, permitindo que regiões específicas da molécula se desenrolem o suficiente para possibilitar a replicação, o reparo e a transcrição (Siritientong et al., 2025). Os análogos de camptotecina ligam-se e estabilizam o complexo DNA-topoisomerase I, inibindo o religamento e acumulando quebras de fita simples no DNA. Essas lesões são reversíveis e, isoladamente, não são letais para a célula. Contudo, quando a forquilha de replicação colide com uma dessas fitas clivadas, ocorre uma quebra irreversível de fita dupla no DNA, evento que leva à morte celular (Gach-Janczak et al., 2024; Gharib; Robichaud, 2024).

Essas informações reforçam a importância de estratégias combinadas, capazes de atuar em múltiplas vias biológicas, no manejo do CCR (Gach-Janczak et al., 2024; Shaham; Vij; Tripathi, 2025). Entretanto, essa abordagem não consegue distinguir totalmente entre células malignas e saudáveis, o que leva a lesões também em células normais e, consequentemente, a efeitos adversos (Gach-Janczak et al., 2024; Bugano et al., 2024).

Apesar dos avanços na terapia sistêmica, as recidivas e a recorrência do câncer continuam sendo desafios importantes, reduzindo a eficácia do tratamento ao longo do tempo (Singh; Kokkanti; Patnaik, 2025). Essa limitação está frequentemente associada a uma maior incidência de toxicidades relacionadas ao tratamento, incluindo neurotoxicidade, toxicidade hematológica e hepatotoxicidade. Tais eventos adversos podem exigir mudanças na posologia, como redução^o de dose, levar à interrupção precoce do tratamento e, em última instância, prejudicar a qualidade de vida dos pacientes (Fan et al., 2025).

Além dos efeitos adversos provocados pela quimioterapia, as células tumorais podem desenvolver mecanismos de resistência que comprometem a eficácia do

tratamento. Essa resistência está associada a alterações genômicas dinâmicas, como amplificações e deleções gênicas, modificações epigenéticas (incluindo metilação do DNA e alterações em histonas) e rearranjos estruturais de proteínas que surgem sob a pressão dos agentes quimioterápicos. Tais modificações favorecem a adaptação celular por meio da ativação de vias de sinalização e mecanismos de escape imune (Sun *et al.*, 2022).

Atualmente, o tratamento mais eficaz para o CCR envolve a associação da quimioterapia a terapias-alvo, cuja seleção é guiada pela detecção de marcadores moleculares preditivos. As terapias-alvo consistem em abordagens que utilizam fármacos ou outros agentes capazes de atacar seletivamente as células tumorais, promovendo sua destruição de forma mais precisa e reduzindo os efeitos adversos (Morris *et al.*, 2022; Gharib; Robichaud, 2024).

Essas terapias podem atuar por diferentes mecanismos, entre eles: impedir ou reduzir a formação da rede de vasos sanguíneos que nutre o tumor, inibir ou diminuir a atividade de células cancerígenas, estimular o sistema imunológico a reconhecer e eliminar células tumorais e identificar células específicas e direcionar o fármaco diretamente a elas (Shaham; Viji; Tripathi, 2024).

No contexto do CCR, o bloqueio da neoangiogênese representou a primeira estratégia biológica com efeito aditivo ou sinérgico quando associada à quimioterapia. A angiogênese induzida pelo tumor é um dos marcos da progressão de neoplasias sólidas, incluindo o CCR (Salva de Torres *et al.*, 2024). O sistema de sinalização do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em mamíferos é composto por cinco glicoproteínas da família VEGF (A a E), que se ligam a receptores tirosina-quinase, principalmente em células endoteliais vasculares. Entre eles, o VEGF-A é o principal mediador da angiogênese tumoral, atuando predominantemente por meio do receptor VEGFR-2 (Dominguez; Yilmaz; Steele, 2023). Essa ligação ativa vias de sinalização intracelular, como a PLC- γ /PKC/Ras/Raf/MEK/ERK, fundamentais para o processo angiogênico no CCR (Abedizadeh *et al.*, 2024; Salva de Torres *et al.*, 2024).

No tratamento de primeira linha, anticorpos monoclonais contra o VEGF-A, como o bevacizumabe, e contra o EGFR, como o cetuximabe e o panitumumabe, são frequentemente combinados a esquemas quimioterápicos como FOLFOX e FOLFIRI (Svec; Onhajzer; Korinek, 2024). Na segunda linha terapêutica, destacam-se o afibbercepte, que inibe VEGF; o regorafenibe, inibidor de VEGFR; e o ramucirumabe, anticorpo contra VEGFR-2 (Hussein *et al.*, 2024). Mais recentemente, o fruquitinibe,

um inibidor oral de tirosina-quinase aprovado em 2023 para o tratamento de terceira linha, passou a ser utilizado por bloquear o sinal do VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3 (Dasari et al., 2023; Matsuda; Fujimoto; Igarashi, 2025).

Embora ainda não exista um marcador preditivo definido para o uso de terapias anti-VEGF, já se sabe que mutações nos genes KRAS e NRAS estão associadas à baixa resposta às terapias anti-EGFR (Pinheiro; Moreira; Ghidini, 2024). Em contrapartida, o surgimento de novos protocolos terapêuticos para o CCR com mutação BRAF^{V600E}, presente em aproximadamente 8% dos casos e associada a prognóstico desfavorável. Desde 2020, a combinação do anticorpo anti-EGFR cetuximabe com o inibidor oral de BRAF^{V600E} encorafenibe tornou-se o padrão de tratamento de segunda linha (Tabernero et al., 2021).

O receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), quando ativado, desencadeia uma cascata de sinalização por meio da ativação de Ras, RAF, MEK e ERK, mediada por uma série de eventos de fosforilação. Essa via de sinalização Ras–Raf–ERK é fundamental para o controle do crescimento celular, da diferenciação e da sobrevivência (Shaham; Vij; Tripathi, 2025). Esse mecanismo é particularmente relevante em certos tipos de câncer, incluindo o mCCR, nos quais o EGFR desempenha papel crucial na proliferação e sobrevivência tumoral. O uso de cetuximabe pode potencializar a eficácia terapêutica, especialmente em pacientes com tumores do tipo RAS *wild-type*, proporcionando uma abordagem direcionada quando combinado a outros tratamentos (Abedizadeh et al., 2024). O encorafenibe, por sua vez, reforça o efeito inibitório do cetuximabe ao bloquear a isoforma mutada da proteína BRAF. Resultados ainda mais promissores têm sido observados quando essa combinação é associada a um inibidor de MEK, como o binimetinibe (Tabernero et al., 2021; Svec; Onhajzer; Korinek, 2024).

A pesquisa por alterações nos genes Ras e BRAF, assim como a avaliação do MSI, representa atualmente o padrão-ouro para a caracterização molecular do mCCR, etapa essencial para a seleção das terapias mais adequadas (Ciardiello et al., 2022). Entre os biomarcadores mais promissores no CCR está o perfil de reparo de DNA. Tumores com deficiência no sistema MMR/MSI-alto apresentam maior carga mutacional e respondem melhor a inibidores de checkpoints imunológicos PD-1/PD-L1 (Sahin et al., 2023; Hamid et al., 2024). Assim, a testagem do status MMR/MSI é fundamental para identificar pacientes com CCR e com maior probabilidade de se beneficiarem de imunoterapias (Smith et al., 2024).

A imunoterapia representa um avanço no tratamento oncológico, ao utilizar o próprio sistema imune para combater o tumor de forma mais eficaz. Essa estratégia atua sobre os mecanismos moleculares dos chamados pontos de verificação (*checkpoints*) imunológicos, responsáveis por manter a tolerância imunológica em condições normais e modular a resposta contra patógenos, um fator-chave para o sucesso dessa abordagem (Sahin et al., 2023; Abedizadeh et al., 2024; Gharib; Robichaud, 2024).

Entre esses mecanismos, destaca-se a interação entre o receptor PD-1 (*programmed death receptor 1*), expresso nos linfócitos T, e seu ligante PD-L1, produzido por células tumorais. Essa ligação suprime a atividade das células T, favorecendo a evasão tumoral (Hamid et al., 2024; Ambrosini et al., 2025). No CCR, os anticorpos monoclonais e inibidores de PD-1, bevacizumabe, cetuximabe e nivolumabe, demonstraram respostas clínicas significativas em pacientes com tumores avançados portadores de MMR deficiente ou MSI-alto (Hamid et al., 2024; Pinheiro; Moreira; Ghidini, 2024; Ambrosini et al., 2025). Esse perfil tumoral no CCR, por apresentar maior instabilidade genômica, torna-se mais suscetível ao bloqueio de *checkpoints*, revertendo a imunossupressão e potencializando a resposta antitumoral (Ciardiello et al., 2022; Abedizadeh et al., 2024).

Apesar dos avanços no diagnóstico e estadiamento, o tratamento sistêmico do CCR ainda depende, em grande parte, da quimioterapia convencional. Embora eficaz, muitas vezes apresenta alta toxicidade e baixa seletividade para células tumorais, limitando seu uso prolongado e impactando a qualidade de vida dos pacientes. Nesse cenário, cresce a necessidade de desenvolver novas moléculas citotóxicas com maior seletividade tumoral, capazes de modularem vias de sinalização específicas e com menos efeitos adversos e dentre elas, destacam-se as drogas metálicas como uma classe promissora.

2.4. Morte celular programada ou apoptose

A apoptose, também chamada de morte celular programada do tipo I, é um mecanismo biológico fundamental para a manutenção da homeostase tecidual, pois promove a eliminação de células desnecessárias ou potencialmente perigosas, regulando o crescimento e evitando a proliferação descontrolada (D'Arcy, 2019). Esse processo ocorre de forma fisiológica durante o desenvolvimento embrionário, no

envelhecimento e como defesa frente a células danificadas por infecções, agressões químicas, radiação ou mutações genéticas (Yan; Elbadawi; Efferth, 2020).

Em tecidos saudáveis, o equilíbrio entre proliferação e apoptose é rigidamente controlado. No entanto, no câncer, incluindo o CCR, esse equilíbrio é frequentemente rompido, favorecendo a sobrevivência de células geneticamente alteradas e resistentes a sinais de morte celular (Yu et al., 2019). Lesões pré-cancerosas no cólon e reto, por exemplo, costumam apresentar alterações no DNA que deveriam induzir apoptose, mas que, quando não ativada adequadamente, permitem a progressão para tumores invasivos (Morana; Wood; Gregory, 2022).

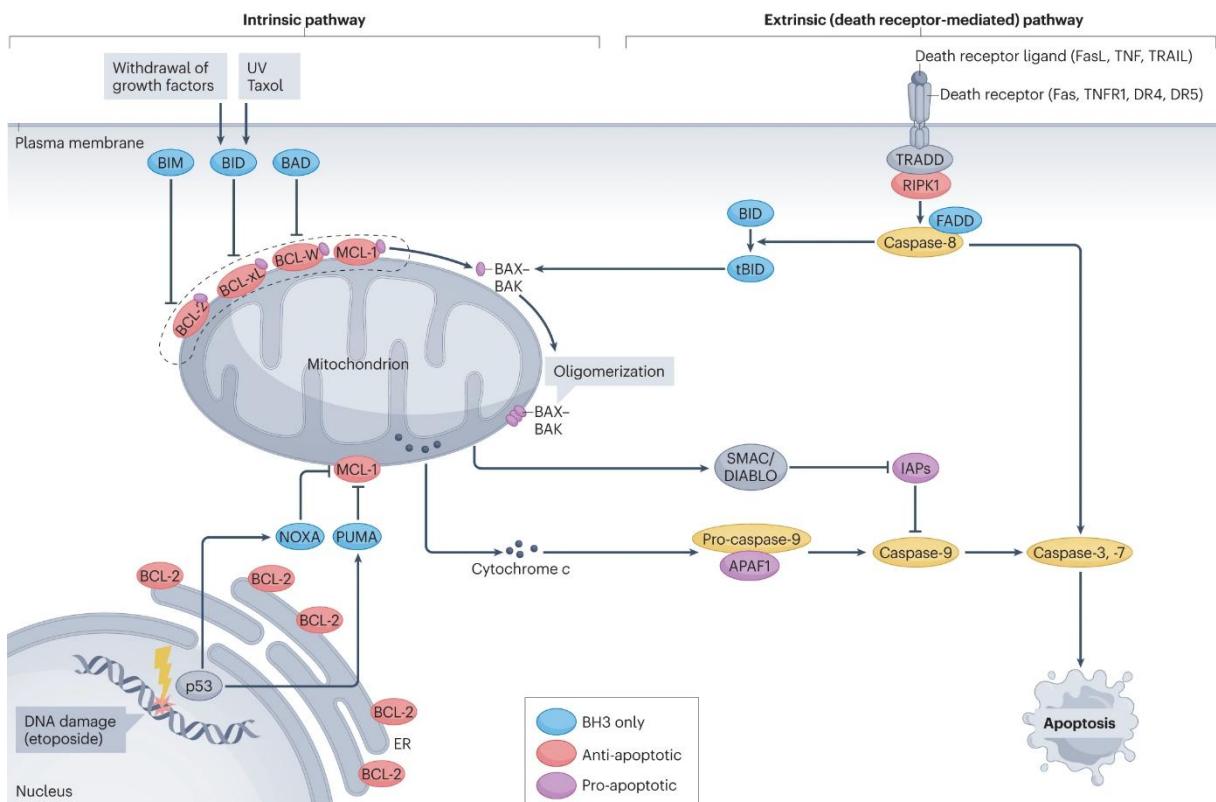
A apoptose apresenta características morfológicas e bioquímicas distintas. Inicialmente, há condensação da cromatina, fragmentação do DNA e exposição de fosfatidilserina na membrana plasmática. Nos estágios finais, formam-se corpos apoptóticos resultantes da desintegração nuclear e citoplasmática, acompanhados pela perda da integridade da membrana (Bock; Tait, 2020). Essas alterações são controladas principalmente por caspases, proteases especializadas que atuam em cascata. Caspases iniciadoras (como 2, 8, 9 e 10) ativam caspases executoras (3, 6 e 7), responsáveis por degradar componentes estruturais e nucleares, sinalizar para fagócitos e finalizar o processo de morte celular (Yuan; Ofengeim, 2024) (Figura 6).

A apoptose e os genes que a controlam têm uma influência significativa nos processos de carcinogênese. Dessa forma, a apoptose é a principal forma de morte produzida por agentes antitumorais, os quais induzem esse processo por diferentes vias (Morana, Wood e Gregory, 2022). A ativação da apoptose pode ocorrer por duas vias principais: via extrínseca e a intrínseca ou mitocondrial. A via extrínseca é iniciada por sinais extracelulares, como ligantes de receptores de morte (FasL/FasR, TNF/TNFR, TRAIL/TRAILR), frequentemente produzidos por linfócitos T citotóxicos para eliminar células anormais. Esses ligantes recrutam proteínas adaptadoras, como FADD, formando o complexo DISC e ativando caspases iniciadoras (8 ou 10), que por sua vez ativam as executoras (Voss; Strasser, 2020). No CCR, alterações nessas vias podem tornar células tumorais resistentes à ação do sistema imune (Yuan; Ofengeim, 2024).

A família de proteínas BCL-2 protege as células da morte celular programada por, pelo menos, dois mecanismos principais. Primeiramente, essas proteínas inibem a formação de poros na membrana mitocondrial externa, processo mediado por BAX e BAK. Esses poros atuam como canais para íons e proteínas, de maneira semelhante

aos domínios de inserção de membrana presentes em toxinas como a diftérica e as colicinas. As proteínas antiapoptóticas BCL-2 e BCL-XL, localizadas na face citoplasmática da membrana mitocondrial externa, interferem na formação desses poros, impedindo a liberação do citocromo c, o que bloqueia a montagem do

Figura 6. Vias intrínseca e extrínseca da apoptose.



Fonte: Yuan; Ofengeim, 2024.

Legenda: a apoptose extrínseca (à direita) é mediada pela ativação de receptores de morte localizados na membrana plasmática (como os receptores TNFR1, Fas e TRAIL DR4 e DR5) por seus ligantes cognatos (como TNF, FasL e TRAIL, respectivamente). A apoptose intrínseca (à esquerda) pode ser ativada pela retirada do fator de crescimento, dano mitocondrial, dano ao DNA e medicamentos quimioterápicos como o taxol. A ativação de membros da família BCL-2 exclusivamente BH3, como a indução transcrecional de NOXA e PUMA por p53, a modificação pós-traducional de BAD e BIM e a clivagem de BID pela caspase-8, induz dano mitocondrial ao inativar membros da família BCL-2 pró-sobrevivência, como BCL-2, BCL-XL e MCL-1, e ativar a oligomerização de membros da família BCL-2 pró-morte, BAX e BAK. O dano mitocondrial leva à liberação de citocromo c e do segundo ativador de caspase derivado de mitocôndrias (SMAC; também conhecido como DIABLO) para promover a ativação da caspase-9 mediada por APAF1. A caspase-9 ativada, por sua vez, cliva as caspases a jusante, caspase-3 e caspase-7, para mediar a execução da apoptose intrínseca. As caspases-3 e 7 ativadas também podem exercer ativação por retroalimentação das caspases a montante, permitindo a amplificação das cascadas de caspases. RE, retículo endoplasmático; UV, ultravioleta.

apoptossomo e, consequentemente, a ativação da via intrínseca da apoptose (Lopez *et al.*, 2022).

A via mitocondrial é desencadeada por danos internos, como mutações irreparáveis, hipóxia, estresse oxidativo ou ação de quimioterápicos. Esses estímulos ativam proteínas pró-apoptóticas (Bax e Bak), que comprometem a membrana mitocondrial externa e liberam fatores apoptogênicos, como o citocromo c. Este se associa ao Apaf-1, formando o apoptossomo, que ativa a caspase 9 e, em seguida, as executoras 3, 6 e 7 (Elmore, 2007; Giacomello *et al.*, 2020).

No contexto do CCR, a resistência à apoptose é uma das principais barreiras para o sucesso terapêutico, já que muitas células tumorais desenvolvem mutações em genes reguladores desse processo, como p53 ou membros da família Bcl-2. Isso reduz a eficácia de tratamentos que dependem de vias apoptóticas, como diversos quimioterápicos e terapias-alvo. Por outro lado, justamente por ser um mecanismo central na morte de células tumorais, a apoptose é um alvo recorrente no desenvolvimento de novas drogas, incluindo fármacos capazes de reativar sinais apoptóticos em tumores refratários (Morana; Wood; Gregory, 2022).

2.5. Estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio (ROS)

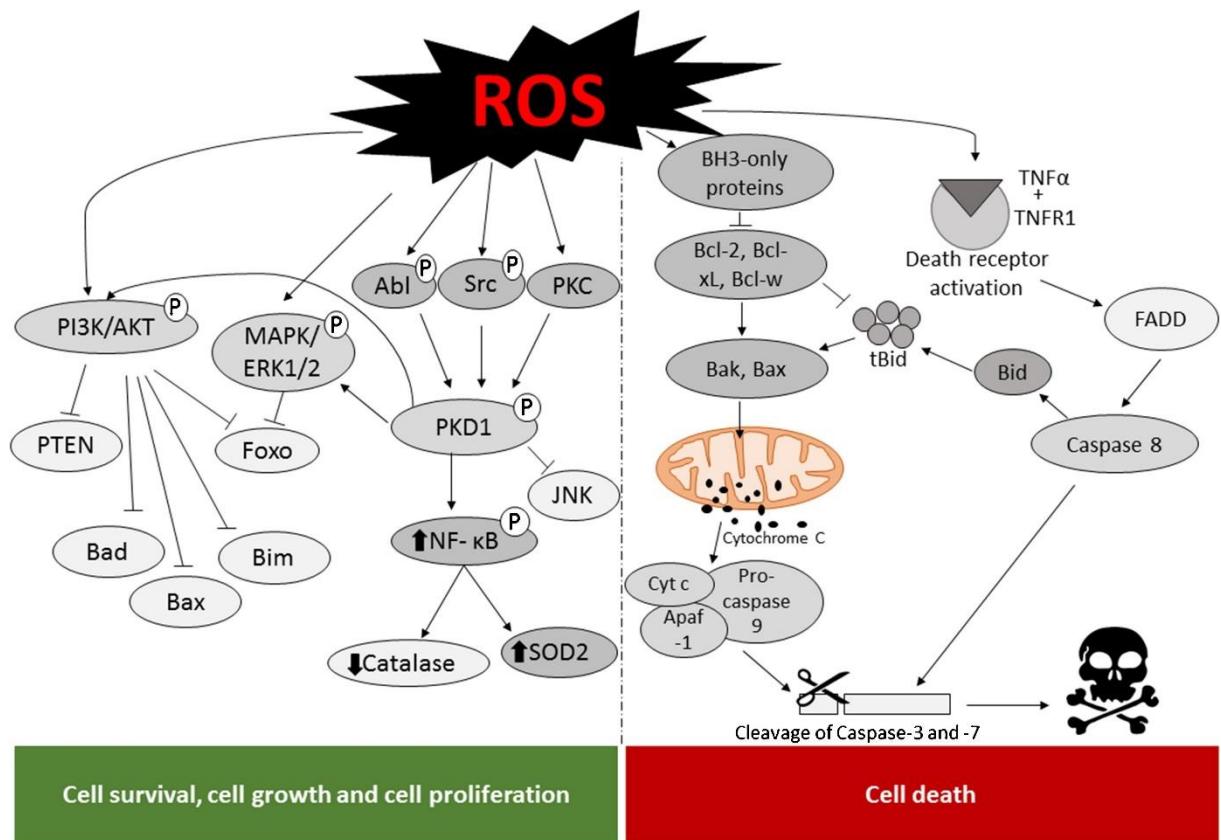
O estresse oxidativo é definido como um estado de desequilíbrio entre a produção e a remoção de espécies reativas de oxigênio (ROS ou EROs) e de nitrogênio (RNS ou ERNs), resultando em danos moleculares e disfunções celulares (Kruk *et al.*, 2019; Sies, 2020). Essas moléculas apresentam alta reatividade química devido à presença de elétrons desemparelhados, o que lhes confere capacidade de oxidar lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, alterando a homeostase redox. Como consequência, podem desencadear ou agravar diversas doenças², incluindo doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e câncer (Liguori *et al.*, 2018).

As EROs englobam radicais derivados do oxigênio, como ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila ($\bullet OH$), radical peroxila (RO_2^{\bullet}), além de moléculas não radicalares como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl), ozônio (O_3) e oxigênio singuleto ($'O_2$). Já as RNS incluem espécies como o óxido nítrico (NO^{\bullet}) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) (Liu *et al.*, 2020).

Essas espécies reativas são produzidas predominantemente como subprodutos do metabolismo oxidativo em organelas como mitocôndrias,

peroxissomos e retículo endoplasmático. Em condições fisiológicas, desempenham funções sinalizadoras essenciais, participando da modulação de vias de transdução de sinais. No entanto, quando em excesso, interagem de maneira deletéria com componentes celulares, levando a peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e danos ao DNA (Perillo et al., 2020) (Figura 7). Além da produção endógena, fatores externos como radiação ultravioleta (UV), metais pesados, solventes orgânicos e poluentes ambientais também contribuem para o aumento intracelular dessas espécies (Bodega et al., 2019).

Figura 7. Sinalização celular induzida por ROS no câncer



Fonte: Moloney; Cotter, 2018.

Legenda: A produção aumentada de EROS no câncer pode atuar tanto na sinalização pró-tumoral quanto antitumoral. Níveis moderados de EROS presentes em células tumorais ativam vias como PI3K/AKT, MAPK/ERK1/2 e PKD, promovendo a sobrevivência e proliferação celular, enquanto inibem proteínas pró-apoptóticas como Bad, Bax, Bim, Foxo e PTEN. Por outro lado, níveis tóxicos de EROS induzem apoptose por via mitocondrial (intrínseca), com liberação de citocromo c e ativação de caspases, ou por via extrínseca, via receptores de morte como o TNFR1, com ativação das caspases 8 e 3 e clivagem da proteína Bid.

A manutenção da homeostase redox depende de um sistema antioxidante complexo, dividido em componentes enzimáticos e não enzimáticos. Entre as enzimas antioxidantes destacam-se a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa

peroxidase (GPx), peroxirredoxinas e tioredoxinas, que catalisam reações de neutralização das espécies reativas. No grupo não enzimático, incluem-se antioxidantes endógenos, como glutationa, bilirrubina, melatonina e ácido úrico, bem como moléculas obtidas pela dieta, como vitaminas A, C e E, selênio e β-caroteno (Klieser et al., 2019; Liu et al., 2020).

No contexto do câncer, as EROs apresentam um papel dual, funcionando tanto como mediadores da sobrevivência e proliferação celular quanto como indutores de morte celular, dependendo de sua concentração e do microambiente tumoral (Moloney; Cotter, 2018). Em níveis moderadamente elevados, as EROs favorecem a progressão tumoral ao ativar vias de sinalização como PI3K/Akt, MAPK e PKD, promovendo proliferação, evasão de apoptose e resistência a terapias. Alterações genéticas em oncogenes e genes supressores de tumor, como mutações no p53, também podem potencializar esses efeitos pró-tumorais (Reczek; Chadel, 2018; Moloney; Cotter, 2018).

Durante a progressão da carcinogênese, níveis elevados de EROs estimulam a sinalização do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), favorecendo angiogênese, invasão e metástase (Fiocchetti et al., 2019). Por outro lado, quando a produção de EROs atinge níveis excessivos, ocorre dano oxidativo irreversível, resultando em parada do ciclo celular e indução de apoptose. Esse efeito citotóxico pode ser mediado pela ativação de vias como JNK, que estimulam tanto a apoptose pela via intrínseca quanto a via extrínseca (Liu et al., 2020).

Diversos agentes antitumorais exploram essa vulnerabilidade, promovendo acúmulo de EROs para induzir apoptose. A doxorrubicina, por exemplo, interage com o DNA e promove a geração de radicais livres, enquanto a cisplatina induz danos oxidativos e apoptose (Davalli et al., 2018; Yu et al., 2020). De forma semelhante, a radioterapia aumenta a produção de EROs nas células tumorais, contribuindo para seu efeito citotóxico (Chatterjee; Chatterjee, 2020).

Assim, o direcionamento terapêutico baseado na modulação do estresse oxidativo representa uma estratégia promissora no tratamento do câncer. A indução seletiva de níveis tóxicos de EROs em células tumorais, associada à preservação da homeostase redox em células normais, desponha como um objetivo central no desenvolvimento de novas abordagens e fármacos antineoplásicos.

2.6. Proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs)

Todos os organismos vivos possuem a capacidade de responder a estímulos externos. A célula, considerada a menor unidade de resposta a estímulos, traduz os sinais recebidos do meio extracelular (Ma; Nicolet, 2023), como fatores de crescimento, citocinas e hormônios (Park; Baek, 2022), em cascatas de sinalização intracelulares permitindo, desta forma, a obtenção de uma resposta celular (Ma; Nicolet, 2023).

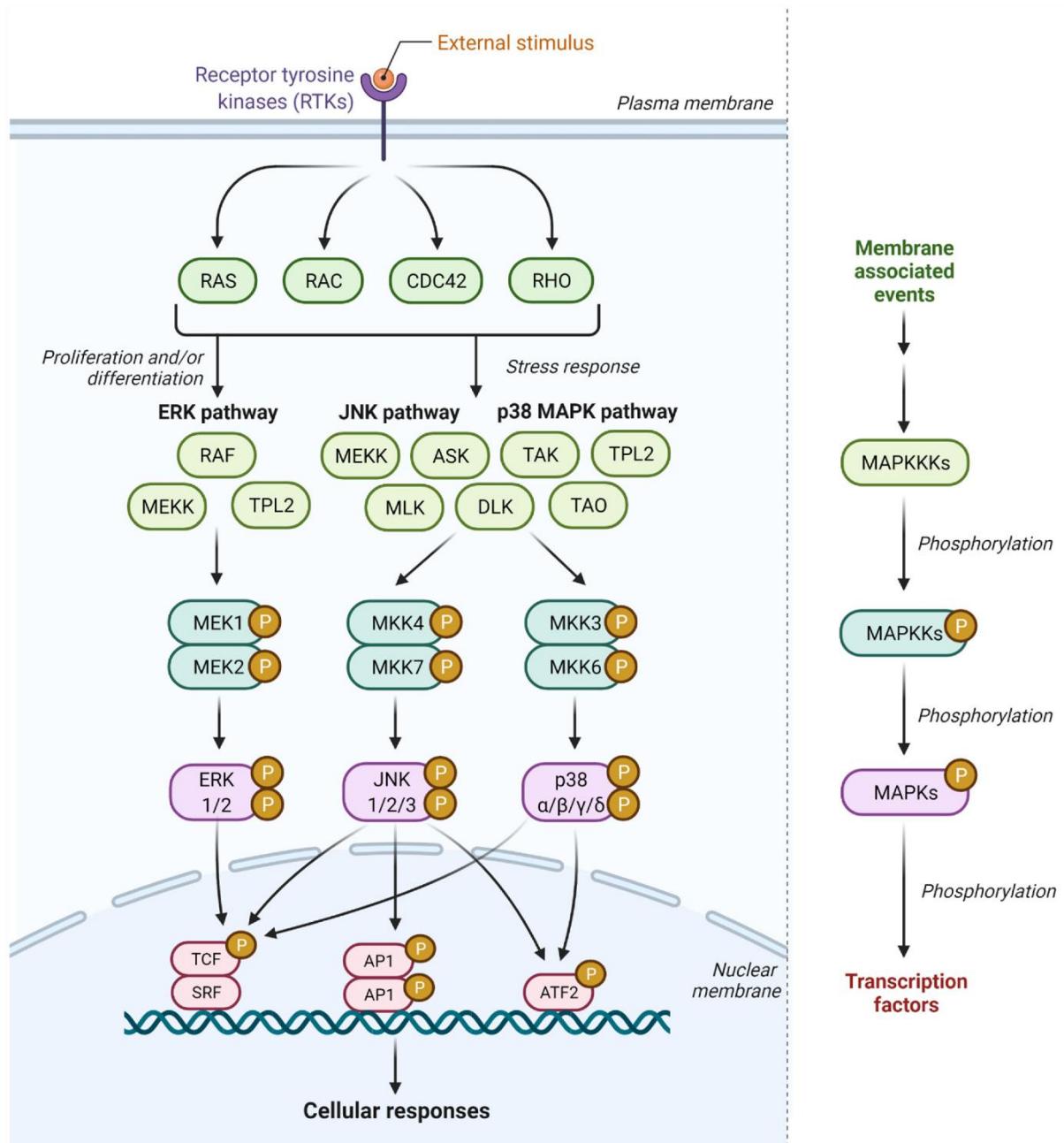
As cascatas das MAPKs estão conectadas a praticamente todos os estímulos extracelulares, as quais, apesar de serem mecanisticamente semelhantes, modulam uma variedade de atividades *downstream* distintas (Maik-Rachline; Wortzel; Seger, 2021).

As MAPKs são famílias de serina/treonina cinases ativadas por diversos sinais extracelulares, como fatores de crescimento, citocinas e estresse oxidativo (Kciuk *et al.*, 2022), destacando-se as famílias das Proteínas Cinases Reguladas por Sinais Extracelulares 1 e 2 (ERK1/2), das Cinases c-Jun N-terminal 1, 2 e 3 (JNK1, JNK2 e JNK3, respectivamente) e das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógeno p38 α, β, γ e δ (p38α MAPK, p38β MAPK, p38γ MAPK e p38δ MAPK, respectivamente) (Wu; Becker; Park, 2020).

De forma geral, a ativação das vias de sinalização das MAPKs pode ocorrer pela ativação de receptores tirosina cinase (RTKs) por sinais extracelulares, culminando na ativação de pequenas proteínas de ligação ao GTP, a exemplo das proteínas Ras e Rac. A partir de então uma série de proteínas cinases é ativada. As MAPK cinase cinases (MAPKKKs) fosforilam e ativam as MAPK cinases (MAPKKs) que, por sua vez, fosforilam e ativam as MAPKs. Por fim, as MAPKs ativadas podem fosforilar seus alvos, tais como a Proteína Cinase Ativada por ERK (RSK), o fator de transcrição c-JUN e o fator de transcrição ativador-2 (ATF2) (Figura 8) (García-Hernández *et al.*, 2022).

A sinalização das MAPKs regula diversos processos celulares, como proliferação, migração, diferenciação e apoptose (Yue; López, 2020). No câncer, as MAPKs exercem importantes papéis na carcinogênese, principalmente em cânceres como o de pulmão, o colorretal e o melanoma (Ostrowski; Fisher, 2021). Contudo, tem sido observado que, a depender do contexto mutacional e celular, também pode ocorrer uma sinalização supressora tumoral (Braicu *et al.*, 2019).

Figura 8. Cascatas de sinalização das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs)



Fonte: Pua et al., 2022.

Legenda: Após estimulação externa, as tirosina quinases receptoras (RTKs) ativam o módulo quinase de três camadas, composto por MAPKK, MAPKK e MAPK, por meio da fosforilação sequencial de proteínas. As MAPKs ativadas são translocadas para o núcleo e desencadeiam respostas celulares.

2.6.1. Via de sinalização intracelular das Proteínas Cinases Reguladas por Sinais Extracelulares (ERK) e o câncer

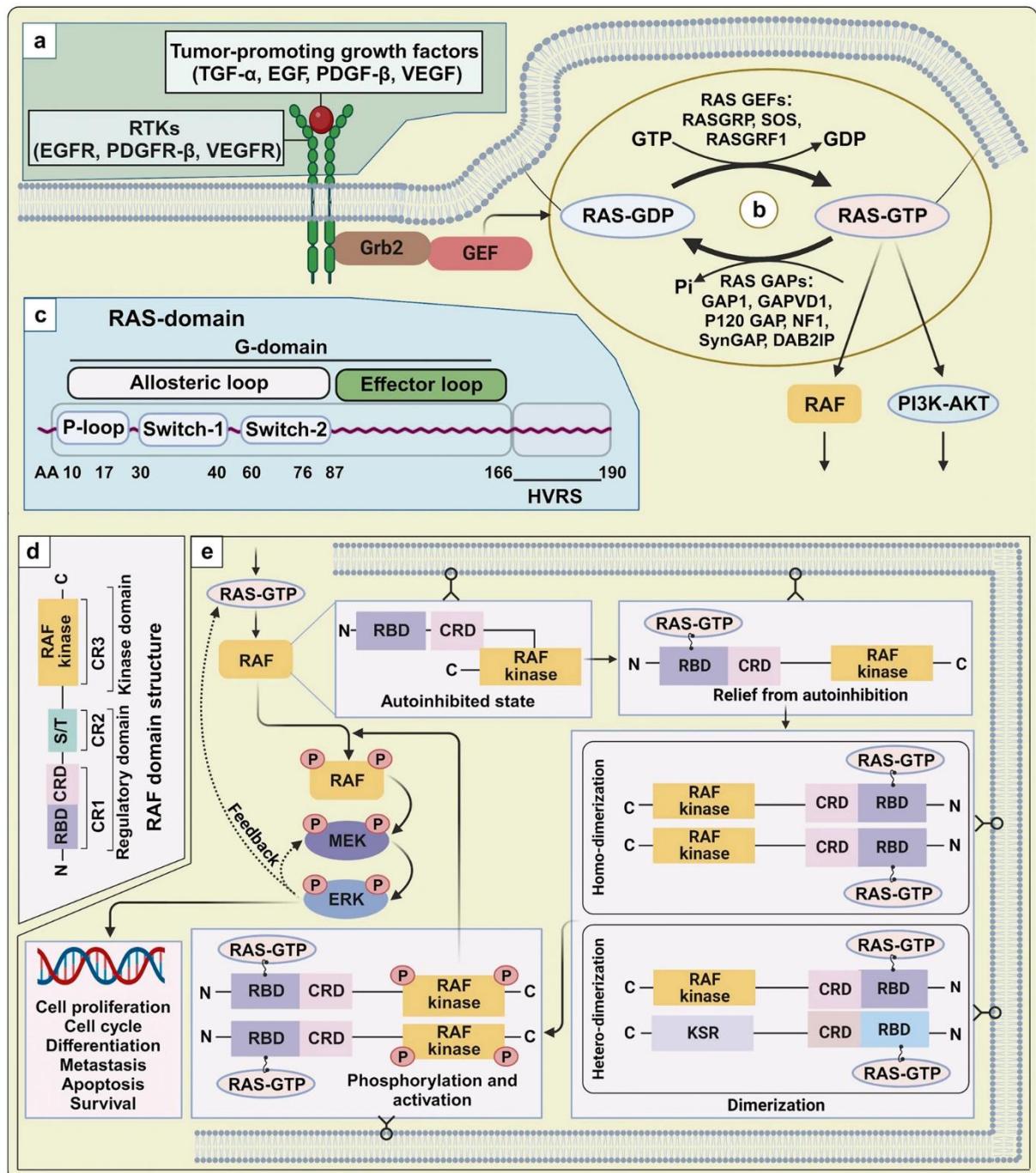
Ao interagir com ligantes extracelulares, a exemplo do fator de crescimento epidérmico (EGF) (Sabbah; Hajjo; Sweidan, 2020), RTKs ativam-se após dimerização

e transfosforilação de seus resíduos de tirosina em seus domínios intracelulares (Cordover *et al.*, 2020). Esta ativação induz o recrutamento de proteínas adaptadoras, principalmente a Proteína Ligada ao Receptor do Fator de Crescimento 2 (Grb2). A interação da Grb2 com os RTKs recruta fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs), em especial a proteína *son of sevenless* (SOS) (Seiler *et al.*, 2022). A SOS favorece a troca do difosfato de guanosina (GDP) pelo trifosfato de guanosina (GTP) em Ras (Baltanás *et al.*, 2020; Park; Baek, 2022), cujas isoformas incluem a K-Ras, a N-Ras e a H-Ras (Nussinov *et al.*, 2021). Ao ligar-se ao GTP, Ras torna-se ativa (Ras-GTP) e estimula a formação de homodímeros ou heterodímeros de proteínas Raf (A-Raf, B-Raf e C-Raf) (Júnior, 2019; Seiler *et al.*, 2022). As proteínas Raf fosforilam as Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos 1 e 2 (MEK1/2), ativando-as (Zhang *et al.*, 2022). As MEK1/2 ativas fosforilam a sequência de resíduos treonina-glutamato-tirosina no segmento de ativação das proteínas ERK1/2, ativando-as. Posteriormente, as proteínas ERK1/2 ativas fosforilam seus alvos citoplasmáticos, como a proteína cortactina e a Proteína Cinase da Cadeia Leve de Miosina (MLCK), e nucleares, a exemplo dos fatores de transcrição c-Myc, c-Fos e c-Jun (Ullah *et al.*, 2022) (Figura 9). A regulação desta via mantém a homeostase celular (Sugiura; Satoh; Takasaki, 2021) e envolve as proteínas fosfatases de dupla especificidade 5 e 6 (DUSP5 e DUSP6) que catalisam a desfosforilação e inativação das ERK1/2 (Júnior, 2019).

Fisiologicamente, a sinalização ERK1/2 está envolvida em diversos processos celulares controlados, incluindo proliferação, sobrevivência, crescimento, metabolismo, migração e diferenciação celulares (Lavoie; Gagnon; Therrien, 2020). Contudo, a desregulação desta cascata de sinalização está envolvida com diversas doenças, como esclerose lateral amiotrófica (Sahana; Zhang, 2021), Alzheimer (Khezri *et al.*, 2023), autismo (Erickson *et al.*, 2023) e câncer (Gong *et al.*, 2023).

Nas células tumorais, é bem relatado o papel dessa via na tumorigênese, proliferação, diferenciação, angiogênese e metástase (Guo *et al.*, 2020). No CCR, por exemplo, a via de sinalização ERK1/2 mostra-se fundamental para o desenvolvimento e progressão deste tumor (Savoia *et al.*, 2019) com aproximadamente 15% dos cânceres colorretal apresentando mutação do oncogene *BRAF*, o que leva a ativação constitutiva dessa via (Buchbinder; Giobbie-Hurder; Ott, 2023).

Figura 9. Estrutura e mecanismo de ativação das cinases RAS e RAF na cascata de sinalização RAS/RAF/MAPK.



Fonte: Bahar; Kim; Kim, 2023.

- a.** Componentes a montante de RAS. Diversos mitógenos, incluindo TGF- α , EGF, VEGF e PDGF- β , ligam-se aos seus respectivos receptores e levam à ativação de RAS e à subsequente estimulação da via MAPK.
b. Ciclo da GTPase. As GEFs estimulam a transição de RAS inativo ligado a GDP (RAS-GDP) para RAS ativo ligado a GTP (RAS-GTP), permitindo a transmissão de sinais de proliferação e diferenciação por meio de seus efetores a jusante. Subsequentemente, o RAS ativo pode ser rapidamente desativado pela ação das GAPs.
c. Domínio de RAS.
d. Estrutura do domínio de RAF.
e. Dimerização de RAF. A dimerização desencadeia a fosforilação mútua dos componentes do dímero, ativando totalmente a cinases. A fosforilação e ativação de proteínas-alvo, como MEK1 e MEK2, propagam a cascata MAPK, culminando na ativação de ERK1/ERK2.

No contexto da sobrevivência das células tumorais, a sinalização ERK1/2 modula negativamente a apoptose, por regular as atividades e os níveis de proteínas

da família Bcl-2, como a proteína pró-apoptótica BIM e a proteína anti-apoptótica MCL-1, além de inibir a apoptose induzida pelo receptor de morte Fas ou pelos receptores dos fatores de necrose tumoral (Sugiura; Satoh; Takasaki, 2021).

O conhecimento do envolvimento e importância da via de sinalização Ras-Raf-MEK-ERK no câncer tem permitido o desenvolvimento de terapias direcionadas aos componentes desta via, como os anticorpos monoclonais vemurafenibe e dabrafenibe, que têm como alvo a proteína Raf, e encorafenibe, cobimetinibe, trametinibe e binimetinibe que são anticorpos anti-MEK1/2, utilizados para o tratamento do mCCR (Florent *et al.*, 2023).

Apesar de serem observados efeitos pró-tumorais mediados pela sinalização ERK1/2, tem-se relatado o envolvimento destas MAPKs na indução da morte das células tumorais, o que é dependente do tipo celular e do estímulo. Este efeito antitumoral está associado à ativação apoptose pela via intrínseca, mediada pela liberação do citocromo c e ativação da caspase-9, ou extrínseca dependente da ativação da caspase-8. Atualmente, diversos estímulos têm sido relacionados a esse efeito indutor de morte das células tumorais mediado pela ativação de ERK1/2, e estes incluem as ROS e alguns agentes antineoplásicos, como cisplatina, doxorrubicina, etoposídeo, carboplatina e paclitaxel (Sugiura; Satoh; Takasaki, 2021). Desta forma, diante do papel dual da via de sinalização ERK1/2 no câncer, o desenvolvimento de terapias que modulem esta via mostra-se útil para o tratamento dessa doença.

2.6.2. Via de sinalização intracelular das Proteínas Cinases c-Jun N-terminal (JNK) e o câncer

A JNK, também conhecida como Proteína Cinase Ativada por Estresse (SAPK) (Lee *et al.*, 2022), é expressa sob três isoformas codificadas por genes altamente relacionados: JNK1 (*JNK1*) e JNK2 (*JNK2*) expressas de forma ubíqua, e JNK3 (*JNK3*) restrita ao cérebro, coração e testículo (Nakano; Nakayama; Sugiya, 2020; Latham; O'donnell; Croucher, 2022). A via JNK é modulada principalmente por estresse ambiental ou genotóxico (Martínez-Limón *et al.*, 2020), como pela ação de citocinas pró-inflamatórias e consequente ativação de RTKs, radiação ultravioleta ou estresse osmótico (Ha *et al.*, 2019). Estes fatores externos induzem a ativação de MAPKKKs, como as Cinases Ativadoras da MAP Cinase 1-4 (MEKK1-4) e as Cinases Reguladoras de Apoptose 1 e 2 (ASK1/2). As MAPKKKs ativam as MAPKs como as

Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos 4 e 7 (MKK4 e MKK7) que, por sua vez, ativam as JNKs por fosforilação dos seus resíduos de treonina e tirosina na sequência treonina-prolina-tirosina (Park; Baek, 2022). As JNKs ativas regulam diversos fatores de transcrição como c-Jun e c-Fos (Ahn *et al.*, 2023) (Figura 10) e vários membros da família BCL-2, pró e anti-apoptóticos, em nível transcracional e/ou pós-transcracional (Yue; López, 2020). A regulação negativa dessa via dá-se pela ação das fosfatases DUSP, como DUSP1, DUSP2 e DUSP3 (Ha *et al.*, 2019).

A sinalização JNK está envolvida na regulação de diversos processos fisiológicos, como progressão do ciclo celular, sobrevivência celular e apoptose (Ha *et al.*, 2019), e patológicos, como o desenvolvimento de doenças como fibrose pulmonar idiopática (Popmihajlov *et al.*, 2022), Huntington, Parkinson (Corrales; Losada-Pérez; Casas-Tintó, 2021) e câncer (Hammouda *et al.*, 2020).

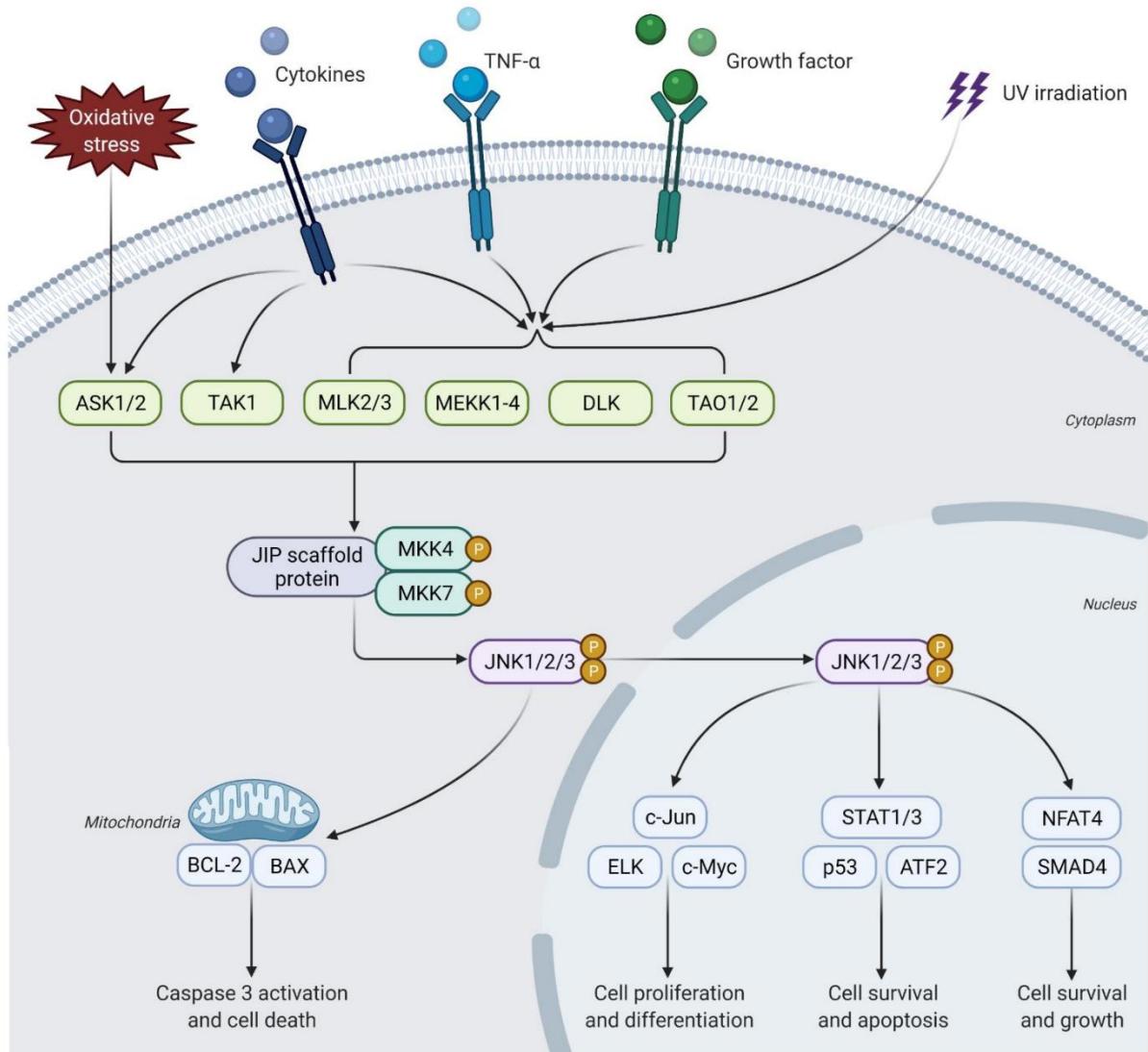
No câncer, a sinalização JNK está envolvida no desenvolvimento e progressão tumoral (Wu *et al.*, 2020), modulando a proliferação celular, a metástase, a autofagia, o metabolismo celular e o escape ao sistema imune, além de resistência à quimioterapia (Lee *et al.*, 2022).

Foi relatado que a ativação de JNK encontra-se significativamente elevada em tecidos de câncer de bexiga humano e murino, e que está envolvida na fuga imune de células das linhagens de câncer de bexiga 5637 e J82 (Ni *et al.*, 2022). No câncer de próstata, evidencia-se, em estudo com células das linhagens de câncer prostático DU145 e LNCaP, que a ativação da JNK se encontra envolvida com progressão e metástase (Sung *et al.*, 2018).

Outros estudos *in vitro* mostraram o envolvimento da ativação da JNK com a sobrevivência de células da linhagem de adenocarcinoma pulmonar A549 (Jiang *et al.*, 2022) e a viabilidade de células da linhagem de câncer de pulmão com mutação em K-Ras H2122 (Hoang *et al.*, 2020). Ainda, foi relatado que o tratamento de células da linhagem de câncer de mama MCF-7 resistentes a paclitaxel (PTX-res MCF-7) com o inibidor seletivo de JNK, JNK-IN-8, supriu o perfil mesenquimal destas células, reforçando o envolvimento da via JNK na metástase (Kilbas *et al.*, 2020).

Diversos fatores extracelulares ativam a via de sinalização das proteínas cinases c-Jun N-terminal (JNKs) como estresse oxidativo, radiação ultravioleta (UV),

Figura 10. Cascata de sinalização das proteínas cinases c-Jun N-terminal (JNKs)



Fonte: Pua et al., 2022.

Legenda: Os ativadores a montante e alvos a jusante da via JNK. Vários tipos de estímulos, como citocinas inflamatórias, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e fatores de crescimento, podem induzir a ativação de membros da família MAPKKK. Outros fatores, como estresse oxidativo e irradiação UV, também podem levar à ativação de MAPKKK. A proteína-esqueleto JNK-interacting protein-1 (J1P) liga a MAPKKK e os membros da família MAPKK às JNKs e facilita a ativação das JNKs. As JNKs ativadas podem se dissociar desse complexo e induzir apoptose dependente de mitocôndrias por meio do linfoma de células B (BCL-2) e da proteína X associada a BCL-2 (BAX). Por outro lado, as JNKs ativadas também podem promover a transcrição de genes envolvidos na proliferação, diferenciação, crescimento e apoptose celular por meio da fosforilação dos alvos a jusante.

citocinas, fatores de crescimento e o fator de necrose tumoral α (TNF- α). Nesta via, as proteínas MAPK cinase cinases (MAPKKKs) são a ASK1/2, TAK1, MLK2/3, MEKK1-4, DLK e TAO1/2. As MAPKKKs ativam por fosforilação as proteínas MAPK cinases MKK4 e MKK7 que, associadas à proteína de interação à JNK 1 (J1P), fosforilam e ativam as proteínas JNK1/2/3. As JNKs ativas induzem diversos efeitos celulares como proliferação celular, por fosforilação de fatores de transcrição como c-Jun, e apoptose, por modular a atividade das proteínas BCL-2 e BAX.

Em contrapartida, evidências apontam para o papel antitumoral da JNK, tornando esta proteína um alvo atrativo para o tratamento do câncer (Abdelrahman *et al.*, 2021). Em células de carcinoma ovariano, a ativação da morte celular dependente de autofagia pode ser induzida por modulação positiva da JNK (Dou *et al.*, 2019).

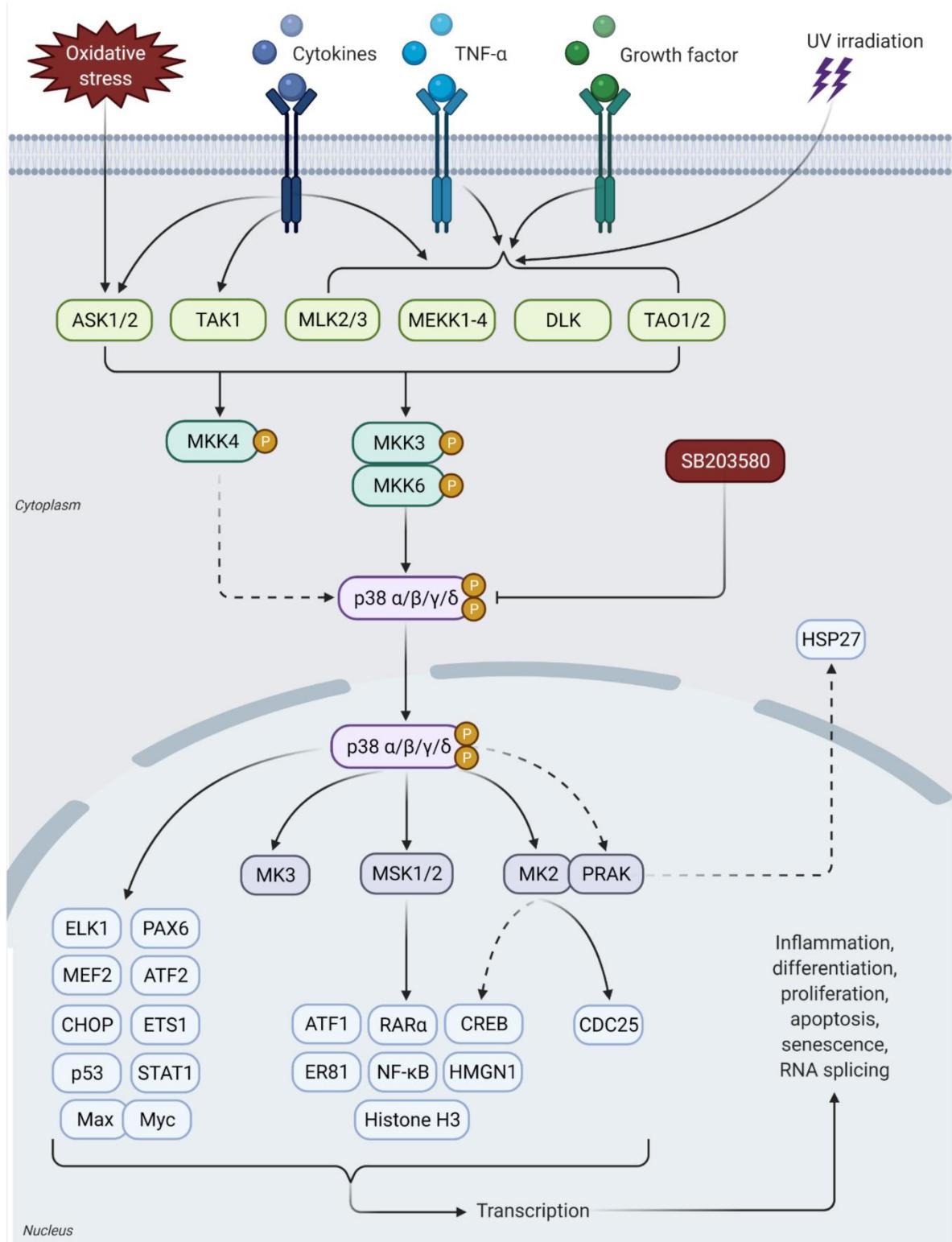
A apoptose de células tumorais tem sido induzida por ativação de JNK por produtos sintéticos. O tratamento de células das linhagens de osteosarcoma 143B e U2OS com metformina induziu o aumento da produção de ROS e ativação da JNK, causando a morte destas células (Li *et al.*, 2020b). Ainda, a exposição de células das linhagens SCC12 e SCC13 (carcinoma escamoso de pele) à pitavastatina induziu apoptose por ativação de JNK (KIM *et al.*, 2023). Por fim, Kang e colaboradores (2023) observaram indução de apoptose por ativação da via JNK/p53 em células da linhagem de câncer colorretal HCT-116 após exposição ao composto codificado como MHY2251, um análogo da 2,3-dihidroquinazolin-4-ona.

2.6.3. Via de sinalização intracelular das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos p38 (p38 MAPK) e o câncer

A p38 MAPK é descrita sob quatro isoformas, p38 α , p38 β , p38 γ e p38 δ (Ma; Nicolet, 2023), expressas de forma ubíqua, mas com diferentes níveis de expressão em vários tecidos (Phan *et al.*, 2023). De forma semelhante ao observado na via de sinalização da JNK, a ativação dessas proteínas é dependente principalmente de estímulos extracelulares relacionados ao estresse (Martínez-Limón *et al.*, 2020).

Ainda, assim como na via da JNK, os estímulos extracelulares, como fatores de crescimento e estresse oxidativo, podem ativar, por exemplo, ASK1/2 e MEKK1-4. Estas cinases fosforilam e ativam as Proteínas Cinases da Proteína Cinase Ativada por Mitógenos 3, 4 e 6 (MKK3, MKK4, MKK6, respectivamente). As MKK3, MKK4 e MKK6 ativam a p38 MAPK que pode modular outras proteínas cinases, como a Proteína Cinase Ativada por Proteína Cinase Ativada por Mitógeno 3 (MK3) ou fatores de transcrição, como o transdutor de sinal e ativador de transcrição 1 (STAT1) (Pua *et al.*, 2021) (Figura 11). A regulação desta via é realizada por fosfatases como DUSP1, DUSP10 e DUSP16 (Chen; Chuang; Tan, 2019), e sua desregulação encontra-se envolvida em diversas doenças (Canovas; Nebreda, 2021).

Figura 11. Cascata de sinalização das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos p38 (p38 MAPK)



Fonte: Pua et al., 2022.

Legenda Os quatro membros da família p38 MAPK (p38 α , p38 β , p38 γ e p38 δ) são ativados por estresse externo, citocinas inflamatórias ou radiação UV, o que é semelhante à via JNK. Uma vez ativada, essa via inicia a produção de fatores de transcrição pró-apoptóticos para inflamação, diferenciação, proliferação, apoptose, senescência e splicing de RNA.

No câncer, tem sido observado que a via p38 MAPK está associada à tumorigênese de carcinoma nasofaríngeo por modulação da proliferação celular, inflamação, angiogênese e metástase (Pua *et al.*, 2022). Em células de melanoma *BRAF* mutantes (A375 e SK-MEL-28), a ativação da p38 MAPK encontra-se associada à regulação negativa de bombas de Ca²⁺ da membrana plasmática do subtipo 4b (PMCA4b), um supressor de metástase (Naffa *et al.*, 2020).

Em seu trabalho de revisão, Phan e colaboradores (2023) reuniram informações acerca do envolvimento da p38 MAPK com os tumores gastrointestinais. No câncer de esôfago, a maior expressão de p38 MAPK está associada a pior prognóstico, sendo observada correlação significativa entre os níveis de p38 γ MAPK e o surgimento de metástases. No câncer gástrico, o tratamento de células das linhagens de câncer gástrico humano AGS, HGC-27 e GES-1 com interferon- γ (IFN- γ) evidenciou regulação negativa da p38 γ MAPK e consequente inibição da proliferação celular.

Diversos estímulos como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) ativam a via da proteína cinase ativada por mitógenos p38 (p38 MAPK) que é expressa sob quatro isoformas: p38 α , p38 β , p38 γ e p38 δ . Nesta via de sinalização intracelular, as proteínas ASK1/2, TAK1, MLK2/3, MEKK1-4, DLK e TAO1/2 (MAPK cinase cinases - MAPKKKs) fosforilam e ativam as proteínas MAPK cinases MKK3, MKK4 e MKK6 que, por sua vez, fosforilam e ativam as proteínas p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$. Quando se encontram ativadas, as p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ fosforilam diversos fatores de transcrição como ATF2 ou outras proteínas cinases, a exemplo da MSK1/2 que, por sua vez, fosforilam alvos como a proteína STAT1. A ativação da via da p38 MAPK pode induzir inflamação, diferenciação celular, proliferação celular, senescência celular ou apoptose.

Contudo, tem sido observado que a via de sinalização da p38 MAPK exerce um papel pleiotrópico no câncer (Pranteda *et al.*, 2020). De fato, diversos fármacos antineoplásicos utilizados na clínica como a oxaliplatina, a irinotecano, o 5-FU e a doxorrubicina induzem a ativação da p38 MAPK como um dos seus mecanismos de ação antitumorais (Martínez-Limón *et al.*, 2020; Pranteda *et al.*, 2020).

Atualmente, diversas pesquisas têm demonstrado que outros compostos naturais e sintéticos têm exercido efeito anticâncer por ativação dessa via de sinalização. Ao avaliar o efeito antitumoral da lobaplatina em células A549 (adenocarcinoma pulmonar), Zhang e colaboradores (2019b) observaram que a

apoptose nestas células é mediada pela indução de estresse oxidativo e ativação da p38 MAPK.

Em adição, a saponina esteroidal timosaponina AIII e polissacarídeos sulfatados derivados da microalga *Synechococcus* sp. exercem significativo efeito antitumoral por ativação da p38 MAPK frente as linhagens de células humanas de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) e colorretal (Caco-2), respectivamente (Zhang *et al.*, 2021a; Srimongkol *et al.*, 2023). Assim, a modulação da p38 MAPK mostra-se uma abordagem promissora para o tratamento do câncer.

2.7. O índio(III) e drogas metálicas

A necessidade por novas e melhores terapias farmacológicas contra o câncer ainda persiste. Embora existam abordagens eficazes para alguns tipos específicos da doença, como a terapia anti-hormonal no câncer de mama (Abedizadeh *et al.*, 2024) e o uso de anticorpos monoclonais contra receptores anormais, a heterogeneidade intrínseca dos tumores muitas vezes exige regimes quimioterápicos altamente tóxicos. O desenvolvimento de fármacos antitumorais seletivos e com baixa toxicidade continua sendo um dos principais desafios da comunidade científica (Singh *et al.*, 2023).

Os efeitos adversos decorrentes do tratamento oncológico comprometem tanto a adesão terapêutica quanto a qualidade de vida dos pacientes e de seus familiares (Lucaci *et al.*, 2023; Abedizadeh *et al.*, 2024). Nesse contexto, as quimioterapias baseadas em metais têm atraído grande atenção desde a introdução da cisplatina (Kamoon; Nadhum; Mohammed, 2020), devido às propriedades únicas dos metais, como a capacidade de realizar reações redox, diferentes modos de coordenação e reatividade frente a compostos orgânicos. Diversos compostos metálicos vêm sendo desenvolvidos por meio da modificação ou substituição de ligantes, resultando em maior eficácia citotóxica e melhores propriedades farmacocinéticas (Lucaci *et al.*, 2023).

Ions metálicos e coligantes não lábeis podem formar ligações covalentes com biomoléculas essenciais, como DNA, proteínas e enzimas, prejudicando seu funcionamento e levando à morte celular por vias como apoptose e necrose (Chan; Ang; Hamid, 2021). As terapias baseadas em platina tornaram-se padrão no tratamento de diferentes malignidades, incluindo câncer de ovário, colo do útero,

pulmão, cabeça e pescoço, bexiga e linfomas (Dilruba; Kalayda, 2026), mas sua utilização é limitada por nefrotoxicidade, neurotoxicidade e resistência tumoral, seja intrínseca ou adquirida (Abd Aziz et al., 2023). Esses problemas impulsionam a busca por novos metalofármacos (metalodrugs) com melhor perfil terapêutico, alguns já em avaliação pré-clínica ou clínica avançada (Monk et al., 2018; Hua et al., 2019; Liu et al., 2020; Ferraro et al., 2023).

Análises de relação estrutura-atividade (SAR, *Structure–Activity Relationship*) demonstraram que, para certos complexos metálicos, o tipo de íon metálico, a posição e o comprimento de cadeias alquilas são determinantes para uma atividade citotóxica eficiente (Hildebrandt et al., 2022). Entre os ligantes promissores, destacam-se os ditiocarbamatos (DTC, *Dithiocarbamates*), compostos quelantes de metais com aplicações médicas diversas, incluindo tratamento de infecções bacterianas e fúngicas, possível uso contra AIDS e, mais recentemente, câncer. Os DTCs são inibidores potentes da via de sinalização do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e, mais recentemente, foram identificados como inibidores do proteassoma (Kamoon; Nadhum; Mohammed, 2020), características que reforçam seu potencial como agentes antineoplásicos (Singh et al., 2023).

Complexos metálicos apresentam grande diversidade química e versatilidade, influenciada pelo metal escolhido, estado de oxidação, número e tipo de ligantes coordenados, além de propriedades magnéticas e/ou ópticas específicas (Hildebrandt et al., 2022). Compostos de platina, cobre, rutênio e ouro já demonstraram propriedades antitumorais promissoras, alguns deles aplicados na prática clínica para diagnóstico e tratamento (Lucaci et al., 2023; Kazimir et al., 2024).

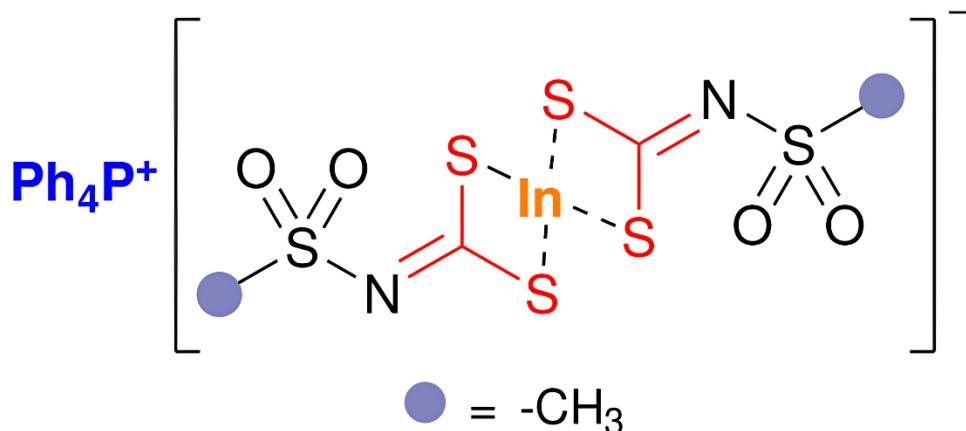
O índio (In) é um metal maleável, dúctil e mais macio que o chumbo, com baixo ponto de fusão. Seu estado de oxidação mais estável é +3, e seus sais reagem com diversos ligantes para formar complexos organometálicos. Compostos de índio(III) vêm sendo estudados para aplicações antimicrobianas (Oliveira et al., 2017; Saini et al., 2009; Zhang et al., 2022), radiofarmacêuticas (Arrowsmith et al., 2011; Green et al., 2005), de imagem e terapia (Zhang et al., 2022; Arrowsmith et al., 2011), além de atividades citotóxica (Tai et al., 2016; Aguirre et al., 2019) e anticâncer (Bajju et al., 2014).

Embora a cisplatina apresente alta taxa de resposta inicial em diversos tumores, a resistência adquirida e seus efeitos adversos limitam a sobrevida dos pacientes (Lucaci et al., 2023). Dentro dessa classe de compostos, o principal efeito

citotóxico observado é a indução de apoptose, que pode ocorrer por dois mecanismos principais: (i) intercalação no DNA, impedindo sua replicação adequada, ou (ii) ativação de processos bioquímicos que desencadeiam morte celular programada (Kazimir et al., 2024).

Assim, a hipótese central deste trabalho é que o complexo bis(N-metilsulfonilditiocarbimato)índio(III) de tetrafenilfosfônio (InFP) possua potencial efeito antitumoral, atuando na modulação de vias bioquímicas associadas à proliferação e sobrevivência de células cancerígenas, sendo capaz de induzir morte celular por apoptose em células de câncer colorretal. Assim, este trabalho se propôs a explorar alternativas terapêuticas mais eficazes e seletivas, contribuindo para o avanço científico no desenvolvimento de compostos bioativos à base de selênio e no enfrentamento de doenças complexas como o câncer.

Figura 12. Estrutura molecular bis(N-metilsulfonilditiocarbamato)índio(III) tetrafenilfosfônio (InFP).



Fonte: Carvalho et al., 2025.

Objetivo

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

- Avaliar a atividade antitumoral *in vitro* do bis(N-metilsulfonilditiocarbamato)índio(III) tetrafenilfosfônio (InFP) em linhagem de câncer colorretal

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade do InFP em diferentes linhagens de câncer colorretal humanas (HCT-116, HT-29 e LoVo);
- Avaliar a citotoxicidade do InFP em linhagem de células não tumorais de rim embrionário humano HEK293;
- Determinar o índice de seletividade (IS) do InFP;
- Avaliar se o InFP induz apoptose ou necrose em células HCT-116;
- Investigar o envolvimento do estresse oxidativo na citotoxicidade induzida pelo InFP em células HCT-116;
- Avaliar a participação de Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs) na citotoxicidade do InFP em células HCT-116.

Material e métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local da pesquisa

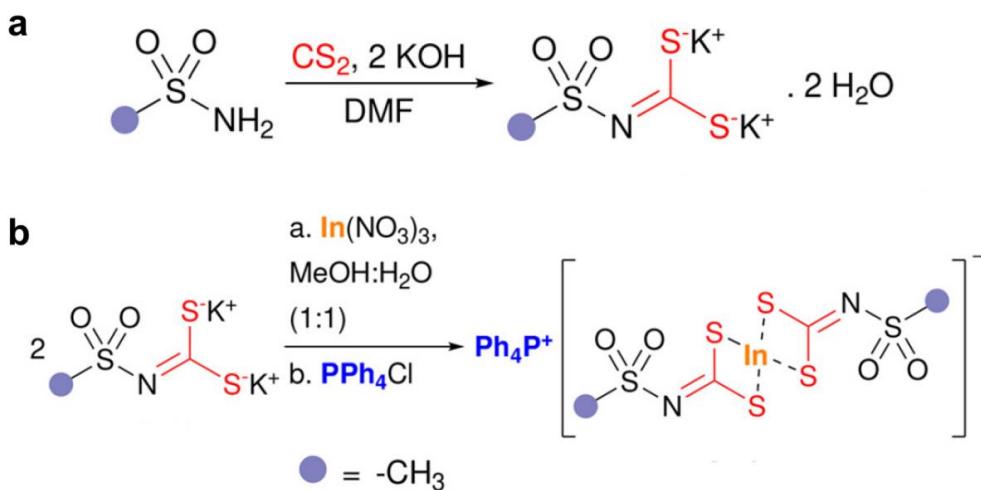
Os ensaios farmacológicos *in vitro* do bis(N-metilsulfonilditiocarbamato)índio(III) tetrafenilfosfônio (InFP) foram realizados no Laboratório de OncoFarmacologia (OncoFar) - Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB) do Centro de Ciências da Saúde (CCS/UFPB), localizado no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM/UFPB), bem como no Laboratório de Biofotônica do Centro de Biotecnologia (CBiotec/UFPB).

4.2. Material

4.2.1. Amostra teste

O composto (InFP) foi sintetizado no Laboratório Curie de Síntese, LaCSin, do Instituto de Física e Química da Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI), pelo Dr. Lucas Raposo Carvalho, conforme descrito em Carvalho e colaboradores (2025) (Figura 13) e cedido pelo Prof. Dr. Eder do Couto Tavares.

Figura 13. Síntese do bis(N-metilsulfonilditiocarbamato)índio(III) tetrafenilfosfônio (InFP).



Fonte: Carvalho et al., 2025

Em a, produção do sal de potássio N-metilsulfonilditiocarbimato di-hidratada, a partir da metilsulfonamida, o sal reagiu com nitrato de índio ($\text{In}(\text{NO}_3)_3$) (b) obtendo o complexo de índio(III).

O sal de potássio N-metilsulfonilditiocarbimato di-hidratado (13a), de fórmula geral $K_2(CH_3-SO_2N=CS_2)\cdot 2H_2O$, foi sintetizado a partir da metilsulfonamida por reação com dissulfeto de carbono (CS_2 , 1,5 eq) e hidróxido de potássio (KOH, 2 eq) em dimetilformamida (DMF). A adição fracionada do KOH em duas etapas, com intervalo de aproximadamente uma hora, evitou a formação de aglomerados e aumentou o rendimento da reação. O produto obtido apresentou-se como sólido amarelo, solúvel em água e insolúvel em solventes orgânicos como DMF e acetona.

O produto 13a foi confirmado por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), com bandas características em 1255 cm^{-1} (v C=N) e 967 cm^{-1} (vas CS_2), bem como pela ausência de bandas atribuídas ao grupo $-NH_2$ ($\sim 3400\text{ cm}^{-1}$), confirmando a conversão da sulfonamida em ditiocarbimato.

O complexo de índio(III), $[In(CH_3-SO_2N=CS_2)_2]^-$ (13b), foi preparado pela reação de 13a com nitrato de índio ($In(NO_3)_3$, 1 eq) em solução metanol:água (1:1), na proporção metal:ligante de 1:2, seguida de precipitação com PPh_4Cl . O produto foi obtido em bom rendimento, com síntese simples em duas etapas, sem necessidade de purificação cromatográfica.

A caracterização do InFP foi realizada por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) e ressonância magnética nuclear (RMN), confirmando a coordenação do ligante ao centro metálico.

4.2.2. Substâncias e reagentes

O azul de tripan, solução fosfato tamponada (PBS), brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT), meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640, meio *Dulbecco's Modified Eagle's* (DMEM), ácido 4-(2-hidroxietil)-1 piperazinoetanossulfônico (HEPES), solução estabilizada de penicilina (100 UI/mL) - estreptomicina (100 $\mu\text{g/mL}$), doxorrubicina e laranja de acridina foram adquiridos na Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA. O soro fetal bovino (SBF), N-acetilcisteína (NAC), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), cloreto de sódio ($NaCl$), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio ($CaCl_2$), sulfato de magnésio ($MgSO_4$), sulfato de sódio (Na_2SO_4) e tripsina 0,25% com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) foram adquiridos na GIBCO®, Grand Island, New York, EUA. O dimetilsulfóxido (DMSO) foi adquirido na Dinâmica®, Indaiatuba, São Paulo, Brasil. A L-glutamina foi adquirida na

Nutricell®, Campinas, São Paulo, Brasil. O Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) foi adquirido na Êxodo Científica®, Sumaré, São Paulo, Brasil. Os marcadores JC-1, Hoechst 34580 e iodeto de propídeo foram adquiridos na Thermo Fisher®, Rochester, New York, EUA. Os inibidores de MAPKs SP600125, U-0126 e PD169316 foram adquiridos na Cayman Chemical®, Ann Arbor, Michigan, EUA.

As drogas e as soluções reagentes foram preparadas imediatamente antes do uso.

4.2.3. Equipamentos

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 (Prismatec®, São Paulo, Brasil), estufa de secagem (DeLeo® equipamentos laboratoriais, Rio Grande do Sul, Brasil), microscópio confocal de varredura a laser (Leica®, Hesse, Alemanha), banho 70 maria AQUAline (LAUDA®, São Paulo, Brasil), geladeira DFN49 (Electrolux®, Paraná, Brasil), agitador MS 3 digital (IKA®, Baden-Württemberg, Alemanha).

4.2.4. Linhagens celulares tumorais e não tumoral humanas

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados utilizando as seguintes linhagens de câncer colorretal: HCT-116, HT-29 e LoVo. Também, foi utilizada a linhagem não tumoral de rim embrionário humano HEK-293. As células foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Brasil) e cultivadas nos meios de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) ou RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*). Os meios foram suplementados com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de penicilina-estreptomicina, e as culturas mantidas a 37 °C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

A manipulação das células foi realizada em fluxo laminar e o crescimento monitorado a cada 24 h. Quando as culturas atingiam aproximadamente 80% de

confluência, procedia-se ao repique celular por adição de 2 a 4 mL de solução de tripsina e incubação por 5 a 15 min para desprendimento da monocamada aderida ao frasco de cultura. Em seguida, adicionava-se volume equivalente de meio suplementado com SBF para inativar a tripsina. As células foram centrifugadas a 500 \times g por 5 min e ressuspensas em meio completo para contagem em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi avaliada por exclusão do corante azul de tripan e a concentração ajustada para 5×10^4 células/mL entre os repiques.

4.3. Métodos

4.3.1. Preparo da amostra

Para a realização dos ensaios farmacológicos, o InFP (1 mg) foi solubilizado em DMSO (100%), obtendo-se uma solução-estoque com concentração final de 20 mM. A partir dessa solução-estoque foram preparadas diluições sucessivas para alcançar as diferentes concentrações de InFP utilizadas no tratamento das células. Em todas as condições experimentais, garantiu-se que a concentração final de DMSO por poço não ultrapassasse 1%.

4.3.2. Avaliação da citotoxicidade do InFP em linhagens de células tumorais e não tumoral humanas e determinação do Índice de Seletividade (IS)

A citotoxicidade do InFP foi avaliada em linhagens de células tumorais e não tumorais humanas por meio do ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio difeniltetrazólio (MTT). O MTT é um sal amarelo permeável à membrana plasmática que, nas células viáveis, é reduzido, por desidrogenases mitocondriais, a cristais insolúveis de formazan de coloração púrpura. A intensidade dessa coloração pode ser quantificada por espectrofotometria, sendo proporcional ao número de células metabolicamente ativas presentes no poço (Mosmann, 1983).

As células foram semeadas em placas de 96 poços nas seguintes concentrações: 2×10^5 células/mL para HEK-293, 3×10^5 células/mL para HCT-116 e HT-29 e 5×10^5 células/mL para LoVo; adicionando-se 100 μ L por poço. Após 24 h de aderência, foram adicionados 100 μ L das soluções de InFP (2,34–100 μ M) ou doxorrubicina (DXR) (0,16–20 μ M), todas solubilizadas em DMSO a uma

concentração final < 1%. As células foram incubadas por 72 h a 37 °C e 5% de CO₂. Decorrido o tempo de incubação, retiraram-se 110 µL do sobrenadante e adicionou-se 10 µL da solução de MTT (5 mg/mL), seguindo-se de incubação por mais 4 h nas mesmas condições. Os cristais de formazan formados foram dissolvidos com SDS (100 µL), e *overnight* e a densidade óptica foi quantificada a 570 nm em leitor de microplacas (Duarte *et al.*, 2022). Os dados obtidos foram usados para determinar a CI₅₀ (concentração necessária para inibir 50% da viabilidade celular). Foram realizados três experimentos independentes com cinco replicatas para cada linhagem celular.

O Índice de Seletividade (IS) foi calculado de acordo com a fórmula descrita a seguir:

$$IS = \frac{CI_{50} \text{ da linhagem celular não tumoral (HEK 293)}}{CI_{50} \text{ da linhagem celular tumoral}}$$

4.3.3. Investigação do tipo de morte celular induzida pelo InFP por microscopia de fluorescência confocal a laser

4.3.3.1. Análise morfológica de células HCT-116 utilizando laranja de acridina e iodeto de propídeo

Foi realizada a análise morfológica de células HCT-116 por coloração com laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP), após tratamento com o composto InFP. O LA é um corante fotossensibilizador, metacromático, permeável às membranas celulares e com alta afinidade por ácidos nucleicos (Gao *et al.*, 2020). Em células viáveis, liga-se RNA e DNA citoplasmático e nuclear (Bankó *et al.*, 2021). Por sua vez, o IP é um corante que depende da perda da integridade da membrana plasmática; quando isso ocorre, intercala-se ao DNA, permitindo a detecção de células necróticas ou em estágio avançado de apoptose (Baskić *et al.*, 2006).

Nesse ensaio, as células HCT-116 foram semeadas em placas de 24 poços, na concentração de 3 × 10⁵ células/mL, e tratadas com o composto InFP nas concentrações de 1,5; 3 ou 6 µM, correspondentes, respectivamente, à metade da concentração que inibe 50% do crescimento das células (CI₅₀), à CI₅₀ e ao dobro da CI₅₀. Como droga padrão, foi utilizada a doxorrubicina (DXR) na concentração de 2,5 µM, equivalente à sua CI₅₀. Os compostos foram previamente dissolvidos em DMSO,

garantindo que a concentração final de solvente não ultrapassasse 1%. Após 48 horas de incubação, as células foram coletadas, centrifugadas ($500 \times g$, 5 minutos, 20 °C), ressuspensas em PBS e coradas com LA (1 mg/mL) e IP (10 µg/mL). As células recém-coradas foram observadas em microscópio confocal a laser, com ampliação de 4000x, utilizando os lasers com comprimentos de onda de excitação de 488 e 552 nm, e detecção de emissão nas faixas de 510–541 nm e 639–701 nm. Foram capturadas imagens de três campos aleatórios para cada amostra, em um total de três experimentos independentes em triplicata. A contagem das células por campo foi realizada por meio do software *Image J*. (Sousa *et al.*, 2023).

Os critérios estabelecidos para contagem foram: a) células viáveis apresentavam núcleo verde claro e estruturas celulares preservadas; b) células em apoptose inicial exibiam núcleo verde intenso com cromatina condensada ou fragmentada; c) células em apoptose tardia mostravam áreas de condensação e fragmentação da cromatina evidenciadas por fluorescência alaranjada, resultante da sobreposição das colorações verde e vermelha, além da formação de *blebs* de membrana; e d) células necróticas ou mortas eram coradas exclusivamente em vermelho (Renvoisé *et. al.*, 1998; Tan *et al.*, 2018).

4.3.3.2. Análise de alterações nucleares em células HCT-116 após marcação com Hoechst 34580

O corante Hoechst 34580 é amplamente utilizado para marcação da cromatina, sendo permeável à membrana celular e emitindo fluorescência azul intensa. Trata-se de um agente não intercalante que se liga preferencialmente ao sulco menor do DNA, com afinidade aumentada por regiões ricas em pares de bases adenina-timina (A-T). Essa propriedade torna o Hoechst 34580 uma ferramenta eficaz para a avaliação de alterações nucleares associadas à apoptose, tais como condensação e/ou fragmentação da cromatina e encolhimento nuclear (picnose). (Bucevičius; Lukinavičius; Gerasimaitė, 2018).

Para este ensaio, as células HCT-116 foram semeadas em placas de 24 poços, na concentração de 3×10^5 células/mL, e incubadas a 37° C com 5% de CO₂. Após 24 h, foram expostas ao InFP (1,5 ou 3 µM) ou DXR (2,5 µM) e mantidas em incubação por mais 48 h. Posteriormente, foram ressuspensas em PBS e coradas por 20 minutos com 20 µL de Hoechst a 10 µg/mL, à temperatura ambiente e protegidas da luz. A

análise foi realizada em microscópio confocal a laser, com 4000x de amplificação, utilizando laser de excitação a 405 nm e coleta de emissão na faixa de 410-600 nm. Foram capturadas três ou quatro imagens de campos aleatórios por amostra, totalizando três experimentos independentes em triplicata. A fluorescência foi quantificada por meio do *software Image J*.

4.3.3.3. Análise de células HCT-116 marcadas com JC-1

O cloreto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) é um corante lipofílico, permeável à membrana, que se acumula seletivamente nas mitocôndrias e exibe fluorescência verde (monômeros) em baixos potenciais de membrana e fluorescência vermelha (agregados J) em potenciais elevados. Assim, a despolarização mitocondrial é indicada por uma redução na razão fluorescência vermelha/verde (Smiley et al., 1991).

Para este ensaio, as células HCT-116 foram semeadas em placas de 24 poços (3×10^5 células/mL) e incubadas a 37° C com 5% de CO₂. Após 24 h, foram tratadas com InFP (1,5 ou 3 μ M) por 48 h ou com cianeto de carbonila 3-clorofenilhidrazona (CCCP a 4 μ M) utilizado como controle positivo, por cinco minutos. Em seguida foi adicionado 10 μ L de JC-1 a 2,5 μ M por 15 minutos nas mesmas condições. Posteriormente, as células foram ressuspensas em PBS e analisadas em microscópio confocal a laser, com 4000x de amplificação, utilizando laser de excitação a 488 nm e coleta de emissão na faixa de 520-542 e 580-614 nm. Foram capturadas quatro imagens de campos aleatórios por amostra, em um total de dois experimentos independentes em triplicata. A fluorescência foi quantificada por meio do *software Image J*.

4.3.4. Avaliação da citotoxicidade do InFP na presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC)

A N-acetilcisteína (NAC) é uma molécula antioxidante que atua reduzindo ligações dissulfetos, eliminando radicais livres e servindo de precursor para a biossíntese de glutationa (Kwon, 2021). Nesse contexto, foi avaliada a influência das espécies reativas de oxigênio (ROS) no efeito citotóxico do InFP em células pré-tratadas com NAC.

Para isto, as células HCT-116 foram semeadas em placas de 96 poços a uma concentração de 3×10^5 células/mL. Após 24 h, as células foram incubadas na presença ou ausência da NAC (5 mM) por 4 h. Decorrido este período, as células foram tratadas com 1,5 ou 3 μ M do InFP ou 2,5 μ M de DXR. Após incubação por 72 h, o sobrenadante foi descartado e a solução de MTT (5 mg/mL) foi adicionada e incubada por mais 4 h. O formazan depositado foi dissolvido com SDS *overnight* (Yedjou; Tchounwou, 2007) e as densidades ópticas foram medidas usando um leitor de microplacas em $\lambda = 570$ nm e usadas para determinar a viabilidade celular (%). Foram realizados três experimentos independentes em quadruplicata.

4.3.5. Avaliação da citotoxicidade do InFP na presença ou ausência de inibidores de MAPKs (iMAPKs)

Para avaliar o envolvimento das vias de MAPKs na citotoxicidade do InFP, células HCT-116 foram pré-tratadas com inibidores específicos das proteínas MEK/ERK1/2 (U0126), JNK (SP600125) ou p38 MAPK (PD169316). Para isso, as células foram semeadas em placas de 96 poços, na concentração de 3×10^5 células/mL. Após 24 horas de incubação, foram tratadas por uma hora na presença ou ausência dos inibidores: U0126 (5 μ M), SP600125 (20 μ M) ou PD169316 (20 μ M). Em seguida, as células foram expostas ao InFP na concentração de 1,5 e 3 μ M ou à DXR a 2,5 μ M. Após 72 horas de incubação, o sobrenadante foi removido e adicionada solução de MTT (5 mg/mL), com nova incubação por 4 horas. O formazan formado foi solubilizado com SDS e incubado *overnight*, conforme descrito por Sousa e colaboradores (2025). As densidades ópticas foram medidas em leitor de microplacas a 570 nm e utilizadas para o cálculo da viabilidade celular (%). Foram realizados três experimentos independentes, cada um em quadruplicata.

4.3.6. Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando GraphPad Prism 8.0.2 (Graphpad Software Inc, San Diego, CA, EUA). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM).

A análise estatística dos dados foi realizada por meio da Análise de Variância (ANOVA) *one-way*, seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$). A concentração que inibe

50% da viabilidade celular (IC_{50}) e seus intervalos de confiança de 95% foram obtidos por análise de regressão não-linear. O índice de seletividade (IS) foi obtido a partir da razão entre a IC_{50} da célula não tumoral pela IC_{50} da célula tumoral (Ferreira *et al.*, 2023).

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Citotoxicidade do InFP em diferentes linhagens de câncer colorretal

Na tabela 1 estão expressos os valores da concentração capaz de reduzir 50% da viabilidade celular (IC_{50}) para o composto de coordenação de índio (InFP) e a doxorrubicina (DXR), para as linhagens humanas de câncer colorretal (HCT-116, HT-29 e LoVo) e para a linhagem não tumoral de rim embrionário humano HEK-293, após 72 horas de tratamento, utilizando o ensaio do MTT.

Tabela 1. Citotoxicidade e Índice de seletividade (IS) do composto de coordenação de índio (InFP) ou doxorrubicina (DXR) em linhagens de células de câncer colorretal e na linhagem não tumoral HEK-293 após 72 h de tratamento, por meio do ensaio do MTT.

Linhagem de células humanas	IC_{50} (μM)		Índice de seletividade (IS)	
	InFP	DXR	InFP	DXR
HCT-116	2,87 ± 0,14	2,53 ± 0,14	37,53	0,20
HT-29	3,86 ± 0,35	1,25 ± 0,092	27,83	0,64
LoVo	49,9 ± 8,0	-	2,16	-
HEK-293	107,7 ± 2,07	0,51 ± 0,03	-	-

Fonte: elaborado pelo autor.

Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes realizados em triplicata ou quadruplicata, apresentados em valores de IC_{50} obtidos por regressão não linear com intervalo de confiança de 95%. Índice de seletividade (IS): calculado como IC_{50} da linhagem HEK-293 dividido pela IC_{50} da linhagem tumoral correspondente. InFP: bis(N-metilsulfonilditiocarbamato)índio(III) tetrafenilfosfônio; DXR: doxorrubicina.

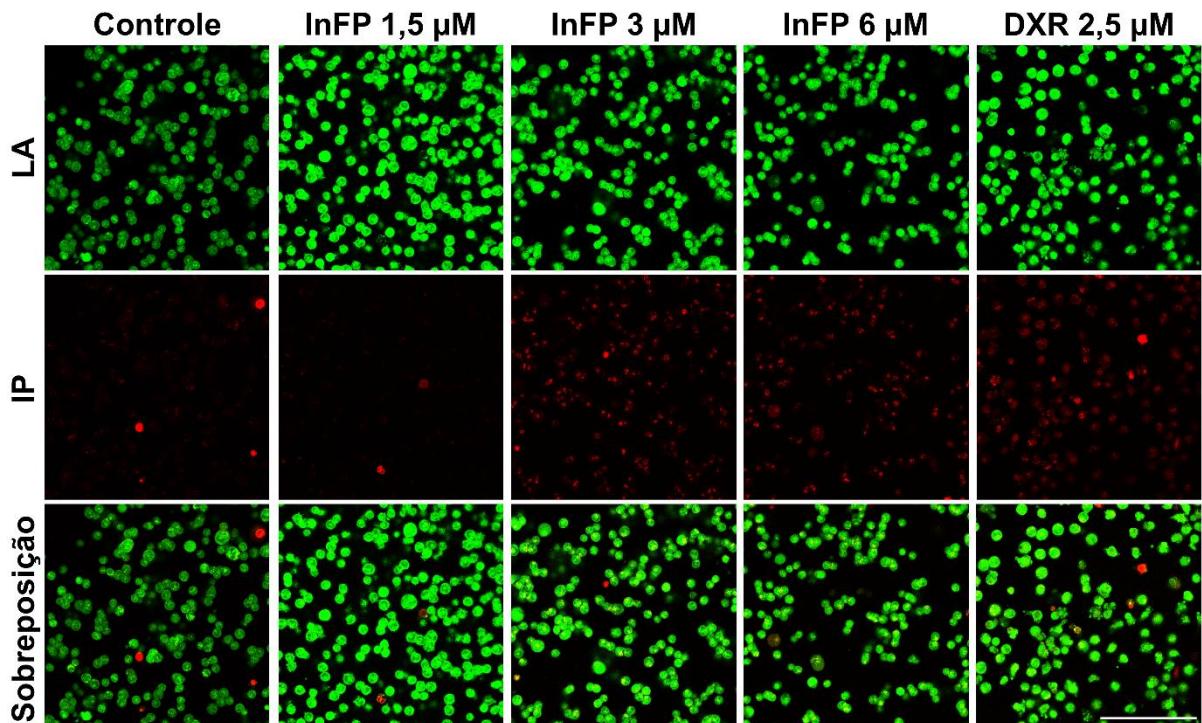
Conforme demonstrado na Tabela 1, o composto de coordenação ao índio (InFP) apresentou o menor valor de IC_{50} para a linhagem HCT-116 (2,87 ± 0,14 μM). Para a linhagem HT-29, o valor de IC_{50} foi de 3,86 ± 0,35 μM , enquanto para as linhagens LoVo e HEK-293, menos sensíveis ao composto, os valores foram de 49,9 ± 8,0 μM e 107,7 ± 2,07 μM , respectivamente. A doxorrubicina (DXR), utilizada como controle positivo, apresentou IC_{50} de 2,53 ± 0,14 μM em HCT-116 e valores 1,25 ± 0,092 μM e 0,51 ± 0,03 μM em HT-29 e HEK-293, respectivamente.

O índice de seletividade (IS), calculado pela razão entre a IC_{50} da linhagem HEK-293 e a IC_{50} das células tumorais, foi de 37,53 para HCT-116, 27,83 para HT-29 e 2,16 para LoVo. Em contrapartida, a doxorrubicina apresentou valores de IS menores que 1 (0,20 para HCT-116 e 0,64 para HT-29).

5.2. Morfologia das células HCT-116 por análise de microscopia de fluorescência confocal a laser após marcação com laranja de acridina e iodeto de propídeo

A Figura 14 apresenta imagens representativas das células de câncer colorretal HCT-116 marcadas com laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP) após 48 horas de tratamento.

Figura 14. Avaliação morfológica da morte celular por coloração com laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP) em células HCT-116 tratadas com InFP ou doxorrubicina (DXR) por 48h.



Fonte: elaborada pelo autor.

Imagens representativas obtidas por microscopia de fluorescência confocal a laser da coloração com laranja de acridina (LA, exc. 488 nm/emis. 510-541 nm) e iodeto de propídeo (IP, exc. 510 nm/emis. 639-701 nm) em células de câncer colorretal HCT-116 após 48 h de tratamento. As imagens correspondem às marcações individuais do LA e IP e à sobreposição das duas marcações, respectivamente. O controle apresenta células com núcleos verde claro, enquanto as células tratadas com InFP (1,5; 3 e 6 μ M) e doxorrubicina (2,5 μ M) apresentam aumento da marcação do núcleo em verde brilhante e do vermelho, indicando diferentes estágios de morte celular por apoptose. As imagens são representativas de pelo menos três experimentos independentes. InFP: bis(N-metilsulfonilditiocarbamato)índio(III) tetrafenilfosfônio; DXR: doxorrubicina. barra de escala: 100 μ m.

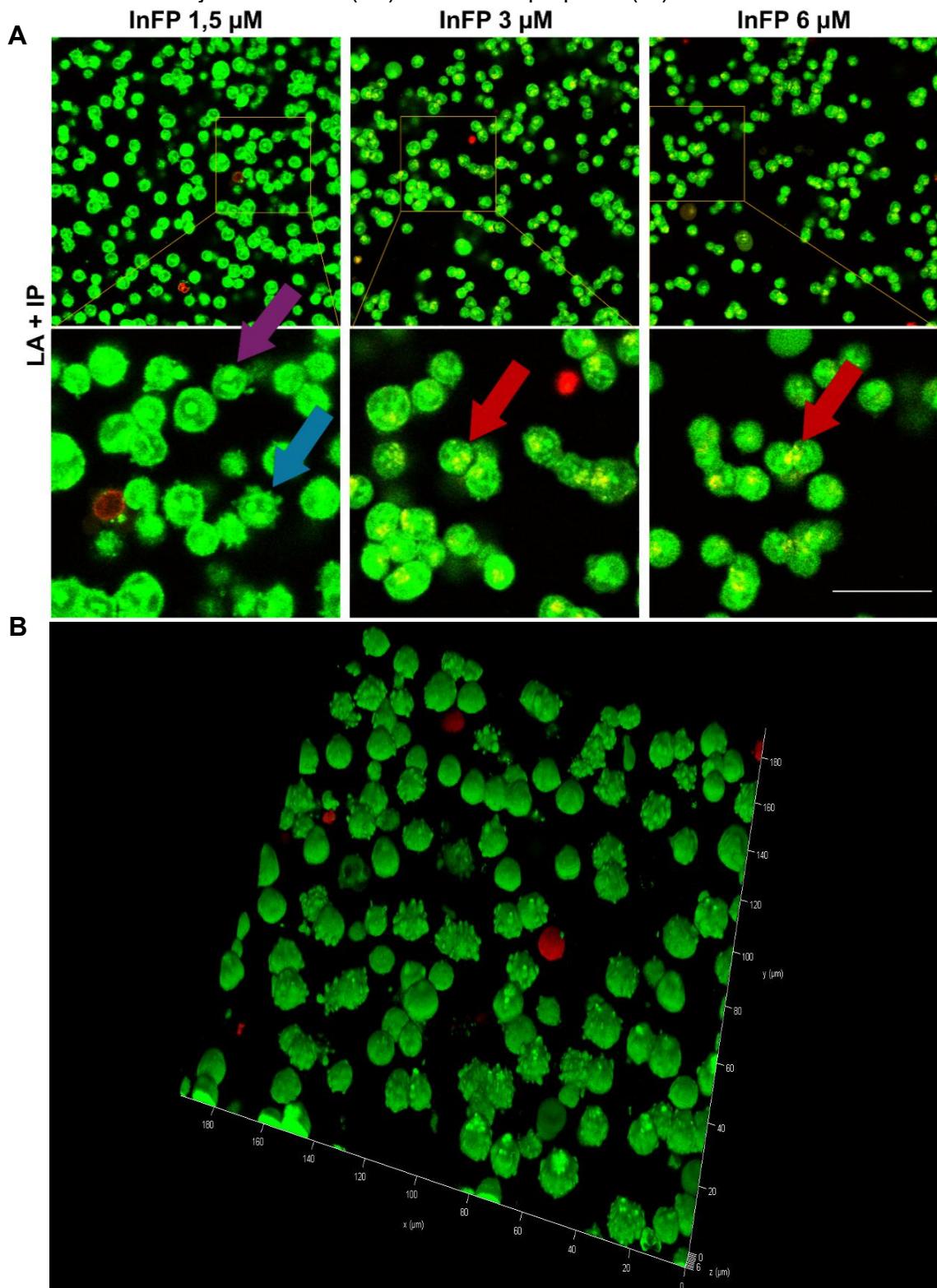
No grupo controle, observa-se a fluorescência verde do núcleo marcado por LA, compatível com estruturas nucleares intactas. Após o tratamento com DXR ou as diferentes concentrações de InFP, nota-se a presença de células com núcleo verde brilhante, evidenciado pelas áreas verdes densas, mostrando a condensação da

cromatina na apoptose inicial (observada principalmente na concentração de 1,5 μ M de InFP).

Com o aumento da concentração do InFP, verifica-se um aumento da marcação por IP (vermelho), indicando perda na integridade da membrana, fragmentação da cromatina e formação de áreas alaranjadas (sobreposição de verde e vermelho), compatíveis com apoptose em estágio avançado. A presença de células com núcleos vermelhos estruturalmente intactas indica morte por necrose.

Na ampliação das imagens (figura 15A), a condensação da cromatina está indicada pela seta púrpura, enquanto a formação de *blebs* de membrana está indicada pela seta azul. A fragmentação nuclear é destacada pela seta vermelha. Na Figura 15B, a reconstrução tridimensional das células tratadas com 1,5 μ M de InFP confirma a formação de *blebs* de membrana e a presença de corpos apoptóticos, reforçando os achados morfológicos observados nas imagens bidimensionais.

Figura 15. Imagens representativas das características da apoptose em células de câncer colorretal HCT-116 após 48 h de tratamento com composto de coordenação de índio (InFP), marcadas com laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP).

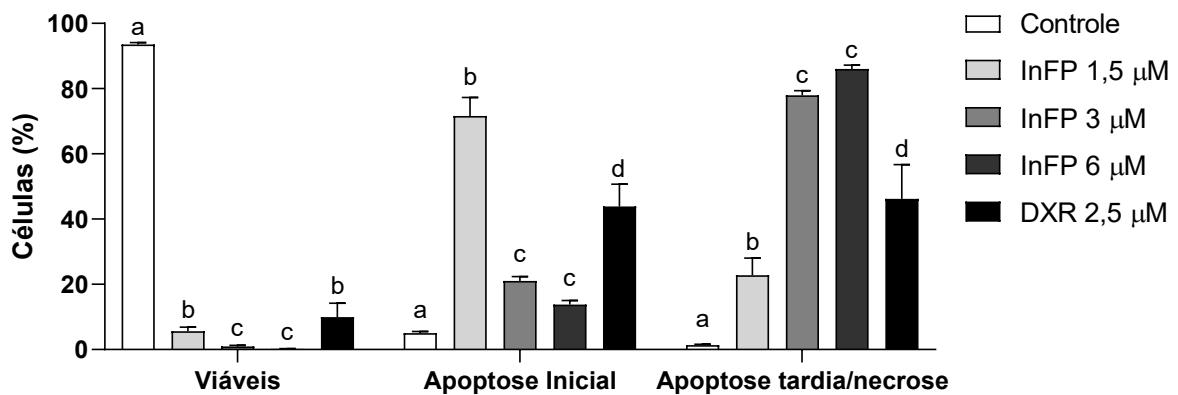


Fonte: elaborado pelo autor.

Imagens representativas de células duplamente coradas com laranja de acridina (LA) e/ou iodeto de propídeo (IP). Em (A), a seta púrpura indica condensação da cromatina; seta azul indica *blebs* de membrana e seta vermelha indica fragmentação do DNA. Em (B), imagem representativa tridimensional das células tratadas com 1,5 μM do InFP por 48 h, mostrando a formação de *blebs* de membrana. InFP: bis(N-metilsulfonilditiocarbamato)índio(III) tetrafenilfosfônio; barra de escala: 50 μm.

A Figura 16 apresenta o percentual das células de câncer colorretal HCT-116 em diferentes estágios de morte celular após 48 horas de tratamento com o composto de coordenação de índio (InFP) ou doxorrubicina (DXR), analisadas por coloração com laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP).

Figura 16. Efeito do composto de coordenação de índio (InFP) ou doxorrubicina (DXR) em células de câncer colorretal humano HCT-116, após 48 h de tratamento, analisada por coloração de laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP)



Fonte: elaborado pelo autor.

Porcentagem de células marcadas com laranja de acridina (LA) e/ou iodeto de propídeo (IP). Os dados estão expressos como média ± EPM de dois experimentos independentes realizados em triplicata e analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguido pelo teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais para cada condição, em que $p < 0,05$. InFP: bis(N-metilsulfonilditiocarbamato)índio(III) tetrafenilfosfônio; DXR: doxorrubicina.

As células viáveis foram predominantes no grupo controle, representando a maioria da população celular ($93,58 \pm 0,51\%$). Após o tratamento com InFP, observou-se uma redução significativa da população viável ($5,58 \pm 1,12\%$; $0,77 \pm 0,17\%$ e $0,17 \pm 0,1\%$, respectivamente para $1,5 \mu\text{M}$, $3 \mu\text{M}$ e $6 \mu\text{M}$; $p < 0,05$). No tratamento com DXR ($2,5 \mu\text{M}$), o percentual de células viáveis foi de $9,92 \pm 2,44\%$ ($p < 0,05$).

O número de células em apoptose inicial aumentou de $5,02 \pm 0,45\%$ no grupo controle para $71,62 \pm 3,76\%$ após o tratamento com InFP ($1,5 \mu\text{M}$) ($p < 0,05$). Na mesma concentração, observou-se um aumento significativo da população em apoptose tardia para $20,82 \pm 3,37\%$ ($p < 0,05$) (Figura 16).

Nas concentrações de 3 e $6 \mu\text{M}$ do composto de índio(III), houve um aumento significativo da população em apoptose inicial ($21,01 \pm 0,94\%$ e $13,79 \pm 0,99\%$, respectivamente; $p < 0,05$) em relação ao controle. Da mesma forma, o percentual de células em apoptose tardia aumentou de forma significativa, atingindo $76,57 \pm 1,15\%$ e $84,29 \pm 1,03\%$, respectivamente.

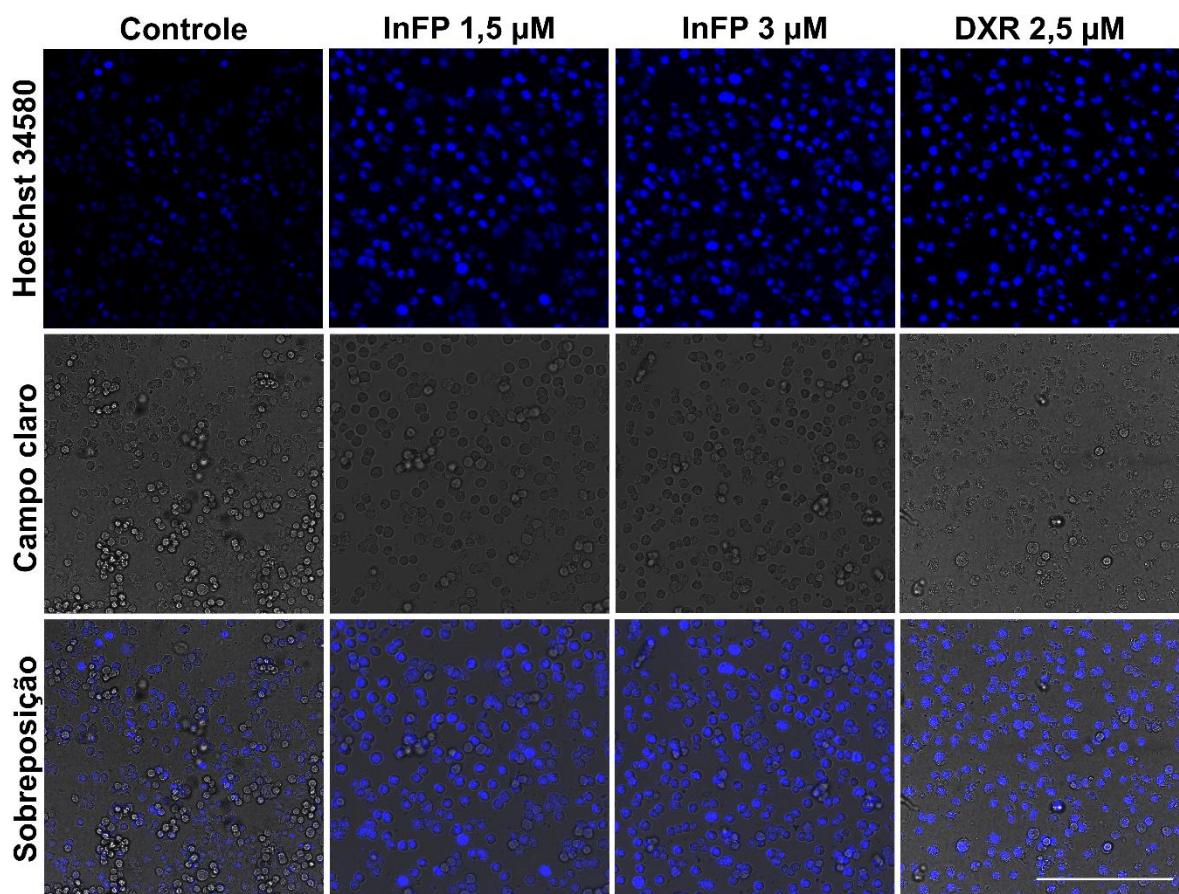
O tratamento com DXR (2,5 μ M) também reduziu a viabilidade celular e aumentou a população em apoptose inicial ($43,91 \pm 4,04\%$) e tardia ($38,20 \pm 5,64\%$); $p < 0,05$.

O total de células apoptóticas (apoptose inicial + tardia) no grupo controle foi de $5,11 \pm 0,43\%$. O tratamento com 1,5 μ M de InFP elevou significativamente esse total para $92,44 \pm 1,32\%$, sendo ainda maior nas concentrações de 3 e 6 μ M, alcançando valores próximos a 98%, quando comparadas com a menor concentração do composto ($p < 0,05$). Em adição, o total apoptótico induzido pela DXR foi de $82,11 \pm 2,13\%$.

5.3. Alterações nucleares induzidas por InFP em células HCT-116 analisadas por microscopia confocal a laser após coloração com Hoechst 34580.

A Figura 17 apresenta imagens representativas das células de câncer colorretal HCT-116 marcadas com Hoechst 34580 (HO458) após 48 horas de tratamento. No grupo controle, observa-se o núcleo das células fracamente marcados em azul. Após o tratamento com 1,5 e 3 μ M de InFP ou DXR (2,5 μ M), as células passaram a apresentar núcleos azul brilhante e aumento da intensidade de fluorescência.

Figura 17. Imagens representativas de células de câncer colorretal humano HCT-116 marcadas com Hoechst 34580 após 48h de tratamento com composto de coordenação de índio (InFP) ou doxorrubicina (DXR).

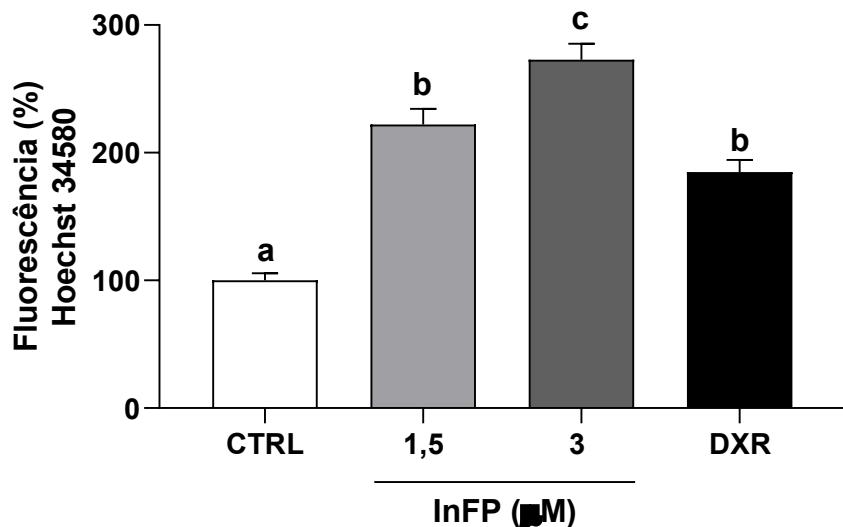


Fonte: elaborado pelo autor.

Imagens representativas de células coradas com Hoechst 34580. As células viáveis apresentam núcleo fracamente corado em azul, enquanto as células apoptóticas exibem um núcleo azul brilhante, indicando condensação da cromatina. InFP: bis(N-metilsulfonilditiocarbamato)índio(III) tetrafenilfosfônio; DXR: doxorrubicina. barra de escala: 100 μ m.

A Figura 18 apresenta o percentual de fluorescência de HO458 nas células HCT-116 após 48 horas de tratamento com InFP ou DXR. Do ponto de vista quantitativo, as células do controle obtiveram uma média de $100,0 \pm 5,53\%$ intensidade de fluorescência. O tratamento com InFP na concentração de 1,5 μ M aumentou significativamente para $222,1 \pm 12,36\%$, enquanto 3 μ M obteve um percentual de fluorescência de $273,0 \pm 12,53\%$ ($p < 0,01$). A DXR na concentração de 2,5 μ M induziu um aumento de $184,9 \pm 9,5\%$ (figura 18).

Figura 18. Efeito do composto de coordenação de índio (InFP) ou doxorrubicina (DXR) em células de câncer colorretal humano HCT-116, após 48 h de tratamento, marcadas com Hoechst 34580.



Fonte: elaborado pelo autor.

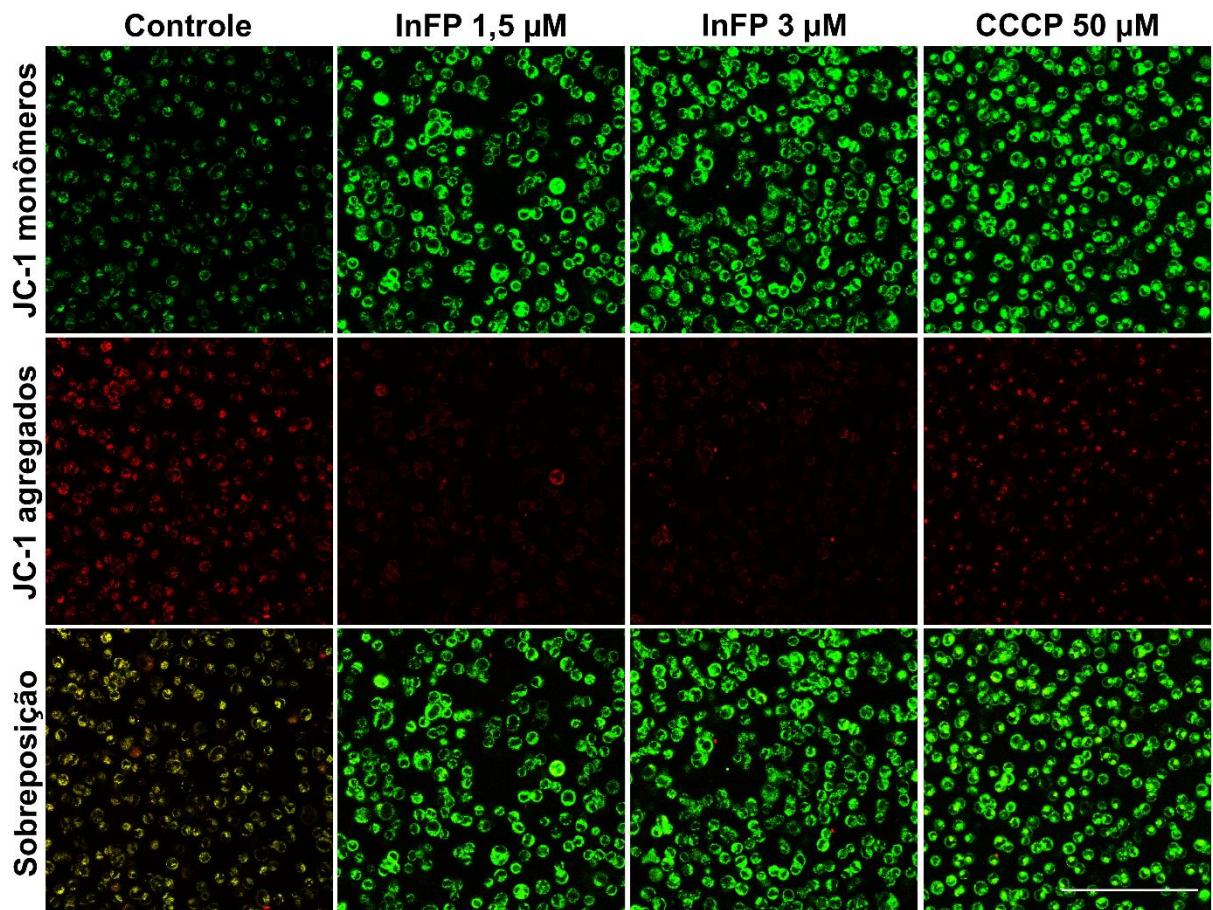
Percentual de fluorescência de células marcadas com Hoechst 34580. Os dados estão expressos como média \pm EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata e analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguido pelo teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais, em que $p < 0,01$. CTRL: controle negativo; InFP: bis(N-metilsulfonilditiocarbamato)índio(III) tetrafenilfosfônio; DXR: doxorrubicina.

5.4. Efeito do InFP no potencial de membrana mitocondrial em células HCT-116

A Figura 19 apresenta imagens representativas das células de câncer colorretal HCT-116 marcadas com JC-1 após 48 horas de tratamento com InFP. No grupo controle, observa-se predominância de fluorescência vermelha, indicando a presença de agregados de JC-1. Em contraste, os grupos tratados com InFP exibem fluorescência verde intensa e reduzida fluorescência vermelha, evidenciando a perda do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi M$).

O grupo controle apresentou uma razão média de fluorescência significativamente maior quando comparado com os demais grupos experimentais ($1,47 \pm 0,02$). As células tratadas com InFP nas concentrações de 1,5 e 3 μM apresentaram uma redução significativa nessa razão ($0,15 \pm 0,01$ e $0,12 \pm 0,01$, respectivamente; $p < 0,001$), e não diferindo do controle positivo para despolarização mitocondrial, o carbonil cianeto p-trifluorometoxifenil-hidrazona (CCCP) ($0,11 \pm 0,003$) (figura 20).

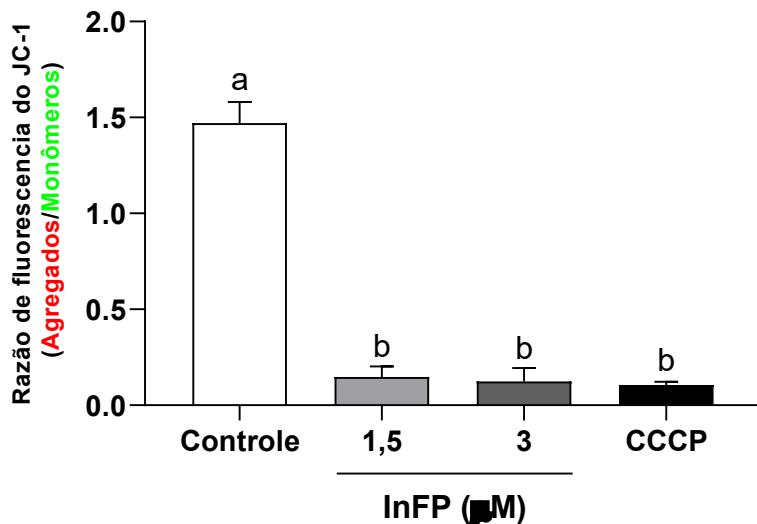
Figura 19. Imagens representativas de células de câncer colorretal HCT-116 após 48 h de tratamento com composto de coordenação de índio (InFP) e marcadas com JC-1.



Fonte: elaborado pelo autor.

Imagens representativas de células coradas com JC-1. O JC-1 é um corante catiônico que em sua forma monomérica emite uma fluorescência verde brilhante, ao se acumular no interior de mitocôndrias com alta diferença de potencial de membrana ($\Delta\psi_m$), formam agregados, emitindo uma fluorescência vermelha. InFP: bis(N-metilsulfonilditiocarbamato)índio(III) tetrafenilfosfônio; CCCP: carbonil cianeto p-trifluorometoxifenil-hidrazona. barra de escala: 100 μ m.

Figura 20. Razão da fluorescência do JC-1 em células de câncer colorretal HCT-116 tratadas com o composto de coordenação de índio (InFP) após 48 h.



Fonte: elaborado pelo autor.

Razão entre a intensidade de fluorescência dos agregados (vermelho) e dos monômeros (verde) do corante JC-1 em células HCT-116. A redução desta razão indica despolarização da membrana mitocondrial. Os dados estão expressos como média ± EPM de dois experimentos independentes realizados em triplicata e analisados por Análise de Variância (ANOVA) one-way, seguida pelo teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais ($p < 0,001$). InFP: bis(N-metilsulfonilditiocarbamato)índio(III) tetrafenilfosfônio; CCCP: carbonil cianeto p-trifluorometoxifenil-hidrazona.

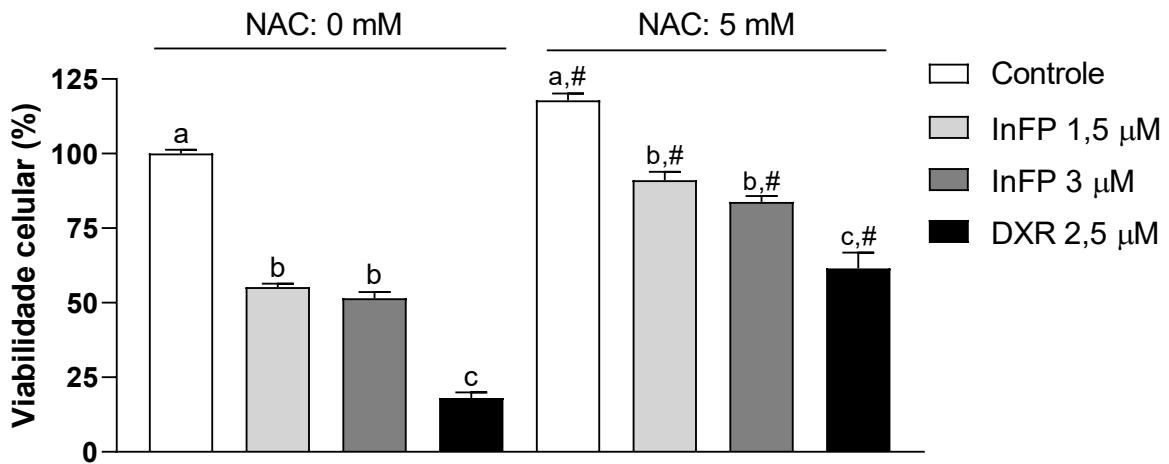
5.5. Citotoxicidade do InFP em células HCT-116 na presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC)

A figura 21 mostra a citotoxicidade do InFP ou DXR na presença ou ausência da N-acetilcisteína (NAC). Após 72h de tratamento com o InFP na ausência da NAC, observou-se redução significativa na viabilidade celular. As concentrações de 1,5 e 3 μM de InFP reduziram a viabilidade de $100 \pm 1,33\%$ (controle) para $55,23 \pm 1,2\%$ e $51,55 \pm 2,1\%$, respectivamente ($p < 0,05$).

O pré-tratamento por 3h com NAC (5 mM) reduziu significativamente o efeito citotóxico do InFP nas células HCT-116 (figura 21). A viabilidade celular aumentou de forma significativa para $91,08 \pm 2,8\%$, quando tratadas com 1,5 μM do composto, e $83,77 \pm 2,0\%$ para as células tratadas com 3 μM, quando comparado com seus respectivos grupos experimentais não pré-tratados com o NAC ($p < 0,05$).

Para a doxorrubicina (2,5 μM), o efeito citotóxico também reduziu após a adição da NAC, com viabilidade celular de $18,07 \pm 1,83\%$ e $61,55 \pm 5,3\%$, respectivamente na ausência e presença do antioxidante ($p < 0,01$) (figura 21).

Figura 21. Citotoxicidade do composto de coordenação de índio (InFP) ou doxorrubicia (DXR) na linhagem de câncer colorretal HCT-116 na presença ou ausência N-acetilcisteína (NAC) após 72 h de tratamento



Fonte: elaborado pelo autor.

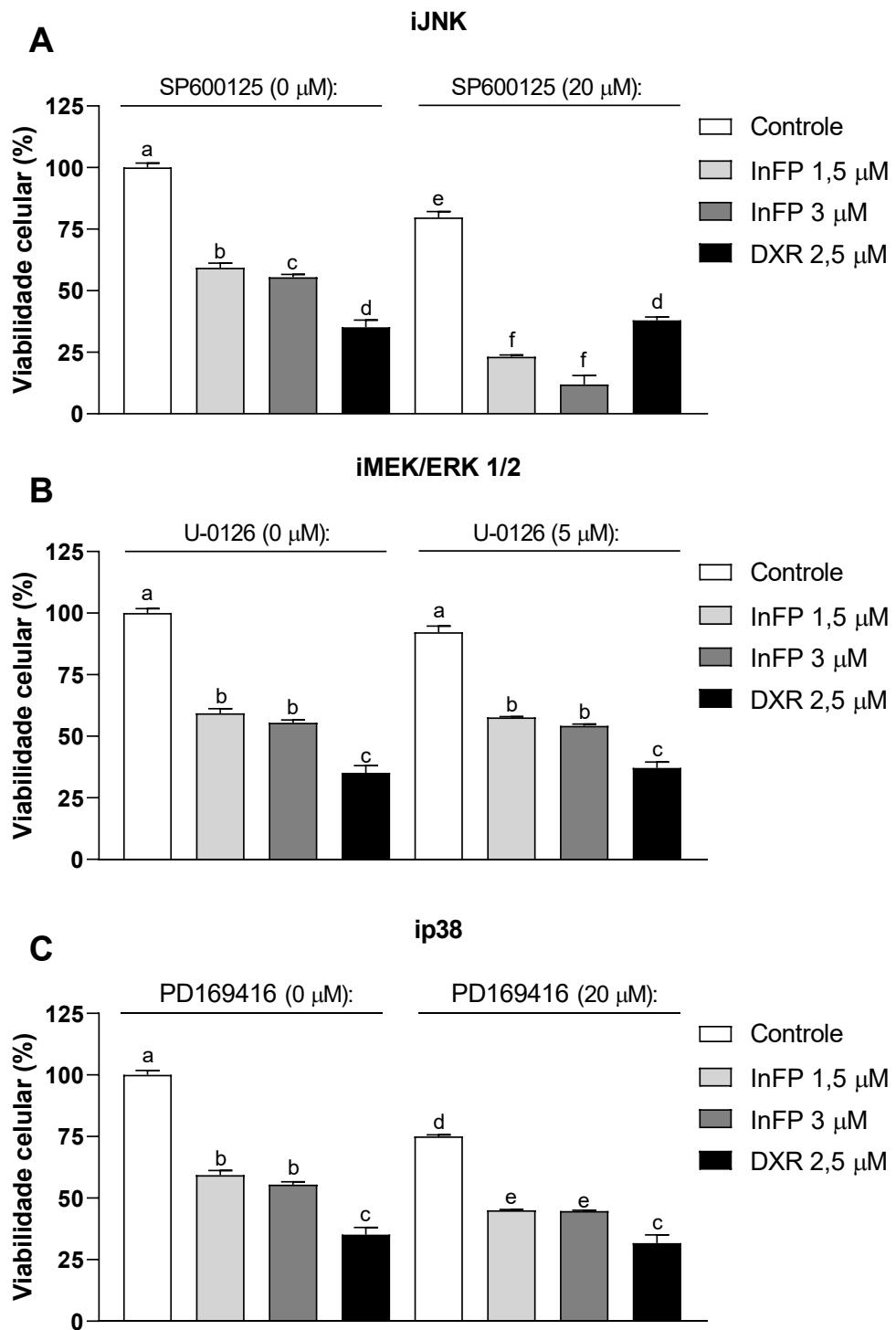
Viabilidade celular (%) após 72 h de tratamento com InFP ou DXR na presença ou ausência de NAC (5 mM). Os dados estão expressos como média \pm EPM de três experimentos independentes realizados em quadruplicata analisados por Análise de Variância (ANOVA) one-way seguido do teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais para cada condição e # representa diferença significativa entre a presença ou ausência do NAC, em ambos os casos, $p < 0,05$. NAC: N-acetilcisteína; InFP: bis(N-metilsulfonilditiocarbamato)índio(III) tetrafenilfosfônio; DXR: doxorrubicia.

5.6. Citotoxicidade do InFP em células HCT-116 na presença ou ausência de inibidores das MAPKs.

Quanto à avaliação do efeito citotóxico em células HCT-116 do InFP na presença ou ausência de inibidores das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógeno (MAPKs), obteve-se a figura 22. Observa-se que na ausência dos inibidores de JNK, p38 e MEK/ERK-1/2 após 72 horas de tratamento com o InFP nas concentrações de 1,5 e 3 μ M, verificou-se redução significativa da viabilidade celular ($59,36 \pm 1,87\%$ e $55,43 \pm 1,15\%$, respectivamente; $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle ($100 \pm 4,22\%$).

O pré-tratamento com o inibidor de JNK (iJNK, SP600125) potencializou o efeito citotóxico do InFP em células de câncer colorretal HCT-116, reduzindo a viabilidade celular para $23,20 \pm 0,74\%$ e $11,92 \pm 3,63\%$ ($p < 0,05$), em 1,5 e 3 μ M do InFP, respectivamente, quando comparado com os respectivos grupos na ausência do iJNK (figura 22A). O uso do inibidor de p38 (ip38, PD169416) também potencializou o efeito citotóxico do InFP em células de câncer colorretal HCT-116 ($45,01 \pm 0,39\%$ e

Figura 22. Citotoxicidade do composto de coordenação de índio (InFP) ou doxorrubicina (DXR) na presença ou ausência dos inibidores de MAPK na linhagem de câncer colorretal HCT-116 após 72 h de tratamento, através do ensaio do MTT.



Viabilidade celular (%) após 72 h de tratamento com InFP ou DXR na presença ou ausência de SP600125 (20 μM, inibidor de JNK1/2) (A), U-126 (5 μM, inibidor de MEK/ERK1/2) (B) ou PD169416 (20 μM, inibidor de p38) (C). Os dados estão expressos como média ± EPM de três experimentos independentes realizados em quadruplicata analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguido do teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais, em que $p < 0,05$.

$44,77 \pm 0,33\%$, em $1,5$ e $3 \mu\text{M}$, respectivamente; $p < 0,05$), quando comparado aos grupos tratados com esse composto de índio na ausência do ip38 (figura 22C).

Quando comparado com o grupo na ausência do inibidor de MEK/ERK1/2 (iMEK/ERK 1/2, U-0126), o pré-tratamento com o iMEK/ERK1/2 não foi capaz de alterar de forma significativa o efeito citotóxico do InFP para ambas as concentrações testadas (figura 22B). Também, não foram observadas diferenças significativas na citotoxicidade da DXR em células HCT-116 ausência ou presença dos diferentes inibidores testados (iJNK, ip38 e iMEK/ERK 1/2).

Discussão

6. DISCUSSÃO

O câncer colorretal (CCR) apresenta alta incidência global e está entre as principais causas de mortalidade por câncer (Abedizadeh et al., 2024). As opções terapêuticas atuais incluem principalmente cirurgia e quimioterapia citotóxica, que, com agentes como 5-fluorouracil (5-FU), oxaliplatina e irinotecano, contribuem para o controle da doença e melhoram a sobrevida (Kotlarza et al., 2019; Gach-Janczak et al., 2024). Apesar desses avanços, a eficácia é frequentemente limitada pela resistência adquirida das células tumorais e pelos efeitos adversos sistêmicos, que comprometem a qualidade de vida dos pacientes. Estratégias como o uso da capecitabina e esquemas combinados com efeito sinérgico mitigaram parcialmente essas limitações, mas permanecem insuficientes para alcançar a remissão completa, especialmente em casos metastáticos, reforçando a necessidade urgente de novas abordagens capazes de superar a estes problemas (Shaham; Vij; Tripathi, 2025).

Nesse contexto, o desenvolvimento de novas moléculas citotóxicas com maior seletividade, potência e eficácia farmacológica tem atraído crescente atenção, com destaque para compostos metálicos obtidos por modificação ou substituição de ligantes, o que pode potencializar a atividade antitumoral e otimizar propriedades farmacocinéticas. Entre eles, os complexos de ditiocarbimato de índio(III) surgem como alternativas inovadoras para o tratamento do CCR, com potencial para superar limitações associadas aos fármacos atualmente disponíveis.

Em estudos prévios, conduzidos em colaboração com o Dr. Lucas Carvalho e o Prof. Eder Tavares, foram sintetizados seis complexos inéditos de sulfonilditiocarbimato de índio(III), dentre os quais o bis(*N*-metilsulfonilditiocarbimato)índio(III) de tetrafenilfosfônio (InFP) apresentou a maior citotoxicidade e seletividade para a linhagem de adenocarcinoma colorretal HCT-116, quando comparada a linhagens de melanoma (SK-MEL-28) e de adenocarcinoma de mama (MCF-7) (Carvalho et al., 2025). Considerando esse perfil de seletividade, optou-se por ampliar a investigação para diferentes linhagens de câncer colorretal, de forma a avaliar se o efeito observado era restrito à HCT-116 ou se se estendia a outros subtipos tumorais com origens genéticas distintas. Também, foi incluída a linhagem não tumoral de rim embrionário humano (HEK-293), para estimar o índice de seletividade (IS) do composto.

O ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) é um dos testes colorimétricos mais utilizados para avaliar citotoxicidade (Deepthi *et al.*, 2023). O ensaio de MTT baseia-se na utilização de um sal de tetrazólio amarelo e hidrossolúvel que, na presença de células metabolicamente ativas, é reduzido por enzimas mitocondriais, formando cristais de formazan, de cor púrpura e insolúveis em meio aquoso. A quantidade de formazan produzida é diretamente proporcional ao número de células viáveis presentes na amostra (Manimegalai *et al.*, 2023).

A partir das curvas de concentração-resposta por meio do ensaio de MTT, o InFP apresentou efeito citotóxico significativo em todas as linhagens de CCR testadas, sendo a HCT-116 a mais sensível em comparação às linhagens HT-29 e LoVo. Essa diferença pode ser atribuída à origem e às características genéticas e epigenéticas distintas de cada linhagem.

A HCT-116 foi isolada de um tumor primário localizado no cólon ascendente de um homem de 48 anos com CCR metastático (estadiamento TNM IV) (Brattain *et al.*, 1981a; Brattain *et al.*, 1981b; Eshleman *et al.*, 1995). A HT-29 também foi derivada de um tumor primário, mas de uma paciente de 44 anos com CCR em estágio III (TNM III) (Fogh *et al.*, 1975), estágio no qual o tumor já invade estruturas adjacentes e há envolvimento linfonodal, mas sem metástases distantes. Já a LoVo foi obtida a partir de metástases linfonodais na região supraclavicular de um homem de 56 anos (Drewinko *et al.*, 1976).

No trabalho de Ahmed *et al.* (2013), foi realizada uma caracterização abrangente de 24 linhagens de câncer colorretal, com foco em perfis genéticos e epigenéticos, avaliando fenótipos moleculares importantes, incluindo instabilidade de microssatélites (MSI), fenótipo de ilhas CpG metiladas (CIMP) e mutações em genes-chave relacionados à tumorigênese do CCR. Foi apontado que ambas, HCT-116 e LoVo, possuem uma alta MSI e a presença de CIMP, apesar de não apresentarem vias de instabilidade cromossômica (CIN). Em contraste, HT-29 possui microssatélites estáveis (MSS), ausência de CIMP e presença de CIN. Com relação aos genes mutados, HCT-116 e LoVo apresentam apenas mutações em KRAS (G13D para ambas e A14V para LoVo), enquanto HT-29 apresenta mutações em BRAF (V600E) e em TP53 (R273H).

O estudo molecular de células tumorais deve ser de grande relevância na pesquisa não-clínica, pois tais alterações influenciam diretamente na resposta aos

tratamentos desenvolvidos ou em desenvolvimento, não somente para determinar o mecanismo de ação, mas também associar a possíveis mecanismos de resistência que limitam a eficácia terapêutica e o uso clínico dos novos fármacos (Kotlarza et al., 2019; Azarian et al., 2024).

Assim, a maior sensibilidade da HCT-116 ao InFP pode estar relacionada ao seu perfil molecular, que a torna mais suscetível à ação de agentes citotóxicos, possivelmente pela combinação entre alta MSI e ausência de mutações em TP53, fatores que podem comprometer a capacidade de reparo do DNA e favorecer a indução de morte celular (Abd Aziz et al., 2023). A mutação em KRAS^{G13D} está envolvida em ativação constitutiva da sinalização proliferativa MAPK/ERK, o que torna as células cancerígenas independentes de outras vias para o crescimento e intrinsecamente resistente às terapias anti-EGFR, como o cetuximabe e panitumumabe, tornando linhagens celulares com essas mutações importantes para pesquisas, devido às limitações na terapêutica (Adachi-Fernandez et al., 2023). Também, diferenças no status mutacional de p53, levando a sua inibição, presente na linhagem HT-29, podem contribuir para a menor sensibilidade observada, visto que a p53 é a principal proteína associada na indução de morte celular por apoptose (Azarian et al., 2024 Nano; Montell, 2024).

Esses achados reforçam a importância da busca por novos quimioterápicos com estruturalmente inovadores e capazes de superar barreiras impostas pela heterogeneidade genética e pelos múltiplos mecanismos de resistência intrínseca presentes no CCR.

Complexos de índio(III) representam alternativas inovadoras com diversas aplicações médicas, cujas propriedades terapêuticas dependem primariamente do ligante coordenado ao metal (Ajiboye et al., 2024). Entre esses ligantes, os ditiocarbamatos destacam-se como grupos de coordenação versáteis, amplamente investigados por seu potencial anticâncer (Ajibade et al., 2020; Moghadam et al., 2023; Abdalrazaq et al., 2024; Castro et al., 2024; Chan; Ang; Hamid, 2024). O presente estudo constitui o primeiro relato da avaliação da atividade antitumoral de complexos de índio(III) contendo ditiocarbamatos.

Complexos de índio(III) com ácido piridinocarboxílico não apresentaram citotoxicidade em nenhuma linhagem tumoral testada (Rendošová et al., 2025). Ao avaliar complexos de índio(III) e zinco(II) com fenotiazinil porfirinas, Balázs e colaboradores (2025) demonstraram que a presença do In(III), não só foi mais

citotóxica que os complexos de Zn(II), como também potencializou o efeito citotóxico da porfirina não complexada em células de câncer de ovário, o que reforça a necessidade do estudo do papel dos complexos de índio na atividade antitumoral.

Complexos de platina com ditiocarbamatos avaliados em diferentes linhagens de câncer colorretal (HT-29 e HCT-116), mama (MCF-7) e pâncreas (Panc1), demonstrando maior citotoxicidade para esta última e que sua ação depende diretamente de interações com o DNA (Moghadam et al., 2023). Castro e colaboradores (2024) também avaliaram complexos de ditiocarbimatos de platina, identificando que essa interação ocorre por intercalação (inserção da molécula entre pares de bases adjacentes) e por ligação direta aos sulcos do DNA. Considerando que o InFP apresenta núcleo ditiocarbimato, tais achados sugerem que interações análogas possam estar envolvidas em sua atividade antitumoral, sendo necessários estudos confirmatórios para confirmar a hipótese.

Apesar de ser a forma de tratamento mais utilizada contra o câncer, a quimioterapia antineoplásica não é seletiva (Muhamad et al., 2018). Por ter como alvo moléculas comuns a todas as células e afetar processos essenciais à proliferação celular, esse tratamento também atinge diretamente células sadias de alta taxa proliferativa (Blagosklonny, 2023). Como consequência, pode causar mielotoxicidade, náuseas, vômitos ou diarreia, enquanto infusões contínuas podem levar à neurotoxicidade ou cardiotoxicidade (Singh; Kokkanti; Patnaik, 2025). Nesse contexto, o desenvolvimento de novas terapias seletivas para células tumorais é crucial para reduzir a toxicidade associada ao tratamento.

O estudo do IS é fundamental, pois permite avaliar a capacidade de um composto em inibir o crescimento de células tumorais com mínima toxicidade para células normais. Dessa forma, compostos com alto IS apresentam maior potencial de desenvolvimento como agentes antitumorais, uma vez que podem maximizar a eficácia terapêutica e reduzir efeitos colaterais.

Complexos de índio(III) com o lapachol, por exemplo, foram citotóxicos para diferentes linhagens de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB), porém não foram seletivos (De Carvalho et al., 2024). Ajibade e colaboradores (2020) avaliaram a citotoxicidade em duas linhagens tumorais (MRC5-SV2 e HeLa, câncer de pulmão e cervical, respectivamente) e em células não tumorais MRC5 (fibroblastos pulmonares), a fim de determinar o IS dos complexos de ditiocarbamato de manganês, cobre, zinco e platina. Ao comparar com a cisplatina (droga padrão), que apresentou

maior potência e seletividade ($IS = 1,7$), todos os complexos testados exibiram valores de Cl_{50} mais elevados para as linhagens tumorais e IS inferiores a 1,1, indicando menor eficácia antitumoral e ausência de seletividade relevante (Ajibade et al., 2020). No presente trabalho, o InFP apresentou baixa citotoxicidade para a linhagem não tumoral HEK-293, associada a maior atividade contra células HCT-116 de CCR, sugerindo potencial aplicação clínica. Essa performance é especialmente relevante quando comparada à doxorrubicina, fármaco amplamente utilizado na clínica e adotado como controle positivo na maioria dos ensaios *in vitro*, mas cuja citotoxicidade não é seletiva e cuja principal limitação é a cardiototoxicidade (Sousa et al., 2023).

Assim, com base nos resultados obtidos, a linhagem HCT-116 foi selecionada para os experimentos subsequentes de caracterização do efeito antitumoral do InFP. Considerando a Cl_{50} de $2,87 \pm 0,14 \mu\text{M}$ do composto após 72 horas de tratamento, foi utilizado o valor aproximado (3 μM), metade (1,5 μM) e o dobro (6 μM) da Cl_{50} e 48 horas de incubação para melhor avaliar o desencadeamento do processo citotóxico do composto em diferentes níveis de exposição.

A apoptose é o modo mais comum e mais bem descrito de morte celular programada, frequentemente considerada a “via padrão” de indução de morte celular pelos quimioterápicos (Brianna; Lee, 2023). A apoptose, uma vez iniciada, segue de forma contínua, sendo caracterizada por uma sequência de modificações bioquímicas e morfológicas. Tradicionalmente nos modelos *in vitro*, esse processo é dividido em duas fases: inicial e tardia. Na apoptose inicial, ocorre a ativação de caspases, responsáveis pela clivagem proteolítica de seus alvos específicos. Nesse estágio, os principais marcadores morfológicos incluem a condensação da cromatina e a picnose nuclear. Já na apoptose tardia, a ação continuada das caspases, associada à ativação de outros marcadores biológicos, leva a alterações mais drásticas, como fragmentação do núcleo, perda da integridade da membrana plasmática, formação de *blebs* e geração de corpos apoptóticos. Em um sistema multicelular, esses corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados, evitando a liberação de conteúdo intracelular e, consequentemente, prevenindo a indução de inflamação. Esse mecanismo contribui para a manutenção da integridade do tecido adjacente (Chesnokov et al., 2024; Souza et al., 2024).

Células cancerígenas possuem uma notável capacidade de contornar os mecanismos de morte celular e sobreviver a condições adversas no microambiente tumoral (Hanahan, 2022; Peng et al., 2022). Diante de diferentes tipos de estresse,

como danos ao DNA, escassez de recursos e terapias antineoplásicas, essas células desenvolveram diversas estratégias para evitar a morte, o que permite que o câncer prospere mesmo frente aos inúmeros desafios que enfrenta (Wang et al., 2022; Nano; Montell, 2024). Superar a resistência à apoptose tornou-se um dos principais focos da pesquisa oncológica, visando aumentar a eficácia das terapias atuais (Wang et al., 2022; Gharib; Robichaud, 2024).

Dentre as estratégias, a proteína p53 desempenha um papel central, exercendo diversas funções antitumorais. Sua ativação ocorre em resposta a diferentes formas de estresse celular, como danos ao DNA, hipoxia, senescência e processos de reparo genômico, promovendo a interrupção do ciclo celular para permitir a recuperação da célula ou, caso o dano seja irreparável, desencadear a apoptose, predominantemente pela via intrínseca (Orlandi et al., 2023). No CCR, mutações no gene *TP53* estão presentes em mais de 50% dos casos, comprometendo a função supressora tumoral (Gharib; Robichaud, 2024).

Nessa perspectiva, a detecção da apoptose constitui uma ferramenta fundamental no desenvolvimento de novos fármacos anticâncer. Para esse fim, diversas técnicas podem ser empregadas, incluindo a microscopia confocal a laser associada à marcação com laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP), bem como com Hoechst 34580 (HO348) (Atale et al., 2014; Ferreira, 2023; Marques, 2024). A microscopia confocal utiliza uma fonte de luz pontual gerada por lasers e sistemas ópticos que eliminam a luz desfocada, permitindo a excitação em comprimentos de onda específicos e a observação de regiões celulares restritas em resolução e contraste, essenciais para a avaliação morfológica e funcional de células em apoptose (Elliott, 2020; Jayamohan, 2022).

A análise das imagens obtidas após o tratamento das células HCT-116 com InFP e marcação por LA/IP revelou alterações morfológicas típicas das células em estágios de apoptose inicial e tardia, incluindo condensação da cromatina, formação de *blebs* de membrana e fragmentação do DNA. A susceptibilidade das células HCT-116 ao InFP pode estar relacionada a suas características genéticas descritas anteriormente, apesar de possuir uma mutação ativadora de KRAS, levando a uma sinalização proliferativa sustentada, o alto MSI e a ausência de mutações em TP53 possibilitam que ocorram mais danos no DNA, ativando a p53 e induzindo a apoptose.

A literatura é escassa com relação a investigação de complexos de In(III) e sua atividade pró-apoptótica. Apesar de existirem vários artigos demonstrando seu

potencial anticâncer, nenhum avaliou os mecanismos relacionados a esse mecanismo de citotoxicidade, portanto o presente trabalho relata de forma inédita esse resultado. Apesar disso, há relato de vários complexos metálicos de ditiocarbamato.

Alhoshani e colaboradores (2021), por exemplo, demonstraram em células MCF-7 que complexos de ditiocarbamato de ouro(III) induzem danos ao DNA dependente de concentração, reduzindo a capacidade da célula de evadir da morte celular, forcando a apoptose. Corroborando com os achados, complexos derivados de ditiocarbamato de bismuto(III) também foram capazes de induzir apoptose em células MCF-7 (Chan; Ang; Hamid, 2024). Os dados apresentados Sulaiman e colaboradores (2022) também vão de concordância com o presente estudo ao determinarem que complexos com diciclopentadieno e ditiocarbamato de platina(II) induziram apoptose tardia em linhagem de melanoma (CHL-1) dependente de concentração. Complexos de ditiocarbamato de zinco(II) e de ouro(II) induzem morte celular por apoptose em células tumorais a partir da inibição do proteassoma (Milacic et al., 2008; Tomasello et al., 2017).

Processos cruciais para a carcinogênese, como proliferação celular, a apoptose, a angiogênese e a motilidade, são regulados pelo sistema ubiquitina-proteassoma (UPS, do inglês *ubiquitin-proteasome system*). Esse sistema é um complexo multiproteico responsável por controlar a estabilidade e degradar centenas de proteínas na célula (Voutsadakis, 2008). No epitélio colorretal, o UPS participa da regulação da via de sinalização Wnt/β-catenina/APC, a qual coordena a proliferação das células epiteliais presentes no cólon. No CCR, mutações inativadoras no gene APC comprometem a capacidade do proteassoma de degradar a β-catenina, resultando em proliferação celular descontrolada. Além disso, outras moléculas-chave envolvidas na carcinogênese colorretal, como p53 e Kras, também são moduladas pelo UPS (Manasanch; Orlowski, 2017; Zagirova et al., 2021; Ma et al., 2025)

Inibidores do proteassoma, como bortezomibe, ixazomibe e carfilzomibe, são moléculas importantes no tratamento de alguns tipos de câncer, como linfoma e mieloma. Estudos recentes indicam que o uso de inibidores pode reduzir a resistência ao 5-FU no CCR (Ding et al., 2023). Nesse contexto, moléculas como os ditiocarbimatos também podem desempenhar um papel relevante, destacando-se o InFP como uma nova perspectiva terapêutica a ser explorada.

Assim, para corroborar a apoptose induzida pelo InFP, células de CCR foram expostas ao composto e analisadas por microscopia confocal a *laser*, utilizando o

corante intercalador de DNA, HO348. Como não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no total de células apoptóticas entre as concentrações de 3 e 6 μ M de InFP, optou-se por utilizar apenas as concentrações de 1,5 e 3 μ M nos experimentos subsequentes, que confirmaram a presença de alterações na topologia nuclear relacionadas com a apoptose. Diante destes resultados, pode-se inferir que o efeito antitumoral em células HCT-116 apresentado pelo composto InFP envolve a ativação da apoptose.

A apoptose em células de mamíferos pode ser classificada em duas vias principais: a via extrínseca e a via intrínseca. A via extrínseca é desencadeada pela ativação de receptores de morte na membrana plasmática, enquanto a via intrínseca ocorre independentemente de receptores (Nano; Montell, 2024). Na condição wild-type (selvagem), o TP53 atua como um regulador transcripcional-chave, ativando membros pró-apoptóticos da família Bcl-2, como Bax, em resposta a danos no DNA ou ao estresse oxidativo induzido por quimioterápicos. Essa ativação promove o aumento da permeabilização da membrana externa mitocondrial (MOMP), culminando na via intrínseca da apoptose por meio da liberação de moléculas como o citocromo c, que ativam a cascata de caspases e resultam na morte celular programada (Kim; Kin; Beck, 2024).

O JC-1 é um corante catiônico que em sua forma monomérica (livre) emite uma fluorescência verde. No interior da mitocôndria, dependendo do ambiente eletroquímico favorável da organela passa a formar agregados, que emitem uma fluorescência vermelha. A redução da razão entre os agregados e os monômeros do JC-1 indica comprometimento da membrana mitocondrial, perda do potencial e ativação da intrínseca da apoptose (Smiley *et al.*, 1991; Zaib *et al.*, 2022).

A análise da razão de fluorescência do corante JC-1 por microscopia confocal a laser demonstrou que o tratamento com o composto InFP induziu perda do potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em células de CCR. Esses dados sugerem que o InFP promove apoptose através da via intrínseca.

Dados da literatura corroboram com os dados obtidos, Balázs e colaboradores (2025) determinaram que complexos de In(III) com fenotiazinil porfirinas induziam um efeito citotóxico por alterar a função mitocondrial de células de câncer de ovário. Complexos de ditiocarbamato de ouro(I) induziram apoptose pela via intrínseca em células de câncer colorretal (caco-2) por meio da redução no $\Delta\Psi_m$, além disso, houve ativação de caspase-3, causando parada no ciclo celular em G1 e ativação da p53

(Quero et al., 2022). Também, complexos de ditiocarbamato de platina(II) ativou a via intrínseca da apoptose ao inibir a síntese de BCL-2, induz alterações no MOMP, o que libera o citocromo C, formando o apoptossomo e ativa as caspases 3 e 7 (Sulaiman et al., 2022), sugerindo mais uma vez o importante papel pró-apoptótico dos complexos metálicos de ditiocarbamato no CCR.

Notavelmente, Alhoshani e colaboradores (2021) concluíram que o aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) e o dano ao DNA causado por complexos de ditiocarbamato de ouro(II) levaram a despolarização da membrana mitocondrial, ativando a via intrínseca da apoptose. Evidências descritas na literatura indicam que complexos metálicos provavelmente exercem sua ação citotóxica por meio de alterações no estado redox celular, danos ao DNA, desregulação do ciclo celular e comprometimento da função mitocondrial, eventos que em conjunto culminam na ativação da apoptose (Sulaiman et al., 2022). Com essa premissa, foi avaliado o impacto do InFP sobre o estado redox das células HCT-116.

Em condições fisiológicas, a atividade metabólica das mitocôndrias gera ROS que, em concentrações basais, participam de processos de sinalização intra e extracelular, regulando proliferação, diferenciação e morte celular (Manoharan et al., 2024). Esse equilíbrio é mantido por um sistema antioxidante endógeno, cuja função é impedir o acúmulo de radicais, preservando a homeostase redox (Gao et al., 2020).

Quando há produção excessiva de ROS, geralmente associada à disfunção mitocondrial, esse equilíbrio é comprometido, resultando em estresse oxidativo. Nessa condição, as espécies reativas assumem múltiplos papéis, o que favorece a ativação de vias de sobrevivência, estimula a proliferação de células geneticamente instáveis, contribui para a progressão metastática e intensifica o dano genômico, ampliando a instabilidade cromossômica e a taxa mutacional (Hernansanz-Agustín; Enríquez, 2021; Cheung; Vousden, 2022).

No CCR, mutações em TP53 e KRAS atuam de forma cooperativa na formação tumoral, remodelando o metabolismo energético (efeito *Warburg*) e levando ao aumento direto e indireto dos níveis de ROS (Basak; Uddin; Hancock, 2020; Kealey et al., 2022; Zhong et al., 2022). As células malignas conseguem tolerar essa sobrecarga oxidativa ao intensificar a expressão de elementos antioxidantes. Tal adaptação redox está diretamente relacionada à quimiorresistência, inclusive frente a fármacos de primeira linha no tratamento do CCR, como 5-fluorouracil e oxaliplatina, ambos conhecidos por induzirem estresse oxidativo. Essa resistência se soma a

outros mecanismos, como maior expressão de transportadores de efluxo, instabilidade genômica e bloqueio de vias apoptóticas, frequentemente sustentados por concentrações aberrantes de ROS (Basak; Uddin; Hancock, 2020). Nesse cenário, terapias capazes de explorar a vulnerabilidade oxidativa das células tumorais e promover morte celular dependente de estresse oxidativo emergem como estratégias promissoras.

Assim, avaliou-se, por meio do ensaio do MTT, a citotoxicidade do composto InFP na ausência ou presença da N-acetilcisteína (NAC), um antioxidante. Observou-se que a NAC previne o efeito citotóxico induzido pelo InFP, indicando que o complexo de índio(III) induz citotoxicidade dependente de estresse oxidativo, que pode estar associada ao aumento na produção de ROS.

Esses dados vão de concordância com a literatura, visto que a citotoxicidade de complexos de ditiocarbamato de ouro(III) contendo bipiridinas induzida pelo aumento de ROS intracelular foi revertida na presença da NAC em células de câncer de próstata (PC-3) (Altaf et al., 2019). Também, Chan, Ang e Hamid (2021) ao avaliar o efeito de complexos de bismuto em MCF-7 concluíram que a apoptose ocorria pela via intrínseca, com a liberação do citocromo C e ativação da caspase 9, e que este processo era dependente de ROS. Curiosamente, ocorre o mesmo processo em linhagens de câncer de ovário (resistentes ou não a cisplatina, A2780cis e A2780, respectivamente) quando tratadas com complexos de ditiocarbamato de ouro(III). Os autores demonstraram que o efeito anticâncer do composto foi igual para ambas as linhagens, dependente do estresse oxidativo e não estava associado ao status mutacional de p53 (Altaf et al., 2017).

Como já mencionado, a proteína p53 exerce um papel central na resposta celular aos quimioterápicos, sendo um dos principais componentes da maquinaria de defesa frente ao estresse. Essa proteína pode modular a resposta redox, atuando de forma antioxidante ou pró-oxidante a depender da intensidade do estresse celular. Em condições de baixo estresse, p53 estimula mecanismos antioxidantes, enquanto níveis elevados desencadeiam uma resposta pró-oxidante (Zhou et al., 2023). Quero e colaboradores (2022) observaram que no CCR, a ativação de p53 estava associada ao estresse oxidativo induzido por um complexo de Au(I)-ditiocarbamato.

Uma importante enzima antioxidante modulada por p53 é a heme oxigenase-1 (HO-1) (Andrés et al., 2014; Fahrer et al., 2023). Com função protetora por neutralizar ROS, a indução de HO-1 é reconhecida como um dos mecanismos de adaptação das

células tumorais ao estresse oxidativo, permitindo a evasão da apoptose (Zhou et al., 2023). Complexos metálicos promoveram estresse oxidativo em células tumorais ao reduzir a expressão da HO-1 (Sulaiman et al., 2022). Nesse contexto, a superexpressão de HO-1 já foi associada ao aumento da quimiorresistência no CCR (Fahrer et al., 2023; Iqbal et al., 2024) e potenciais terapias capazes de inibir a expressão dessa enzima podem ser promissoras.

A adaptação das células tumorais ao estresse oxidativo contribui para a resistência à quimioterapia, estando associada a diferentes mecanismos relacionados à produção de ROS. Evidências indicam que níveis moderadamente elevados de ROS podem exercer efeito pró-tumorigênico ao interagir com diversas proteínas e vias de transdução de sinal intracelular envolvidas na proliferação e sobrevivência tumoral, como a via das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK) (Zhou et al., 2023).

As vias das MAPKs regulam diversas funções celulares, incluindo proliferação, diferenciação, migração e apoptose (Farooqia et al., 2019). Três das principais vias de MAPK são as cinases reguladas por sinal extracelular 1 e 2 (ERK1/2), as cinases N-terminais de c-Jun (JNKs) e a p38. No CCR, mutações em KRAS e BRAF resultam em ativação constitutiva da via ERK1/2, promovendo sinais de sobrevivência e proliferação celular, fenômeno associado a um prognóstico clínico desfavorável. Já as vias JNK e p38 estão envolvidas na resposta ao estresse celular (Yue; López, 2020; Timofeev et al., 2024). No contexto tumoral, tem sido relatado o papel dual dessas proteínas, podendo exercer funções tanto pró-tumorais quanto antitumorais, dependendo do tipo celular e do contexto fisiopatológico (Lu et al., 2020; Stefani et al., 2021).

Para a investigação sobre a modulação da atividade das MAPKs induzida pelo InFP, as células HCT-116 foram pré-incubadas com inibidores das MAPKs (iMAPKs), a fim de caracterizar o envolvimento da modulação das vias de sinalização dessas proteínas no efeito citotóxico do complexo de índio(III), utilizando o ensaio do MTT na presença ou ausência de iMAPKs: SP600125, inibidor de JNK1/2; U-126, inibidor de MEK/ERK1/2; e PD169416, inibidor de p38. Observou-se que o pré-tratamento com os inibidores de JNK1/2 e p38 potencializou o efeito citotóxico induzido pelo InFP, indicando que a modulação de vias de sinalização responsáveis pela resposta ao estresse nas células HCT-116 pode interferir na atividade anticâncer do complexo de ditiocarbimato de índio(III).

Embora estudos anteriores com complexos de ditiocarbamato de Cu(II) tenham indicado a participação de ROS e ativação de ERK1/2 e JNK em células não tumorais (Chen et al., 2010; Wu et al., 2012), a extração direta desses achados para o contexto tumoral é limitada, dado que a resposta de células tumorais à quimioterapia envolve mecanismos de sobrevivência muito mais complexos.

Esse resultado sugere que a ativação de JNK e p38, geralmente associada à resposta celular ao estresse, pode exercer em células tumorais um papel citoprotetor, principalmente pela indução de mecanismos de defesa antioxidante. De fato, já foi demonstrado que a sinalização via JNK/p38 está envolvida na regulação de fatores de transcrição como Fator Nuclear Eritroide 2 Relacionado ao Fator 2 (Nrf2), os quais modulam a expressão de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), catalase e HO-1, que limitam os efeitos deletérios do estresse oxidativo induzido por quimioterápicos (Sulaiman et al., 2022; Cai et al., 2023). Assim, a inibição farmacológica dessas cinases pode comprometer a capacidade adaptativa das células tumorais frente ao aumento de ROS desencadeado pelo InFP, resultando em maior acúmulo de dano oxidativo e, consequentemente, em maior morte celular.

Um número crescente de evidências indica que a ativação da via JNK está diretamente associada à resistência quimioterápica. Por exemplo, células-tronco de câncer pancreático apresentam níveis elevados de JNK, o que contribui para a resistência ao 5-fluorouracil (5-FU) e à gemcitabina (GEM) por meio da supressão da geração de ROS; a inibição de JNK restaura a sensibilidade a esses agentes, promovendo apoptose via acúmulo intracelular de ROS (Wu et al., 2018; Zhong et al., 2022; Yan et al., 2024; Timofeev et al., 2024). De forma semelhante, a inibição de JNK1 sensibiliza células de adenocarcinoma colorretal HT29 ao oxaliplatina, fenômeno associado à redução da autofagia e ativação da apoptose intrínseca (Vasilevskaya et al., 2016; Feng et al., 2017; Zhou et al., 2017). Esses dados sugerem que, embora as MAPKs JNK e p38 sejam classicamente relacionadas a processos de morte celular, sua ativação sustentada também pode induzir mecanismos de adaptação ao estresse oxidativo, favorecendo a sobrevivência tumoral.

Assim, os achados evidenciam que, em células HCT-116, as vias da JNK e p38 parecem contribuir para a manutenção da homeostase redox e, portanto, para a sobrevivência tumoral frente ao tratamento com InFP. A inibição dessas cinases, ao reduzir a capacidade antioxidante celular, potencializa os danos oxidativos induzidos

pelo complexo de índio(III), resultando em uma potencialização da resposta antitumoral.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

O complexo InFP demonstrou expressiva atividade antitumoral *in vitro* contra células de câncer colorretal (HCT-116), com elevada seletividade em relação a células não tumorais. Os resultados indicam que seu mecanismo de ação envolve a indução de apoptose, associada à perda do potencial de membrana mitocondrial, ao aumento do estresse oxidativo e, possivelmente, à modulação das vias das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs), em especial JNK e p38 que estão intimamente relacionadas aos processos de sobrevivência e morte celular. Esses achados reforçam o potencial do InFP como candidato promissor para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra células de câncer colorretal. Contudo, são necessárias investigações adicionais para confirmar e expandir esses resultados.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABDALRAZAQ, Eid A. et al. Zn (II) and Cd (II) complexes of dithiocarbamate ligands: synthesis, characterization, anticancer, and theoretical studies. **Journal of Sulfur Chemistry**, v. 45, n. 5, p. 714-739, 2024.
- ABEDIZADEH, Roya et al. Colorectal cancer: a comprehensive review of carcinogenesis, diagnosis, and novel strategies for classified treatments. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 43, n. 2, p. 729-753, 2024.
- AGUIRRE, Andrea R. et al. Cytotoxic effects of indium (III) complexes with 2-acetylpyridine-N (4)-ortho-fluorophenylthiosemicarbazone and their radioactive ¹¹⁴mln analogues against human glioma cells. **Polyhedron**, v. 164, p. 219-227, 2019.
- AIDERUS, Aziz; BARKER, Nick; TERGAONKAR, Vinay. Serrated colorectal cancer: preclinical models and molecular pathways. **Trends in Cancer**, v. 10, n. 1, p. 76-91, 2024.
- AJIBADE, Peter A.; FATOKUN, Amos A.; ANDREW, Fartisinch P. Synthesis, characterization and anti-cancer studies of Mn (II), Cu (II), Zn (II) and Pt (II) dithiocarbamate complexes-crystal structures of the Cu (II) and Pt (II) complexes. **Inorganica Chimica Acta**, v. 504, p. 119431, 2020.
- AJIBOYE, Jubilee et al. Identification of potent and orally efficacious phosphodiesterase inhibitors in Cryptosporidium parvum-infected immunocompromised male mice. **Nature Communications**, v. 15, n. 1, p. 8272, 2024.
- AJIBOYE, Titilope Tinu; AJIBOYE, Timothy Oladiran; BABALOLA, Olubukola Oluranti. Impacts of binary oxide nanoparticles on the soybean plant and its rhizosphere, associated phytohormones, and enzymes. **Molecules**, v. 28, n. 3, p. 1326, 2023.
- ALHOSHANI, Ali et al. Anticancer activity and apoptosis induction of gold (III) complexes containing 2, 2'-bipyridine-3, 3'-dicarboxylic acid and dithiocarbamates. **Molecules**, v. 26, n. 13, p. 3973, 2021.
- ALTAF, Muhammad et al. New bipyridine gold (III) dithiocarbamate-containing complexes exerted a potent anticancer activity against cisplatin-resistant cancer cells independent of p53 status. **Oncotarget**, v. 8, n. 1, p. 490, 2017.
- ALTAF, Muhammad et al. Potent in vitro and in vivo anticancer activity of new bipyridine and bipyrimidine gold (III) dithiocarbamate derivatives. **Cancers**, v. 11, n. 4, p. 474, 2019.
- AMBROSINI, Margherita et al. Epidemiology, pathogenesis, biology and evolving management of MSI-H/dMMR cancers. **Nature Reviews Clinical Oncology**, p. 1-23, 2025.

ANDRÉS, Nancy Carolina et al. Heme oxygenase-1 has antitumoral effects in colorectal cancer: Involvement of p53. **Experimental and molecular pathology**, v. 97, n. 3, p. 321-331, 2014.

AOUN, Rami James N.; KALADY, Matthew F. Hereditary Colorectal Cancer: From Diagnosis to Surgical Options. **Clinics in Colon and Rectal Surgery**, v. 38, n. 03, p. 179-190, 2025.

ARROWSMITH, Rory L. et al. Fluorescent gallium and indium bis (thiosemicarbazones) and their radiolabelled analogues: Synthesis, structures and cellular confocal fluorescence imaging investigations. **Dalton Transactions**, v. 40, n. 23, p. 6238-6252, 2011.

AVELAR-BARRAGAN, Julio et al. Distinct colon mucosa microbiomes associated with tubular adenomas and serrated polyps. **npj Biofilms and Microbiomes**, v. 8, n. 1, p. 69, 2022.

BAJJU, Gauri D. et al. Synthesis and spectroscopic characterization of some new axially ligated indium (III) macrocyclic complexes and their biological activities. **Bioinorganic chemistry and applications**, v. 2014, n. 1, p. 865407, 2014.

BALÁZS, Brém et al. meso-Substituted AB 3-type phenothiazinyl porphyrins and their indium and zinc complexes photosensitising properties, cytotoxicity and phototoxicity on ovarian cancer cells. **RSC Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 2, p. 747-766, 2025.

BASAK, Debasish; UDDIN, Mohammad Nasir; HANCOCK, Jake. The role of oxidative stress and its counteractive utility in colorectal cancer (CRC). **Cancers**, v. 12, n. 11, p. 3336, 2020.

BOCK, Florian J.; TAIT, Stephen WG. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 21, n. 2, p. 85-100, 2020.

BONIS, Vangelis; ROSELL, Carla; GEHART, Helmuth. The intestinal epithelium–fluid fate and rigid structure from crypt bottom to villus tip. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 9, p. 661931, 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS – CONITEC. *Monitoramento do horizonte tecnológico: medicamentos para tratamento de primeira linha do câncer colorretal metastático*. Informe MHT nº 02/2022. Brasília: CONITEC, 2022. Disponível em: https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/radar/2022/informemht_cancercolorretalmetastatico_final_022022.pdf. Acesso em: 7 ago. 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação-Geral de Gestão de Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas. *Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas: Adenocarcinoma de cólon e reto*. Brasília: Ministério da Saúde, 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/conitec/pt-br>. Acesso em: 25 jul. 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 958, de 26 de setembro de 2014.** Aprova as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Câncer de Côlon e Reto. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, n. 187, p. 38-39, 29 set. 2014.

BRATTAIN, M. G. et al. Initiation and characterization of cultures of human colonic carcinoma with different biological characteristics utilizing feeder layers of confluent fibroblasts. **Oncodevelopmental biology and medicine: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 2, n. 5, p. 355-366, 1981.

BRATTAIN, Michael G. et al. Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. **Cancer research**, v. 41, n. 5, p. 1751-1756, 1981.

BRAY, Freddie et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 74, n. 3, p. 229-263, 2024.

BREEKVELDT, Emilie CH et al. Colorectal cancer incidence, mortality, tumour characteristics, and treatment before and after introduction of the faecal immunochemical testing-based screening programme in the Netherlands: a population-based study. **The Lancet Gastroenterology & hepatology**, v. 7, n. 1, p. 60-68, 2022.

BUGANO, Diogo Diniz Gomes et al. Brazil-TNT: A randomized phase 2 trial of neoadjuvant chemoradiation followed by FOLFIRINOX versus chemoradiation for stage II/III rectal cancer. **Clinical Colorectal Cancer**, v. 23, n. 3, p. 238-244, 2024.

CAÑELLAS-SOCIAS, Adrià; SANCHO, Elena; BATLLE, Eduard. Mechanisms of metastatic colorectal cancer. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 21, n. 9, p. 609-625, 2024.

CARVALHO, Lucas Raposo et al. In (iii) complexes of sulfonyldithiocarbimates as selective antineoplastic agents against human colorectal adenocarcinoma. **Dalton Transactions**, v. 54, n. 29, p. 11207-11224, 2025.

CASTRO, Rodrigo A. et al. Platinum Dithiocarbimates as Potential Candidates for Drug Development: Interactions with Double-Stranded DNA. **Available at SSRN 4791213**, 2024.

CHAN, Pit Foong; ANG, Kok Pian; HAMID, Roslida Abd. A bismuth diethyldithiocarbamate compound induced apoptosis via mitochondria-dependent pathway and suppressed invasion in MCF-7 breast cancer cells. **BioMetals**, v. 34, n. 2, p. 365-391, 2021.

CHAN, Pit Foong; ANG, Kok Pian; HAMID, Roslida Abd. Cytotoxicity of bismuth (III) dithiocarbamate derivatives by promoting a mitochondrial-dependent apoptotic pathway and suppressing MCF-7 breast adenocarcinoma cell invasion. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 29, n. 2, p. 217-241, 2024.

CHAN, Pit Foong; ANG, Kok Pian; HAMID, Roslida Abd. Cytotoxicity of bismuth (III) dithiocarbamate derivatives by promoting a mitochondrial-dependent apoptotic pathway and suppressing MCF-7 breast adenocarcinoma cell invasion. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 29, n. 2, p. 217-241, 2024.

CHEN, Bob et al. Differential pre-malignant programs and microenvironment chart distinct paths to malignancy in human colorectal polyps. **Cell**, v. 184, n. 26, p. 6262-6280. e26, 2021.

CHEUNG, Eric C.; VOUSDEN, Karen H. The role of ROS in tumour development and progression. **Nature Reviews Cancer**, v. 22, n. 5, p. 280-297, 2022.

CHOI, Jiahn; AUGENLICHT, Leonard H. Intestinal stem cells: guardians of homeostasis in health and aging amid environmental challenges. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 56, n. 3, p. 495-500, 2024.

CHU, Tianhao et al. Phillygenin regulates the colorectal cancer tumor microenvironment by inhibiting hypoxia-inducible factor 1 alpha. **Cytotechnology**, v. 77, n. 1, p. 17, 2025.

CIARDIELLO, Fortunato et al. Clinical management of metastatic colorectal cancer in the era of precision medicine. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 72, n. 4, p. 372-401, 2022.

D'ARCY, Mark S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell biology international**, v. 43, n. 6, p. 582-592, 2019.

DASARI, Arvind et al. Fruquintinib versus placebo in patients with refractory metastatic colorectal cancer (FRESCO-2): an international, multicentre, randomised, double-blind, phase 3 study. **The Lancet**, v. 402, n. 10395, p. 41-53, 2023.

DEEPTHI, S. et al. X-ray/gamma absorption and Anticancer Properties of Fe2O3 nanoparticles. **Physics Open**, v. 17, p. 100188, 2023.

DISTRITO FEDERAL. Secretaria de Estado de Saúde. Comissão Permanente de Protocolos de Atenção à Saúde. **Protocolo de atenção à saúde: protocolo de ação programática no câncer colorretal – prevenção e rastreamento**. Brasília, DF: ASCCAN, 2025. (Portaria SES-DF nº 136, de 15 de abril de 2025, publicada no DODF nº 73, de 16 abr. 2025). Disponível em: https://saude.df.gov.br/documents/37101/0/Protocolo+de+A%C3%A7%C3%A3o+Programatica+no+C%C3%A2ncer+Colorretal_Preven%C3%A7%C3%A3o+e+Rastreamento.pdf/40c9872e-5690-90a7-644d-a59ca5009ad8?t=1744819927721. Acesso em: 25 jul. 2025.

DREWINKO, B. et al. Establishment of a human carcinoembryonic antigen-producing colon adenocarcinoma cell line. **Cancer research**, v. 36, n. 2_Part_1, p. 467-475, 1976.

DUNNE, Philip D.; ARENDS, Mark J. Molecular pathological classification of colorectal cancer—an update. **Virchows Archiv**, v. 484, n. 2, p. 273-285, 2024.

ELLIOTT, Amicia D. Confocal microscopy: principles and modern practices. **Current protocols in cytometry**, v. 92, n. 1, p. e68, 2020.

Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2017.

FAHRER, Jörg et al. Heme oxygenase-1 and its role in colorectal cancer. **Antioxidants**, v. 12, n. 11, p. 1989, 2023.

FAROOQI, Ammad Ahmad et al. Overview of the oncogenic signaling pathways in colorectal cancer: Mechanistic insights. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2019. p. 65-79.

FEARON, Eric R.; VOGELSTEIN, Bert. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **cell**, v. 61, n. 5, p. 759-767, 1990.

FENG, Xiaomin et al. Annexin A2 contributes to cisplatin resistance by activation of JNK-p53 pathway in non-small cell lung cancer cells. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 36, n. 1, p. 123, 2017.

FERNÁNDEZ-MONTES, A. et al. Safety and efficacy of encorafenib–cetuximab combination in BRAFV600E-mutated metastatic colorectal cancer: real-world evidence from the CONFIDENCE Spanish multicenter study. **ESMO Real World Data and Digital Oncology**, v. 5, p. 100055, 2024.

FERRARO, Maria Grazia et al. Triple negative breast cancer preclinical therapeutic management by a cationic ruthenium-based nucleolipid nanosystem. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 7, p. 6473, 2023.

FOGH, Jørgen. Human tumor lines for cancer research. **Cancer investigation**, v. 4, n. 2, p. 157-184, 1986.

GACH-JANCZAK, Katarzyna et al. Historical perspective and current trends in anticancer drug development. **Cancers**, v. 16, n. 10, p. 1878, 2024.

GAO, Lixia et al. Targeting ROS-mediated crosstalk between autophagy and apoptosis in cancer. **Reviews on new drug targets in age-related disorders**, p. 1-12, 2020.

GARCÍA-HERNÁNDEZ, Laura et al. The p38 MAPK components and modulators as biomarkers and molecular targets in cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 1, p. 370, 2021.

GHARIB, Ehsan; ROBICHAUD, Gilles A. From crypts to cancer: a holistic perspective on colorectal carcinogenesis and therapeutic strategies. **International journal of molecular sciences**, v. 25, n. 17, p. 9463, 2024.

GIACOMELLO, Marta et al. The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 21, n. 4, p. 204-224, 2020.

GREEN, David E. et al. Carbohydrate-bearing 3-hydroxy-4-pyridinonato complexes of gallium (III) and indium (III). **Bioconjugate chemistry**, v. 16, n. 6, p. 1597-1609, 2005.

GUINNEY, Justin et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. **Nature medicine**, v. 21, n. 11, p. 1350-1356, 2015.

HAMID, Omid et al. Phase I study of fianlimab, a human lymphocyte activation gene-3 (LAG-3) monoclonal antibody, in combination with cemiplimab in advanced melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 42, n. 24, p. 2928-2938, 2024.

HANAHAN, Douglas. Hallmarks of cancer: new dimensions. **Cancer discovery**, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HE, Ying et al. PTPN23-dependent activation of PI3KC2α is a therapeutic vulnerability of BRAF-mutant cancers. **Journal of Experimental Medicine**, v. 222, n. 3, p. e20241147, 2025.

HERNANDEZ DOMINGUEZ, Oscar; YILMAZ, Sumeyye; STEELE, Scott R. Stage IV colorectal cancer management and treatment. **Journal of Clinical Medicine**, v. 12, n. 5, p. 2072, 2023.

HILDEBRANDT, Jana et al. Novel nickel (II), palladium (II), and platinum (II) complexes with O, S bidendate cinnamic acid ester derivatives: An in vitro cytotoxic comparison to ruthenium (II) and osmium (II) analogues. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 12, p. 6669, 2022.

HUA, Shixian et al. Multifunctional platinum (IV) complexes as immunostimulatory agents to promote cancer immunochemotherapy by inhibiting tryptophan-2, 3-dioxygenase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 169, p. 29-41, 2019.

HUSSEIN, Hadil S. et al. Anticancer potential of silver nanoparticles biosynthesized using Catharanthus roseus leaves extract on cervical (HeLa229) cancer cell line. **Scientific African**, v. 25, p. e02268, 2024.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Incidência de câncer no Brasil – estimativa 2023. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023.pdf>

IQBAL, Muhammad Javed et al. Interplay of oxidative stress, cellular communication and signaling pathways in cancer. **Cell Communication and Signaling**, v. 22, n. 1, p. 7, 2024.

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/JSTD_23_2022.

JIANG, Miao et al. Safety and efficacy of an anti-human APC antibody for prophylaxis of congenital factor deficiencies in preclinical models. **Blood**, v. 142, n. 12, p. 1071-1081, 2023.

KAZIMIR, Aleksandr et al. Exploring Raloxifene-Based Metallodrugs: A Versatile Vector Combined with Platinum (II), Palladium (II) and Nickel (II) Dichlorides and Carborates against Triple-Negative Breast Cancer. **ChemMedChem**, v. 19, n. 14, p. e202400006, 2024.

KCIUK, Mateusz et al. Metastasis and MAPK pathways. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 7, p. 3847, 2022.

KEALEY, James et al. Effect of TP53 deficiency and KRAS signaling on the bioenergetics of colon cancer cells in response to different substrates: A single cell study. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, p. 893677, 2022.

KIM, Jin Cheon; BODMER, Walter F. Genomic landscape of colorectal carcinogenesis. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 148, n. 3, p. 533-545, 2022.

LA VECCHIA, Marta et al. Genetics, diet, microbiota, and metabolome: partners in crime for colon carcinogenesis. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 24, n. 1, p. 248, 2024.

LI, Liu-Bo et al. A systematic analysis of the global and regional burden of colon and rectum cancer and the difference between early-and late-onset CRC from 1990 to 2019. **Frontiers in Oncology**, v. 13, p. 1102673, 2023.

LICHTENSTERN, Charles Robert et al. Immunotherapy, inflammation and colorectal cancer. **Cells**, v. 9, n. 3, p. 618, 2020.

LIU, Zhikun et al. Targeting RAS-RAF pathway significantly improves antitumor activity of Rigosertib-derived platinum (IV) complexes and overcomes cisplatin resistance. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 194, p. 112269, 2020.

LUCACIU, Roxana Liana et al. Metallo-drugs in cancer therapy: Past, present and future. **Molecules**, v. 27, n. 19, p. 6485, 2022.

MA, Huailu et al. USP25 maintains KRAS expression and inhibiting the deubiquitinase suppresses KRAS signaling in human cancer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 301, n. 7, 2025.

MA, Huiying et al. Pathology and genetics of hereditary colorectal cancer. **Pathology**, v. 50, n. 1, p. 49-59, 2018.

MA, Yan; NICOLET, Jade. Specificity models in MAPK cascade signaling. **FEBS Open Bio**, v. 13, n. 7, p. 1177-1192, 2023.

MAIK-RACHLINE, Galia; WORTZEL, Inbal; SEGER, Rony. Alternative splicing of MAPKs in the regulation of signaling specificity. **Cells**, v. 10, n. 12, p. 3466, 2021.

MANASANCH, Elisabet E.; ORLOWSKI, Robert Z. Proteasome inhibitors in cancer therapy. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 14, n. 7, p. 417-433, 2017.

MANOHARAN, Renuka Ramalingam *et al.* ROS signaling in innate immunity via oxidative protein modifications. **Frontiers in Immunology**, v. 15, p. 1359600, 2024.

MARTÍN-GARCÍA, Desirée; GARCÍA-ARANDA, Marilina; REDONDO, Maximino. Biomarker identification through proteomics in colorectal cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 4, p. 2283, 2024.

MARYŃCZAK, Kasper *et al.* Colitis-associated colorectal cancer in patients with inflammatory bowel diseases in a tertiary referral center: A propensity score matching analysis. **Journal of clinical medicine**, v. 11, n. 3, p. 866, 2022.

MARYŃCZAK, Kasper *et al.* Colitis-associated colorectal cancer in patients with inflammatory bowel diseases in a tertiary referral center: A propensity score matching analysis. **Journal of clinical medicine**, v. 11, n. 3, p. 866, 2022.

MATSUDA, Takahisa; FUJIMOTO, Ai; IGARASHI, Yoshinori. Colorectal cancer: epidemiology, risk factors, and public health strategies. **Digestion**, v. 106, n. 2, p. 91-99, 2025.

MILACIC, Vesna *et al.* Pyrrolidine dithiocarbamate-zinc (II) and-copper (II) complexes induce apoptosis in tumor cells by inhibiting the proteasomal activity. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 231, n. 1, p. 24-33, 2008.

MOGHADAM, Mahboube Eslami *et al.* New anticancer potential Pt complex with tertamyl dithiocarbamate ligand: Synthesis, DNA targeting behavior, molecular dynamic, and biological activity. **Journal of Molecular Liquids**, v. 379, p. 121651, 2023.

MONK, Bradley J. *et al.* A phase II evaluation of elesclomol sodium and weekly paclitaxel in the treatment of recurrent or persistent platinum-resistant ovarian, fallopian tube or primary peritoneal cancer: An NRG oncology/gynecologic oncology group study. **Gynecologic oncology**, v. 151, n. 3, p. 422-427, 2018.

MORANA, Ornella; WOOD, Will; GREGORY, Christopher D. The apoptosis paradox in cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 3, p. 1328, 2022.

MORGAN, Eileen *et al.* The current and future incidence and mortality of gastric cancer in 185 countries, 2020–40: a population-based modelling study. **EClinicalMedicine**, v. 47, 2022.

MORTEZAE, Keywan. WNT/β-catenin regulatory roles on PD-(L) 1 and immunotherapy responses. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 24, n. 1, p. 15, 2024.

MOSELE, M. F. et al. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with advanced cancer in 2024: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. **Annals of Oncology**, v. 35, n. 7, p. 588-606, 2024.

MUÑOZ, César et al. Phase 2, Multicenter, Open-label, Nonrandomized Study of Neoadjuvant Chemotherapy Liposomal Irinotecan With 5-Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin, Followed by Chemoradiotherapy in Patients With Rectal Cancer in a Watch-and-Wait Program. **American Journal of Clinical Oncology**, v. 48, n. 3, p. 142-147, 2025.

MUNTEANU, Camelia; SCHWARTZ, Betty. Interactions between dietary antioxidants, dietary Fiber and the gut microbiome: their putative role in inflammation and Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 15, p. 8250, 2024.

MURPHY, Caitlin C.; ZAKI, Timothy A. Changing epidemiology of colorectal cancer—birth cohort effects and emerging risk factors. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 21, n. 1, p. 25-34, 2024.

NAKANISHI, Yuki; DIAZ-MECO, Maria T.; MOSCAT, Jorge. Serrated colorectal cancer: the road less travelled?. **Trends in cancer**, v. 5, n. 11, p. 742-754, 2019.

O'BRIEN, Michael J.; GIBBONS, David. The adenoma-carcinoma sequence in colorectal neoplasia. **Surgical oncology clinics of North America**, v. 5, n. 3, p. 513-530, 1996.

OLIVEIRA, Alexandre A. et al. Cytotoxic and antimicrobial effects of indium (III) complexes with 2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazones. **Dalton Transactions**, v. 46, n. 3, p. 918-932, 2017.

ORLANDI, Giulia et al. Different roles of apoptosis and autophagy in the development of human colorectal cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 12, p. 10201, 2023.

PALDINO, Emanuela et al. Tumor initiating cells and chemoresistance: which is the best strategy to target colon cancer stem cells?. **BioMed research international**, v. 2014, n. 1, p. 859871, 2014.

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**, v. 1877, n. 3, p. 188736, 2022.

PENG, Fu et al. Regulated cell death (RCD) in cancer: key pathways and targeted therapies. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 7, n. 1, p. 286, 2022.

PERMAIN, Jessica et al. Functional links between the microbiome and the molecular pathways of colorectal carcinogenesis. **Cancer and metastasis reviews**, v. 43, n. 4, p. 1463-1474, 2024.

PINHEIRO, Marina; MOREIRA, David Nascimento; GHIDINI, Michele. Colon and rectal cancer: An emergent public health problem. **World journal of gastroenterology**, v. 30, n. 7, p. 644, 2024.

QUERO, Javier et al. Sulfonamide-derived dithiocarbamate gold (I) complexes induce the apoptosis of colon cancer cells by the activation of caspase 3 and redox imbalance. **Biomedicines**, v. 10, n. 6, p. 1437, 2022.

SABATINO, Susan A. Cancer screening test receipt—United States, 2018. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 70, 2021.

SADIEN, Iannish D. et al. Polyclonality overcomes fitness barriers in Apc-driven tumorigenesis. **Nature**, v. 634, n. 8036, p. 1196-1203, 2024.

SAHIN, Ibrahim Halil et al. Neoadjuvant immune checkpoint inhibitor therapy for patients with microsatellite instability-high colorectal cancer: shedding light on the future. **JCO oncology practice**, v. 19, n. 5, p. 251-259, 2023.

SAINI, M. K. et al. Preparation, Characterization and Antimicrobial Properties of Some Indium (III) And Thallium (I) Complexes with Active Schiff Base Ligands. **Main Group Metal Chemistry**, v. 32, n. 4, p. 203-216, 2009.

SALVA DE TORRES, Clara et al. Current and emerging treatment paradigms in colorectal cancer: integrating hallmarks of Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 13, p. 6967, 2024.

SEPPÄLÄ, Toni T.; BURKHART, Richard A.; KATONA, Bryson W. Hereditary colorectal, gastric, and pancreatic cancer: comprehensive review. **BJS open**, v. 7, n. 3, p. zrad023, 2023.

SETHY, Chinmayee; KUNDU, Chanakya Nath. 5-Fluorouracil (5-FU) resistance and the new strategy to enhance the sensitivity against cancer: Implication of DNA repair inhibition. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 137, p. 111285, 2021.

SHAHAM, Salique H.; VIJ, Puneet; TRIPATHI, Manish K. Advances in Targeted and Chemotherapeutic Strategies for Colorectal Cancer: Current Insights and Future Directions. **Biomedicines**, v. 13, n. 3, p. 642, 2025.

SHEN, Yuefan et al. Polygenic risk score, healthy lifestyle score, and colorectal cancer risk: A prospective cohort study. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 34, n. 2, p. 290-297, 2025.

SINGH, Ursheetta; KOKKANTI, Rekha Rani; PATNAIK, Srinivas. Beyond chemotherapy: Exploring 5-FU resistance and stemness in colorectal cancer. **European Journal of Pharmacology**, p. 177294, 2025.

SMILEY S. T. et al. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 9, p. 3671-3675, 1991.

SMITH, Kristen S. et al. Acute cancer-related symptoms and concerns among patients receiving chemotherapy: current state of the science. **Supportive Care in Cancer**, v. 32, n. 3, p. 184, 2024.

SVEC, Jiri; ONHAJZER, Jakub; KORINEK, Vladimir. Origin, development and therapy of colorectal cancer from the perspective of a biologist and an oncologist. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 204, p. 104544, 2024.

TABERNERO, Josep et al. Encorafenib plus cetuximab as a new standard of care for previously treated BRAF V600E-mutant metastatic colorectal cancer: updated survival results and subgroup analyses from the BEACON study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 39, n. 4, p. 273-284, 2021.

TAI, Yan-Xue et al. Cadmium (II) and indium (III) complexes derived from 2-benzoylpyridine N (4)-cyclohexylthiosemicarbazone: Synthesis, crystal structures, spectroscopic characterization and cytotoxicity. **Synthetic Metals**, v. 219, p. 109-114, 2016.

TESTA, Ugo; PELOSI, Elvira; CASTELLI, Germana. Colorectal cancer: genetic abnormalities, tumor progression, tumor heterogeneity, clonal evolution and tumor-initiating cells. **Medical Sciences**, v. 6, n. 2, p. 31, 2018.

TIMOFEV, Oleg et al. ERK pathway agonism for cancer therapy: evidence, insights, and a target discovery framework. **npj Precision Oncology**, v. 8, n. 1, p. 70, 2024.

TOMASELLO, Marianna F. et al. New comprehensive studies of a gold (III) Dithiocarbamate complex with proven anticancer properties: Aqueous dissolution with cyclodextrins, pharmacokinetics and upstream inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 138, p. 115-127, 2017.

TOMASELLO, Marianna F. et al. New comprehensive studies of a gold (III) Dithiocarbamate complex with proven anticancer properties: Aqueous dissolution with cyclodextrins, pharmacokinetics and upstream inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 138, p. 115-127, 2017.

VASILEVSKAYA, Irina A. et al. JNK1 inhibition attenuates hypoxia-induced autophagy and sensitizes to chemotherapy. **Molecular Cancer Research**, v. 14, n. 8, p. 753-763, 2016.

VELEZ LOPEZ, Alejandro et al. Microbiota-derived butyrate dampens linaclotide stimulation of the guanylate cyclase C pathway in patient-derived colonoids. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 35, n. 12, p. e14681, 2023.

VOUTSADAKIS, Ioannis A. The ubiquitin-proteasome system in colorectal cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1782, n. 12, p. 800-808, 2008.

WANG, Jian et al. Predictive factors for efficacy of oxaliplatin-based chemotherapy in advanced well-differentiated neuroendocrine tumors: an observational cohort study and meta-analysis. **Frontiers in Endocrinology**, v. 16, p. 1595151, 2025.

Wang, X.; Hua, P.; He, C.; Chen, M. Non-apoptotic cell death-based cancer therapy: Molecular mechanism, pharmacological modulators, and nanomedicine. *Acta Pharm. Sin. B* 2022, 12, 3567–3593.

WEINBERG, R. A. et al. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

WU, Pui-Kei; BECKER, Andrew; PARK, Jong-In. Growth inhibitory signaling of the Raf/MEK/ERK pathway. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 15, p. 5436, 2020.

XUE, Chen et al. Wnt signaling pathways in biology and disease: mechanisms and therapeutic advances. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 10, n. 1, p. 106, 2025.

YAMADA, Atsushi; KONDO, Tomohiro. Hereditary Colorectal Cancer: Clinical Implications of Genomic Medicine and Precision Oncology. **Journal of the Anus, Rectum and Colon**, v. 9, n. 2, p. 167-178, 2025.

YAN, G. E.; ELBADAWI, Mohamed; EFFERTH, Thomas. Multiple cell death modalities and their key features. **World Academy of Sciences Journal**, v. 2, n. 2, p. 39-48, 2020.

YANG, Soo-Ryun et al. Microsatellite instability and mismatch repair deficiency define a distinct subset of lung cancers characterized by smoking exposure, high tumor mutational burden, and recurrent somatic MLH1 inactivation. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 19, n. 3, p. 409-424, 2024.

YU, Hongyao; HEMMINKI, Kari. Genetic epidemiology of colorectal cancer and associated cancers. **Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 207-219, 2020.

YUE, Jicheng; LÓPEZ, José M. Understanding MAPK signaling pathways in apoptosis. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 7, p. 2346, 2020.

Zagirova D., Autenried R., Nelson ME., K Rezvani. Proteasome complexes and their heterogeneity in colorectal, breast and pancreatic cancers. **Journal of Cancer**, v. 12, n. 9, p. 2472, 2021.

ZAIB, S. et al. A meta-analysis and experimental data for multidrug resistance genes in breast cancer. **African Health Sciences**, v. 22, n. 4, p. 1-9, 2022.

ZHANG, Zhenlei et al. Developing a novel indium (III) agent based on human serum albumin nanoparticles: integrating bioimaging and therapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 65, n. 7, p. 5392-5406, 2022.

ZHOU, Lin et al. Natural products modulating MAPK for CRC treatment: A promising strategy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 16, p. 1514486, 2025.

ZHOU, Xiaoting et al. Molecular mechanisms of ROS-modulated cancer chemoresistance and therapeutic strategies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 165, p. 115036, 2023.

ZHOU, Yongan et al. 37LRP induces invasion in hypoxic lung adenocarcinoma cancer cells A549 through the JNK/ERK/c-Jun signaling cascade. **Tumor Biology**, v. 39, n. 6, p. 1010428317701655, 2017.

Anexos

Luísa De Melo Xavier, Ana ; **Ramos Marques De Souza, Ramon** ; Morais De Meideiros Ramalho, Izola ; Nascimento, Yuri Mangueira Do ; Leite Ferreira, Maria Denise ; Ponciano Goulart De Lima Damasceno, Bolívar ; Sobral, Marianna Vieira ; Sampaio, Fábio Correira . Pink pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) essential oil: phytochemical composition and cytotoxic activity. NATURAL PRODUCTS RESEARCH, v. 0000, p. 1-7, 2023.

Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14786419.2023.2283756>

NATURAL PRODUCT RESEARCH
2025, VOL. 39, NO. 7, 1910-1916
<https://doi.org/10.1080/14786419.2023.2283756>



Check for updates

Pink pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) essential oil: phytochemical composition and cytotoxic activity

Mysrayn Yargo de Freitas Araújo Reis^a, Ana Luísa de Melo Xavier^a, Ramon Ramos Marques de Souza^b, Izola Moraes de Meideiros Ramalho^c, Yuri Mangueira do Nascimento^d , Maria Denise Leite Ferreira^d, Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno^e, Marianna Vieira Sobral^b and Fábio Correira Sampaio^a

^aOral Biology Laboratory, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil; ^bGraduate Program in Natural Products and Bioactive Synthetics, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil; ^cDepartment of Internal Medicine, Carver College of Medicine, University of IA, Iowa City, IA, USA; ^dMultiuser Characterization and Analysis Laboratory, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil; ^ePharmaceutical Product Development and Characterization Laboratory, State University of Paraíba, Campina Grande, Brazil

ABSTRACT

Pink pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) is a native species native from Central and South America that produces an essential oil (EOpp) with promising applications. This work aimed to investigate the chemical composition and cytotoxic activity of EOpp extracted from unripe (U-EOpp) and ripe (R-EOpp) pink pepper fruits. U-EOpp and R-EOpp were extracted using the hydrodistillation technique and analysed using NMR and GC-MS. U-EOpp and R-EOpp cytotoxic activity was assessed using HL-60 (acute promyelocytic leukemia) and SK-MEL-28 (malignant melanoma) cell lines by MTT assay. Results showed that α -pinene (29.16%), α -Limonene (20.65%), and β -cymene (15.86%) were U-EOpp major components. In addition, β -phellandrene (38.91%), Sylvestrene (23.02%), and α -pinene (21.62%) were R-EOpp major components. U-EOpp showed cytotoxic activity at 37.5 and 18.7 μ g/mL for SK-MEL-28 and HL-60, respectively. R-EOpp showed cytotoxic activity for HL-60 at 100 μ g/mL. Therefore, EOpp may represent a remarkable source of active natural compounds used in traditional Brazilian medicine.

ARTICLE HISTORY

Received 30 May 2023
Accepted 6 November 2023

KEYWORDS

Volatile oils; gas chromatography; α -pinene; β -phellandrene; MTT assay



De Oliveira Lopes, Ana Luiza ; Neves De Andrade, Camyla Caroliny ; Sousa Duarte, Sâmia ; Gadelha Marques, Karinne Kelly ; **Ramos Marques De Souza, Ramon** ; De Lourdes Assunção Araújo De Azevedo, Fátima ; Fechine Tavares, Josean ; Dos Santos Golzio, Sócrates ; Ramos Gonçalves, Juan Carlos ; Sobral, Marianna Vieira . Assessment of the in Vitro Antimelanoma Potential of *Lippia microphylla* Cham (Verbenaceae) Essential Oil. *Chemistry & Biodiversity*, v. 20, p. 1-9, 2023. Disponível em: doi.org/10.1002/cbdv.202300717

doi.org/10.1002/cbdv.202300717

Research Article



www.cb.wiley.com

Assessment of the *in Vitro* Antimelanoma Potential of *Lippia microphylla* Cham (Verbenaceae) Essential Oil

Ana Luiza de Oliveira Lopes,^[a] Camyla Caroliny Neves de Andrade,^[a] Sâmia Sousa Duarte,^[a] Karinne Kelly Gadelha Marques,^[a] Ramon Ramos Marques de Souza,^[a] Fátima de Lourdes Assunção Araújo de Azevedo,^[a] Josean Fechine Tavares,^[a, b] Sócrates dos Santos Golzio,^[a, b] Juan Carlos Ramos Gonçalves,^{*[a, b]} and Marianna Vieira Sobral^{*[a, b]}

Essential oils stand out among natural products for their complex composition, frequently described in the literature with a range of biological effects. This study evaluated the cytotoxic activity against several human cancer cell lines of essential oils extracted from the leaves of *Lippia microphylla* (EO-LM) Cham. (Verbenaceae). The melanoma cell line SK-MEL-28 was the most sensitive to the EO-LM, presenting an IC₅₀ of 33.38 ± 1.16 µg/mL. Afterward, the effects of EO-LM on the cell cycle, induction of apoptosis, and production of reactive oxygen

species (ROS) were evaluated. We stated a significant increase in the sub-G1 population, indicating apoptosis, later confirmed by an increase of SK-MEL-28 cells labeled with Annexin V-FITC and by the formation of apoptotic bodies and membrane blebs, observed by confocal microscopy. Additionally, EO-LM reduced the production of ROS, indicating antioxidant activity. Therefore, EO-LM exhibits anti-melanoma activity *in vitro*, suggesting its potential as an anticancer agent.

Ferreira, Rafael Carlos ; Duarte, Sâmia Sousa ; De Sousa, Valgrícia Matias ; **De Souza, Ramon Ramos Marques** ; Marques, Karinne Kelly Gadelha ; De Abrantes, Renata Albuquerque ; Do Nascimento, Yuri Mangueira ; De Sousa, Natália Ferreira ; Scotti, Marcus Tullius ; Scotti, Luciana ; Tavares, Josean Fechine ; Gonçalves, Juan Carlos Ramos ; Da Silva, Marcelo Sobral ; Sobral, Marianna Vieira . 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*, v. 16, p. 1553, 2023.

Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ph16111553>



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, Valgricia 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 Fechine 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

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.



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.E.; 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>

Keywords: natural products; essential oil; antitumor effect

Nascimento, Sanierly Da Paz Do ; **De Souza, Ramon Ramos Marques** ; Sobral, Marianna Vieira ; Xavier-Junior, Francisco Humberto ; Da Silva, Marcus Vinícius Santos ; Viana, Marcelo Machado ; Da Silva, Fausthon Fred ; Serpe, Michael J. ; De Souza, Antonia L. . Gelatin-Oxidized Alginate and Chitosan-Coated Zein Nanoparticle Hydrogel Composite to Enhance Breast Cancer Cytotoxicity in Dual-Drug Delivery. ACS Omega, v. 9, p. 45190-45202, 2024.

Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c06404>



Open Access

This article is licensed under CC-BY 4.0

<http://pubs.acs.org/journal/acsomegaf>

Article

Gelatin-Oxidized Alginate and Chitosan-Coated Zein Nanoparticle Hydrogel Composite to Enhance Breast Cancer Cytotoxicity in Dual-Drug Delivery

Sanierly da Paz Do Nascimento, Ramon Ramos Marques de Souza, Marianna Vieira Sobral, Francisco Humberto Xavier-Junior, Marcus Vinícius Santos da Silva, Marcelo Machado Viana, Fausthon Fred da Silva, Michael J. Serpe, and Antonia L. de Souza*



Cite This: ACS Omega 2024, 9, 45190–45202



Read Online

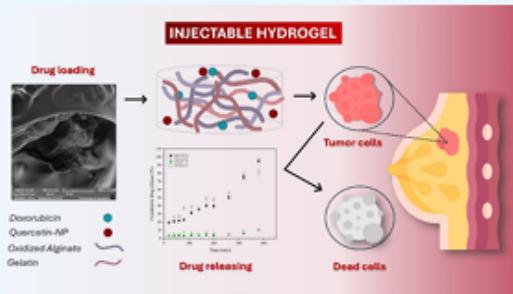
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: This study explores the combined delivery of doxorubicin and quercetin using a gelatin-oxidized alginate-based hydrogel as a promising strategy for localized breast cancer therapy. Our approach involves the incorporation of doxorubicin within the hydrogel matrix and loading quercetin into chitosan-coated zein nanoparticles. The hydrogel exhibited self-healing properties attributed to Schiff base cross-linking and demonstrated injectability. Characterization of its microstructural, mechanical, and textural properties revealed a porous and flexible structure, demonstrating its suitability for drug release applications. Both drugs exhibited distinct *in vitro* release profiles at pH 6.8 (typical of tumor tissue), with doxorubicin at 81.2% and quercetin at 9.7%. After 72 h of release, the cytotoxicity against MCF-7 breast cancer cells was assessed. The hydrogel formulation containing doxorubicin increased the cytotoxic action by 4.66-fold, whereas the hydrogel composite, containing both doxorubicin and quercetin-loaded nanoparticles, enhanced it by 20.7-fold compared with doxorubicin alone. Thus, the findings of our study highlight the enhancing effect of the dual release system, thereby expanding the utility of gelatin-oxidized alginate-based hydrogels as advanced drug delivery systems, as exemplified by the combined delivery of doxorubicin and quercetin.



Sousa, Gabriela Ribeiro De ; Lima, Natanael Teles Ramos De ; **Souza, Ramon Ramos Marques De** ; Amorim, Geraldo Moisés Wanderley ; Sousa, Natália Ferreira De ; Cardoso, Domingos Benício Oliveira Silva ; Tavares, Josean Fechine ; Silva, Marcelo Sobral Da ; Sobral, Marianna Vieira ; Scotti, Marcus Tullius ; Barbosa Filho, José Maria . Cytotoxic potential of new caffeoyl triterpenes from the root of *Acosmium diffusissimum* (Mohlenbr.) Yakovlev: an *in vitro* and *in silico* approach. NATURAL PRODUCTS RESEARCH, v. 0000, p. 1-5, 2024.

Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14786419.2024.2415430>

NATURAL PRODUCT RESEARCH
<https://doi.org/10.1080/14786419.2024.2415430>



[Check for updates](#)

Cytotoxic potential of new caffeoyl triterpenes from the root of *Acosmium diffusissimum* (Mohlenbr.) Yakovlev: an *In vitro* and *In silico* approach

Gabriela Ribeiro de Sousa^a, Natanael Teles Ramos de Lima^a, Ramon Ramos Marques de Souza^a, Geraldo Moisés Wanderley Amorim^a, Natália Ferreira de Sousa^a, Domingos Benício Oliveira Silva Cardoso^b, Josean Fechine Tavares^{a,c}, Marcelo Sobral da Silva^a, Marianna Vieira Sobral^{a,c}, Marcus Tullius Scotti^{a,d} and José Maria Barbosa Filho^{a,c}

^aNatural and Synthetic Bioactive Products, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil; ^bRio de Janeiro Botanical Garden Research Institute, Rio de Janeiro, Brazil; ^cDepartment of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Centre, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil; ^dDepartment of Chemistry, Exact and Natural Sciences Centre, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

ABSTRACT

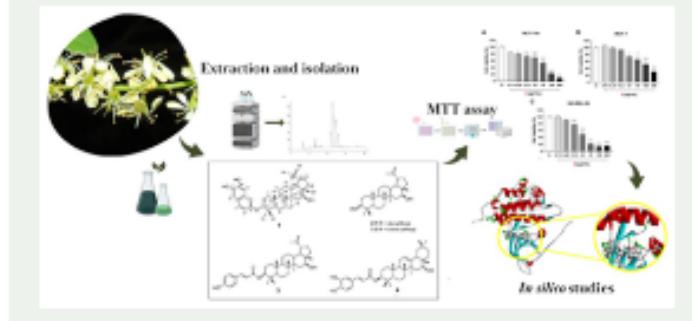
Two new caffeoyl triterpenes, *cis*-lupacosmeol (1) alone and in mixture with *trans*-lupacosmeol (2), and two known compounds, 16 β -hydroxy-3 β -*trans*-caffeoyl-olean-12-ene (3) and 16 β -hydroxy-3 β -*p*-coumaroyl-lup-20(29)-ene (4), were isolated from the roots of *Acosmium diffusissimum*. The structures were chemically characterised using 1D and 2D NMR, IR spectroscopy, and HRESIMS techniques. Cytotoxicity was evaluated against three different cancer cell lines (MCF-7, HCT-116, SK-MEL-28). Only mixture 2 showed activity against all strains tested, with more pronounced ability to inhibit SK-MEL-28 growth (IC_{50} : 25.45 μ g/mL). Molecular docking studies suggested that the cytotoxic activity of 2 was strongly attributed to interactions between *cis*-lupacosmeol and *trans*-lupacosmeol, which are present in mixtures used to treat melanoma and exhibit activities towards different molecular targets of importance.

ARTICLE HISTORY

Received 2 May 2024
Accepted 7 October 2024

KEY WORDS

Fabaceae; caffeoyl lupan-type triterpenes; NMR; MTT assay; molecular docking; antimelanoma



Uchôa, Ana Flávia Chaves ; Formiga, Allessya Lara Dantas ; Alves, Álisson Emannuel Franco ; Cardoso, Anny Letícia Marinho Ramos ; Pereira, Graziela Maria De Araujo ; Carvalho, Lucas Medeiros Martins ; Silva, Luís Fellipe Alves Da ; Pereira, Paulo Sérgio Da Silva ; Souza, Pedro Henricke Oliveira De ; Jales, Silvana Teresa Lacerda ; Silva, Anauara Lima E ; **Souza, Ramon Ramos Marques De** ; Sobral, Marianna Vieira ; Silva, Marcelo Sobral Da ; Barbosa Filho, José Maria ; Xavier-Júnior, Francisco Humberto . Optimization and functionalization of copaiba oil-loaded nanostructured lipid carriers to improve cytotoxicity against breast cancer cells. *JOURNAL OF DRUG DELIVERY SCIENCE AND TECHNOLOGY*, v. 105, p. 106575, 2025.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2024.106575>

Journal of Drug Delivery Science and Technology 105 (2025) 106575



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Drug Delivery Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jddst



Optimization and functionalization of copaiba oil-loaded nanostructured lipid carriers to improve cytotoxicity against breast cancer cells



Ana Flávia Chaves Uchôa ^a , Allessya Lara Dantas Formiga ^a , Álisson Emannuel Franco Alves ^a , Anny Letícia Marinho Ramos Cardoso ^a , Graziela Maria de Araujo Pereira ^a , Lucas Medeiros Martins Carvalho ^a , Luís Fellipe Alves da Silva ^a , Paulo Sérgio da Silva Pereira ^a, Pedro Henricke Oliveira de Souza ^a , Silvana Teresa Lacerda Jales ^a , Anauara Lima e Silva ^b, Ramon Ramos Marques de Souza ^c , Marianna Vieira Sobral ^c, Marcelo Sobral da Silva ^b, José Maria Barbosa Filho ^b , Francisco Humberto Xavier-Júnior ^{a,*}

^a Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology (BioTecFarm), Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, Campus Universitário I, Castelo Branco III, Cidade Universitária, CEP: 58051-900, João Pessoa, PB, Brazil

^b Multiuser Characterization and Analysis Laboratory (LMCA), Institute of Research in Drugs and Medicines, Federal University of Paraíba, Campus Universitário I, Castelo Branco III, Cidade Universitária, CEP: 58051-900, João Pessoa, PB, Brazil

^c Oncopharmacology Laboratory (ONCOPAR), Institute of Research in Drugs and Medicines (IPeParM), Federal University of Paraíba, Campus Universitário I, Castelo Branco III, Cidade Universitária, CEP: 58051-900, João Pessoa, PB, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Copaiba oil, biological products
Nanotechnology
Drug delivery
Nanoparticles
Breast cancer

ABSTRACT

Copaiba oil (CO) exhibits notable antineoplastic properties, that can be enhanced when encapsulated within nanosystems. Thus, this study focused on characterizing, optimizing, and functionalizing CO-loaded nanostructured lipid carriers (NLCs) and evaluating their interaction with albumin and MCF-7 breast cancer cells. NLCs were produced using solvent injection or hot emulsion with sonication (HES) methods, and optimized by Box-Behnken design, considering CO (1, 5, 9 %), Preciro® (1, 4, 7 %), and Tween® (0.1, 0.5, 0.9 %) as variables. The optimized formulation, containing 6 % CO, was produced by HES, showing a particle size of 183 ± 1.8 nm, PDI of 0.17 ± 0.01 , and zeta potential of -20.7 ± 0.2 mV. Tween® 80 significantly reduced particle size ($R^2 = 0.999$). Optimized NLC (oNLC) was functionalized with Pluronic®, cholesterol, chitosan, and PEG, and characterized by infrared spectroscopy. oNLC-PEG1% and oNLC-Plu1% displayed promising particle sizes (161.1 ± 1.1 and 186.4 ± 1.6 nm). Infrared spectra confirmed CO encapsulation. Stability tests showed no significant changes in samples stored at 4°C for 90 days, maintaining a spherical shape under electron microscopy. NLCs demonstrated great stability with albumin except for oNLC-Plu1% after 24h (434.3 ± 26.7 nm). oNLC-Chol exhibited the highest toxicity against MCF-7 cells (52.49 % inhibition at $25 \mu\text{g}/\text{mL}$). Thus, functionalized, stable NLCs were produced, displaying varied albumin interaction profiles and high anticancer efficacy, indicating their potential as a delivery system.

Uchôa, Ana F. C. ; Formiga, Allessya L. D. ; Cardoso, Anny L. M. R. ; Pereira, Graziela M. A. ; Carvalho, Lucas M. M. ; Souza, Pedro H. O. ; Silva, Anauara L. ; **Souza, Ramon R. M.** ; Sobral, Marianna V. ; Silva, Marcelo S. ; Barbosa-Filho, José M. ; Xavier-Júnior, Francisco H. . Optimized and Functionalized Carvacrol-Loaded Nanostructured Lipid Carriers for Enhanced Cytotoxicity in Breast Cancer Cells. *PHARMACEUTICS*, v. 17, p. 363, 2025.

Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17030363>



pharmaceutics



Article

Optimized and Functionalized Carvacrol-Loaded Nanostructured Lipid Carriers for Enhanced Cytotoxicity in Breast Cancer Cells

Ana F. C. Uchôa ¹, Allessya L. D. Formiga ¹, Anny L. M. R. Cardoso ¹, Graziela M. A. Pereira ¹, Lucas M. M. Carvalho ¹, Pedro H. O. Souza ¹, Anauara L. Silva ², Ramon R. M. Souza ³, Marianna V. Sobral ³, Marcelo S. Silva ², José M. Barbosa-Filho ² and Francisco H. Xavier-Júnior ^{1,*}

¹ Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology (BioTecFarm), Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, Campus Universitário I, Castelo Branco III-Cidade Universitária, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil; anauchoa@lff.ufpb.br (A.F.C.U.); allessya.formiga@lff.ufpb.br (A.L.D.F.); annyleticamarinho@lff.ufpb.br (A.L.M.R.C.); graziela.maria.araujo.pereira@academico.ufpb.br (G.M.A.P.); lucas.medeiros.2@scadefmico.ufpb.br (L.M.M.C.); phos@academico.ufpb.br (P.H.O.S.)

² Multiuser Characterization and Analysis Laboratory (LMCA), Institute of Research in Drugs and Medicines, Federal University of Paraíba, Campus Universitário I, Castelo Branco III-Cidade Universitária, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil; anauarasilima@lff.ufpb.br (A.L.S.); marcelosobral@lff.ufpb.br (M.S.S.); jbarbosa@lff.ufpb.br (J.M.B.-E.)

³ Oncopharmacology Laboratory (ONCOFAR), Institute of Research in Drugs and Medicines (IPeFarM), Federal University of Paraíba, Campus Universitário I, Castelo Branco III-Cidade Universitária, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil; ramonsouza@lff.ufpb.br (R.R.M.S.); mariannavbs@gmail.com (M.V.S.)

* Correspondence: fxj@academico.ufpb.br

Abstract: **Background/Objectives:** Carvacrol, a monoterpenoid phenol found in essential oils, exhibits many biological activities, including anticancer properties through mechanisms such as induction of apoptosis. These properties can be enhanced if encapsulated within nanoparticles. This study focuses on producing functionalized carvacrol-loaded nanostructured lipid carriers (NLCs) applied to the treatment of breast cancer. **Methods:** NLCs were produced by hot emulsification with the sonication method and optimized by the Box-Behnken design, considering Precirol® (1, 4, 7%), carvacrol (1, 5, 9%), and Tween® (0.1, 0.5, 0.9%) as independent variables. **Results:** The optimized NLC containing 2% carvacrol had a particle size of 111 ± 2 nm, Pdl of 0.26 ± 0.01 , and zeta potential of -24 ± 0.8 mV. The solid lipid (Precirol®) was the variable that most influenced particle size. NLCs were functionalized with Pluronic® F68, cholesterol, chitosan, and polyethylene glycol (0.05–0.2%), with oNLC-Chol presenting the most promising results, with no significant increase in particle size (± 12 nm) and high encapsulation efficiency (98%). Infrared spectra confirm effective carvacrol encapsulation, and stability tests showed no significant physicochemical changes for 120 days of storage at 4 °C. When incubated with albumin (5 mg/mL), NLCs showed overall good stability over 24 h, except for oNLC-Chol, which increased slightly in size after 24 h. In addition, oNLC increased the cytotoxic effect of carvacrol by 12-fold, resulting in an IC_{50} of 7 ± 1 µg/mL. **Conclusions:** Therefore, it was possible to produce stable, homogeneous NLCs with nanometric sizes containing 2% carvacrol that displayed improved anticancer efficacy, indicating their potential as a delivery system.

Keywords: carvacrol; nanotechnology; drug delivery; nanostructured lipid carriers; breast cancer



Received: 17 December 2024

Revised: 4 February 2025

Accepted: 13 February 2025

Published: 13 March 2025

Citation: Uchôa, A.F.C.; Formiga, A.L.D.; Cardoso, A.L.M.R.; Pereira, G.M.A.; Carvalho, L.M.M.; Souza, P.H.O.; Silva, A.L.; Souza, R.R.M.; Sobral, M.V.; Silva, M.S.; et al. Optimized and Functionalized Carvacrol-Loaded Nanostructured Lipid Carriers for Enhanced Cytotoxicity in Breast Cancer Cells. *Pharmaceutics* **2025**, *17*, 363. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17030363>

Copyright © 2025 by the authors

Carvalho, Lucas Raposo ; De Souza Bozzi, Aline ; Faria, Wanessa Maria Alves ; Venturelli, Lucas Gil ; Esteves, Túlio Duque ; Duarte, Sâmia Sousa ; **De Souza, Ramon Ramos Marques** ; Castro, Isione Oliveira ; Filho, Eclair Venturini ; Diniz, Renata ; Sobral, Marianna Vieira ; Rocha, Willian Ricardo ; Tavares, Eder Do Couto . In(iii) complexes of sulfonyldithiocarbimates as selective antineoplastic agents against human colorectal adenocarcinoma. DALTON TRANSACTIONS, v. 1, p. 1, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/D5DT00868A>



PAPER



Cite this: Dalton Trans., 2025, 54, 11207

In(III) complexes of sulfonyldithiocarbimates as selective antineoplastic agents against human colorectal adenocarcinoma†

Lucas Raposo Carvalho, ^a Aline de Souza Bozzi, ^b Wanessa Maria Alves Faria, ^a Lucas Gil Venturelli, ^a Túlio Duque Esteves, ^a Sâmia Sousa Duarte, ^c Ramon Ramos Marques de Souza, ^c Isione Oliveira Castro, ^c Eclair Venturini Filho, ^d Renata Diniz, ^e Marianna Vieira Sobral, ^c Willian Ricardo Rocha ^b and Eder do Couto Tavares^a

The synthesis, antineoplastic profile, and structural aspects of six In(III) sulfonyldithiocarbimate complexes ($\text{Ph}_4\text{P}[(\text{RSO}_2\text{N}=\text{CS}_2)_2\text{In}]$, **2a-f**) are described. The salts were readily obtainable with 38% to 98% yield by the water-mediated complexation of the ligand (**1a-f**) in the presence of $\text{In}(\text{NO}_3)_3$ without further purification. Spectroscopic data pointed to the formation of isomers, which were postulated as the result of three complexation modes – SS-SS, SN-SN, and SN-SS. DFT calculations furnished ΔG , K_{eq} , and δ values that indicated a preference for the SS-SS isomer. Statistical analysis of ^{13}C NMR data placed $^{13}\text{C}=\text{N}$ δ values as efficient probes of the d-electron count of the metal in sulfonyldithiocarbimate complexes. The compounds displayed antineoplastic activity against human colorectal adenocarcinoma (HCT-116) cell lines ($\text{IC}_{50} = 3.02(21) \mu\text{mol L}^{-1}$ to $5.36(42) \mu\text{mol L}^{-1}$) with high selectivity compared to HaCaT cells. Moreover, an XRD analysis of a water-insoluble decomposition product of a ligand (**1b**) is also described, showing the formation of a supramolecular-like network and corroborating the use of the metallic complexes as biologically active compounds instead of their isolated ligands.

Received 14th April 2025,

Accepted 30th June 2025

DOI: 10.1039/d5dt00868a

rsc.li/dalton