

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

FRANCIELE FILARDI CIMINO

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E MECÂNICA DE CÉLULAS TUMORAIS
TRATADAS COM COMPOSTOS CANDIDATOS A QUIMIOTERÁPICOS**

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

FRANCIELE FILARDI CIMINO

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E MECÂNICA DE CÉLULAS TUMORAIS
TRATADAS COM COMPOSTOS CANDIDATOS A QUIMIOTERÁPICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências de Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Anésia Aparecida dos Santos

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

Cimino, Franciele Filardi, 1997-
C573a Avaliação da citotoxicidade e mecânica de células tumorais
2021 tratadas com compostos candidatos a quimioterápicos / Franciele
Filardi Cimino. – Viçosa, MG, 2021.

91 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Anesia Aparecida dos Santos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Câncer. 2. Metástase. 3. Quimioterapia. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa
de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 571.978

FRANCIELE FILARDI CIMINO

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E MECÂNICA DE CÉLULAS TUMORAIS
TRATADAS COM COMPOSTOS CANDIDATOS A QUIMIOTERÁPICOS**

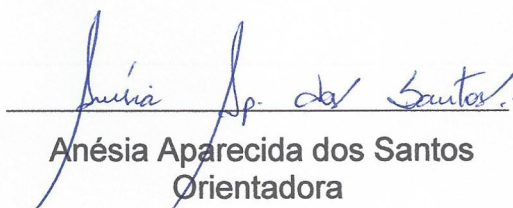
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências de Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 25 de maio de 2021.

Assentimento:



Franciele Filardi Cimino
Autora



Anésia Aparecida dos Santos
Orientadora

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por sempre guiar meus caminhos e iluminar meus passos, me dando forças para prosseguir e superar todos os obstáculos.

Agradeço à minha família, especialmente minha mãe, Bete, e minha irmã, Carol, por estarem ao meu lado em todos os momentos, me apoiando, me incentivando e me dando o mais puro afeto. Elas são meu tudo e eu devo tudo a elas.

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa (UFV) por ter me permitido a oportunidade de aprimorar meus conhecimentos e enriquecer minha experiência acadêmica.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Departamento de Biologia Geral da UFV, pela realização do mestrado e por tantas vivências e trocas de saberes únicos que pude experimentar ao longo desses dois anos de curso.

Agradeço à minha orientadora Prof.^a Anésia Aparecida dos Santos, que me recebeu de braços abertos e que sempre teve paciência e dedicação para me ajudar na pesquisa e nos experimentos em laboratório.

Agradeço às minhas companheiras de laboratório: Amanda, Marcela, Mariá e Patrícia, que tornaram o ambiente de trabalho um lugar agradável e que sempre estiveram dispostas a estender a mão pra ajudar. Além de colegas de trabalho, se tornaram amigas que posso contar em todos os momentos e que desejo levar pra sempre na minha vida.

Agradeço aos meus professores do IFSEMG – *Campus* Barbacena, pelo excelente curso de Ciências Biológicas e por todas as oportunidades e incentivos que trilharam o meu caminho até aqui. Em especial eu agradeço ao Prof. José Emílio Zanzirolani de Oliveira e à Prof.^a Ana Paula de Lima Florentino Matta que foram essenciais e indispensáveis para minha formação e para minha vinda para a UFV.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente tornaram esse sonho possível. O meu mais sincero obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

CIMINO, Franciele Filardi, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2021. **Avaliação da citotoxicidade e mecânica de células tumorais tratadas com compostos candidatos a quimioterápicos.** Orientadora: Anésia Aparecida dos Santos.

As neoplasias, originadas em sua maioria, pelo acúmulo de mutações celulares e caracterizadas por um quadro de mitose contínua e desordenada podem dar origem a uma massa tecidual, conhecida como tumor. Por representar uma das principais causas de morte no mundo, a busca por medicamentos seletivos às células tumorais e que promovam menor desenvolvimento de efeitos colaterais no paciente, faz-se primordial. O objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade *in vitro* de compostos candidatos a quimioterápicos em células normais e tumorais, bem como, a interferência desses compostos na mecânica celular (migração). Neste trabalho foram testados o extrato etanólico de amora, o derivado sintético de sulfonamidas (BHCN) e os derivados de β -dicetonas (curcumina e DPBP) nas linhagens celulares VERO (epitélio normal de rim de macaco), HEK293 (epitélio normal de rim humano embrionário) e HT29 (adenocarcinoma colorretal humano). A viabilidade celular foi mensurada pelo ensaio de MTT, e os valores de IC₁₀, IC₅₀ e índice de seletividade (IS) foram obtidos. Os tratamentos com o extrato etanólico de amora e com o composto curcumina apresentaram IC₅₀ para as linhagens normais superiores aos obtidos às linhagens tumorais, permitindo avaliar o IS de 13,61 e 14,0, respectivamente. O composto DPBP não matou a célula normal em nenhuma das concentrações testadas, e apresentou baixo valor de IC₅₀ para a linhagem tumoral, demonstrando elevada seletividade. O tratamento com o composto derivado de sulfonamidas (BHCN) revelou um IC₅₀ superior para a linhagem tumoral em relação aos valores obtidos com as linhagens normais, não sendo, portanto, seletivo para esse tipo de câncer. Em conjunto, esses resultados apontam o extrato de amora, a curcumina, e o DPBP como promissores fármacos para o tratamento do câncer colorretal (CCR). Além disso, para complementar os dados observados em estudos prévios sobre a atividade antitumoral do composto DPBP no melanoma, testou-se a atividade antimetastática deste composto na linhagem de melanoma murino – B16F10, através do ensaio de cicatrização de feridas (*Wound healing*). Os resultados demonstraram que o composto DPBP inibe a migração das células B16F10 em ambas as concentrações de IC₅₀ e

IC₉₀, e por isso, ele pode ser considerado um excelente candidato a fármaco para o tratamento do melanoma, por exibir grande seletividade para células tumorais ao mesmo tempo que impede a migração celular, evitando o surgimento de metástases em diferentes tecidos do organismo.

Palavras-chave: Câncer. Metástase. Quimioterápicos.

ABSTRACT

CIMINO, Franciele Filardi, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May 2021. **Evaluation of cytotoxicity and mechanics of tumor cells treated with compounds that are candidates for chemotherapy.** Advisor: Anésia Aparecida dos Santos.

Neoplasms, originated mostly by the accumulation of cellular mutations and characterized by a picture of continuous and disordered mitosis can give rise to a tissue mass, known as a tumor. These can be considered benign when they remain in the original tissue and malignant when the cells acquire the ability to invade other tissues. In this case, they are also called cancer. As it represents one of the main causes of death in the world, the search for drugs that are selective to tumor cells and that promote less development of side effects in the patient is essential. The aim of this work was to evaluate the *in vitro* cytotoxicity of candidate compounds for chemotherapy in normal and tumor cells, as well as the interference of these compounds in cell mechanics (migration). In this work, the ethanolic extract of blackberry, the synthetic derivative of sulfonamides (BHCN) and the derivatives of dibenzoylmethanes (curcumin and DPBP) in the cell lines VERO (normal epithelium of monkey kidney), HEK293 (normal epithelium of human embryonic kidney) were tested and HT29 (human colorectal adenocarcinoma). Cell viability was measured by the MTT assay, and the IC_{10} , IC_{50} and selectivity index (IS) values were obtained. The treatments with the ethanolic extract of blackberry and with the compound curcumin presented IC_{50} for the normal lines superior to those obtained to the tumor lines, allowing to evaluate the IS of 13.61 and 14.0, respectively. The DPBP compound did not kill the normal cell at any of the tested concentrations, and presented a low IC_{50} value for the tumor line, demonstrating high selectivity. Treatment with the compound derived from sulfonamides (BHCN) revealed a higher IC_{50} for the tumor line compared to the values obtained with normal lines, therefore, it is not selective for this type of cancer. Taken together, these results point to blackberry extract, curcumin, and DPBP as promising drugs for the treatment of colorectal cancer (CRC). In addition, to complement the data observed in previous studies on the antitumor activity of the DPBP compound in melanoma, the antimetastatic activity of the compound was tested in the murine melanoma lineage – B16F10, through the wound healing test (Wound healing). The results showed that the DPBP compound inhibits the migration of

B16F10 cells at both concentrations of IC_{50} and IC_{90} , and therefore, it can be considered an excellent drug candidate for the treatment of melanoma, as it exhibits great selectivity for tumor cells at the same time. time that prevents cell migration, preventing the appearance of metastases in different tissues of the body.

Keywords: Cancer. Metastasis. Chemotherapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Vias de sinalização da apoptose	22
Figura 2 – Mudanças morfológicas da morte celular programada.....	24
Figura 3 – Alilsulfonamida de código BHCN, de nome IUPAC (Z)-N-(2-ciano-3-fenilalil)4-metilbenzenossulfonamida e de fórmula molecular C ₁₇ H ₁₆ N ₂ O ₂ S	37
Figura 4 – Estrutura química do DBM	38
Figura 5 – Estrutura química da curcumina.....	39
Figura 6 – Estruturas química do Eusolex® 8020 (I) e o Parsol® 1789 (II).....	39
Figura 7 – Estrutura do composto sintetizado 1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona (DPBP)	40
Figura 8 – Ensaio de Citotoxicidade pelo método de MTT	44
Figura 9 – Tratamento das linhagens celulares com o extrato etanólico de amora...47	
Figura 10 – Tratamento das linhagens celulares com o composto curcumina.....	49
Figura 11 – Tratamento das linhagens celulares com o composto BHCN.	50
Figura 12 – Tratamento das linhagens celulares com o composto DPBP.....	51
Figura 13 – Ensaio de cicatrização de feridas em células de melanoma murino	82
Figura 14 – Efeito do DPBP sobre a mecânica das células B16F10 após 24 horas de tratamento	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentrações letais do extrato etanólico de amora.....	48
Tabela 2 – Concentrações letais do composto curcumina	49
Tabela 3 – Concentrações letais do composto BHCN	51
Tabela 4 – Concentração letal do composto DPBP	52
Tabela 5 – Concentrações letais do composto DBPB nas linhagens Melan-A e B16F10	52
Tabela 6 – Índice de seletividade (IS) dos compostos	53
Tabela 7 – Ensaio <i>in silico</i> dos compostos testados	60
Tabela 8 – Resultado representativo da taxa de migração celular	83

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

5-FU	5-Fluouracil
AJCC	American Joint Committee on Cancer
APAF1	Fator de ativação 1 da apoptose
APC	Células apresentadoras de antígenos
ATP	Adenosina trifosfato
B16F10	Melanoma murino
BHCN	[(Z)-N-(2-ciano-3-fenilalil)4-metilbenzenossulfonamida]
CAR	Receptor de antígeno quimérico de células T
CCR	Câncer Colorretal
CDKs	Proteínas cinase dependentes de ciclinas
clAP	Proteínas IAP celulares
CTLA-4	Antígeno linfocitário T citotóxico 4
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DISC	Complexo de sinalização indutor de morte
DBM	Dibenzoilmetano
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPBP	1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona
FDA	Food and Drug Administration
HEK293	Epitélio normal de rim humano embrionário
HT29	Adenocarcinoma de cólon humano
IAP	Proteínas inibidoras da apoptose
IC ₁₀	Concentração inibitória de 10%
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50%
IC ₉₀	Concentração inibitória de 90%
IL-2	Interleucina-2
INCA	Instituto Nacional do Câncer
irAEs	Eventos adversos imunes-relacionados
IS	Índice de seletividade
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LMC	Leucemia mieloide crônica
mAbs	Anticorpos monoclonais
MBA	Morita-Baylis-Hillman
MC	Meio completo
MCF-7	Adenocarcinoma mamário humano

MDR1	Proteína de resistência a múltiplas drogas 1
Melan-A	Melanoblasto normal murino
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
MLKL	Mixed lineage kinase domain like pseudoquinase
MMPs	Metaloproteinases da matriz
MOMP	Membrana externa mitochondrial
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)
NCSCs	células-tronco da crista neural
NP	Nanopartícula
Nrf2	fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
PBS	Tampão fosfato salino
PD1	Proteína de morte celular programada 1
P-gp	glicoproteína P
RIPK3	Proteína quinase 3 que interage com o receptor
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RTKs	Receptoras tirosina-quinases
SMIs	Inibidores de pequenas moléculas
SRCE	Síndrome de encefalopatia relacionada às células CAR-T
SRC	Síndrome de liberação de citocinas
SUS	Sistema Único de Saúde
SV	Sobrevida
TAAAs	Antígenos associados a tumores
TCR	Receptores de células T
TLR	Receptores Toll-Like
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR	receptores do fator de necrose tumoral
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
UFV	Universidade Federal de Viçosa
UICC	Union for International Cancer Control
UVA	Ultravioleta A
VERO	Epitélio normal de rim de macaco
XIAP	Proteína inibidora da apoptose ligada ao X

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	15
CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA CITOTOXICIDADE CELULAR	21
1. INTRODUÇÃO	21
1.1 MORTE CELULAR PROGRAMADA.....	21
1.2 CÂNCER.....	25
1.3.1 Características	25
1.3.2 Tratamento	26
1.3.2.1 <i>Quimioterapia</i>	32
1.3.3 Resistência multidrogas	34
1.4. EXTRATO DE MORUS NIGRA	35
1.5. DERIVADOS DE SULFONAMIDAS	36
1.6. DERIVADOS DE β -DICETONAS.....	38
2. OBJETIVOS.....	41
2.1 OBJETIVO GERAL	41
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
3. MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 CULTIVO CELULAR	43
3.2 CURVA DE CRESCIMENTO	43
3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DO COMPOSTO MEDIDA PELO ENSAIO DO MTT	44
3.4 PERFIL FARMACOCINÉTICO E TOXICOLÓGICO	45
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i>	46
4.2 ÍNDICE DE SELETIVIDADE DOS COMPOSTOS <i>IN VITRO</i>	53
5. CONCLUSÃO	62
6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	62

7.	REFERÊNCIAS.....	63
----	------------------	----

CAPÍTULO 2: EFEITO DO COMPOSTO CANDIDATO À QUIMIOTERÁPICO (DPBP) NA MECÂNICA DAS CÉLULAS TUMORAIS MURINAS B16F10 74

1.	INTRODUÇÃO	74
1.1	MARCAS DO CÂNCER	74
1.2	PROCESSO METASTÁTICO	74
1.3	MIGRAÇÃO CELULAR	77
2.	OBJETIVOS.....	80
2.1	OBJETIVO GERAL.....	80
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	80
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	81
3.1	ENSAIO DE MIGRAÇÃO	81
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	82
5.	CONCLUSÃO	86
6.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	86
7.	REFERÊNCIAS.....	87

APÊNDICE A.....	91
------------------------	-----------

INTRODUÇÃO GERAL

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo. A definição científica de câncer diz respeito ao termo neoplasia, particularmente aos tumores malignos, abrangendo um conjunto de doenças que tem em comum o crescimento desordenado de células transformadas (ALMEIDA *et al.*, 2005). Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2019), o processo em que as células cancerígenas adquirem a habilidade de migrar e penetrar em outros tecidos, é denominado de metástase.

A migração celular é crucial para o desenvolvimento normal dos tecidos, cicatrização de feridas e resposta imune. Contudo, no câncer, ela ocorre de forma desregulada, se tornando um mecanismo chave para a progressão tumoral (CHARRAS *et al.*, 2014). A invasão celular transforma um tumor com crescimento local em uma doença sistêmica, apresentando elevado risco de vida. À medida que as células neoplásicas em proliferação tentam escapar do tumor primário, ocorre ativação de vias de sinalização que controlam a dinâmica do citoesqueleto e a rotatividade das junções célula-matriz e célula-célula (FRIEDL *et al.*, 2011).

A metástase, é o resultado da acumulação de múltiplas alterações nas células neoplásicas e em seu microambiente, que levam à ativação de oncogenes e/ou à inibição de supressores tumorais (JACKETT *et al.*, 2019). Para que a metástase ocorra, as células neoplásicas precisam invadir o tecido normal vizinho de onde se originaram e se infiltrar na corrente circulatória, através dos vasos sanguíneos ou linfáticos próximos. Uma vez na circulação, essas células podem migrar ativamente para diferentes tecidos e órgãos adjacentes, dando origem a tumores secundários (HOU *et al.*, 2011). Se sobreviverem às defesas imunológicas do organismo, essas células malignas aderem e extravasam dos capilares sanguíneos (LU *et al.*, 2011).

Os tumores metastáticos são extremamente heterogêneos e podem causar danos severos ao funcionamento do corpo. Além disso, devido à enorme plasticidade fenotípica das células tumorais, estas são, em geral, resistentes a maioria dos tratamentos existentes (AROZARENA, 2019). Segundo França (2017) “menos de 10% dos casos de morte são causados pelo tumor primário; o restante é resultado de metástases em outros pontos do organismo, como pulmões, fígado, ossos e cérebro”. Dessa forma, a busca por tratamentos alternativos, que sejam capazes de inibir a

Introdução Geral

migração das células oncogênicas, sem gerar danos às células saudáveis do organismo tem sido alvo de estudos recentes.

Uma das principais abordagens utilizadas para o tratamento do câncer é a quimioterapia. Nesse tratamento, são utilizadas drogas com função antineoplásica conhecida, em doses que se aproximam das doses máximas toleráveis pelo indivíduo, administradas com a maior frequência possível, a fim de desestimular a reincidência do tumor (SCHULZE, 2007). Entretanto, a quimioterapia apresenta obstáculos principalmente relacionados à resistência multidrogas (MDR) das populações de células tumorais (NIERO, 2014). Além disso, a baixa seletividade apresentada pela maioria dos fármacos, resulta em vários efeitos colaterais que podem levar o paciente à morte (REMESHA, 2012). Mas, apesar de oferecer uma resposta terapêutica muito baixa, o uso desses quimioterápicos ocorre, principalmente, devido ao seu baixo custo (PRASAD *et al.*, 2017). Nos últimos anos, compostos naturais ou sintéticos, farmacologicamente ativos contra os diversos tipos de tumores vêm sendo descritos como estratégias inovadoras para a diminuição de tais efeitos colaterais (URRUTICOECHEA *et al.*, 2010).

Entre os compostos naturais candidatos a quimioterápicos, um que vem ganhando destaque em estudos recentes é o extrato da espécie arbórea *Morus nigra* L. Pertencente à família Moraceae, essas árvores são de origem asiática, e no Brasil são conhecidas popularmente como amoreira ou amora-preta (BRASIL, 2015a). Seus frutos são ricos em antocianinas, e por isso, possuem maior atividade antioxidante do que as outras espécies do gênero *Morus* (TURAN *et al.*, 2017). Além da sua ação antioxidante, *M. nigra* também possui ação antimicrobiana, anti-inflamatória, antinociceptiva, antidiabética, antiobesidade, protetora de órgãos e anticâncer (LIM *et al.*, 2019).

Outros grupos de compostos importantes dizem respeito a medicamentos antitumorais que tem como alvo os microtúbulos – principais componentes do citoesqueleto e importantes na divisão celular, transporte organelar, manutenção da morfologia celular e transdução de sinal – tem grande sucesso na terapêutica do câncer (DUMONTET *et al.*, 2010). A classe das sulfonamidas incluem substâncias que estão em uso clínico há várias décadas, e são capazes de interromper a dinâmica dos microtúbulos, levando à parada do ciclo e morte celular (LIU *et al.*, 2012). Nesse sentido, um composto derivado de sulfonamida descrito por Tavares (2013), de código

Introdução Geral

BHCN e de fórmula [(Z)-N-(2-ciano-3-fenilalil)4-metilbenzenossulfonamida], foi selecionado para análise citotóxica e parece ser um candidato promissor a quimioterápico.

Ainda, entre as classes de compostos descritas na literatura que apresentam atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*, encontram-se as β -dicetonas – que apresentam diversas propriedades farmacológicas, como fotoproteção, atividades antiinflamatória, antitumoral, antiviral e outras. Entre as β -dicetonas mais estudadas estão o dibenzoilmetano (1,3-difenil-propano-1,3-diona) e diferuloilmetano (1,7-bis-(4-hidroxi-3-metóxi-fenil)-hepta-1,6-dieno-3,5-diona) princípio ativo da curcumina, pigmento que compõe os rizomas do arbusto perene *Curcuma longa* L. (NETO *et al.*, 2006; HEWLINGS *et al.*, 2017).

Ensaio de pinça óptica *in vitro* demonstraram que o composto sintético derivado de DBM – 1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona (DPBP) (NASCIMENTO, 2018a) – apresenta a capacidade de interagir diretamente com a molécula de DNA e iniciar uma cascata de sinalização que culmina em morte celular por apoptose, com alta especificidade a células tumorais murinas (NASCIMENTO *et al.*, 2018b).

Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo, realizar ensaios de citotoxicidade e migração celular com células normais e tumorais, tratadas ou não, com extrato de *Morus nigra*, com o composto derivado de sulfonamida BHCN, e com as β -dicetonas (curcumina e DPBP). Esta dissertação será dividida em dois capítulos. No primeiro capítulo serão apresentadas as análises *in vitro* da citotoxicidade dos compostos selecionados frente a linhagens tumorais e normais. O segundo capítulo irá abordar a mecânica das células tumorais tratadas com os compostos candidatos à quimioterápicos.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, V. L. *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, jan./fev. 2005. doi.org/10.1590/S0100-40422005000100021

ARAZARENA, I.; WELLBROCK, C. Phenotype plasticity as enabler of melanoma progression and therapy resistance. **Nature Reviews Cancer**, v. 19, p. 377–391, 17 jun. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0154-4>

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Monografia da espécie *Morus nigra* L. (AMOREIRA)**. Brasília: 2015a. 68p. Acesso em: 21 de janeiro de 2020. Disponível em: <<https://www.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/11/Monografia-Morus-nigra.pdf>>

CHARRAS, G.; SAHAI, E. Physical influences of the extracellular environment on cell migration. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 12, p. 813–824, 30 oct. 2014. <https://doi.org/10.1038/nrm3897>

DUMONTET, C.; JORDAN, M. A. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 10, p. 790-803, 01 oct 2010. <https://doi.org/10.1038/nrd3253>

FRANÇA, M.S.J. Panorama: diagnóstico de metástase, avanços e desafios ainda presentes. **Revista Onco&**. ed. 36. 2017. Disponível em: <http://revistaonco.com.br/panorama-diagnostico-de-metastase-avancos-e-desafios-ainda-presentes/> Acesso em: 06 nov. 2019.

FRIEDL, P.; ALEXANDER, S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. **Cell**. v. 147, n. 5, p. 992-1009, 23 nov. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.016>

HEWLINGS, S. J.; KALMAN, D. S. Curcumin: A Review of Its Effects on Human Health. **Foods (Basel, Switzerland)**, v. 6, n. 10, p. 92, 22 oct. 2017. <https://doi.org/10.3390/foods6100092>

HOU, J.-M. *et al.* Circulating Tumor Cells as a Window on Metastasis Biology in Lung Cancer. **The American Journal of Pathology**, v. 178, n. 3, p. 989-996, 26 feb. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.12.003>

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **O que é câncer**. Brasília, DF, 2019. Disponível em <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>. Acesso em 30 out. 2019.

JACKETT, L. A.; SCOLYER, R. A. A Review of Key Biological and Molecular Events Underpinning Transformation of Melanocytes to Primary and Metastatic Melanoma. **Cancers**, v. 11, n. 2041, 17 dec. 2019. doi:10.3390/cancers11122041.

Introdução Geral

LIM, S.; CHOI, C.-I. Pharmacological Properties of *Morus nigra* L. (Black Mulberry) as A Promising Nutraceutical Resource. **Nutrients**, v. 11, n. 2, 20 feb. 2019. <https://doi.org/10.3390/nu11020437>

LIU, Z., *et al.* A novel sulfonamide agent, MPSP-001, exhibits potent activity against human cancer cells in vitro through disruption of microtubule. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 33, n. 2, p. 261-270, 03 feb. 2012. <https://doi.org/10.1038/aps.2011.156>.

LU, P. *et al.* Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 12, a005058. 01 dec. 2011. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005058>

NASCIMENTO, F. R. **Síntese, caracterização e avaliação da atividade antimelanoma *in Vitro* e *in Vivo* do derivado sintético 1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona**. 2018a. Tese (Doutorado em Bioquímica Aplicada). Universidade Federal de Viçosa. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, Viçosa, 2018a.

NASCIMENTO, F. R. *et al.* New antineoplastic agent based on a dibenzoylmethane derivative: Cytotoxic effect and direct interaction with DNA. **Biophysical Chemistry**, v. 239, p. 1-6. 28 apr. 2018b. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2018.04.009>

NETO, Q. A.L. *et al.* Estudo da relação estrutura-atividade quantitativa de dibenzoilmetanos α -substituídos quanto à atividade anticâncer da mama (linhagem celular MCF7). **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 4, p. 345-357, 02 mai. 2006.

NIERO, E. *et al.* The multiple facets of drug resistance: one history, different approaches. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 33, n. 37, 28 apr. 2014. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-33-37>

PRASAD, V. Do cancer drugs improve survival or quality of life? **British Medical Journal**, v. 359, n. j4528. 04 oct. 2017. <https://doi.org/10.1136/bmj.j4528>

REMESHA, A. Toxicities of anticancer drugs and its management. **International Journal of Basic & Clinical Pharmacology**. v. 1, n. 1, 07 aug. 2012. <https://doi.org/10.5455/2319-2003.ijbcp000812>

SCHULZE, M. M. Tratamento Quimioterápico em Pacientes Oncológicos. **Revista Brasileira Oncologia Clínica**, v. 4, n. 12, p. 17-23, set./dez. 2007. <https://www.sboc.org.br/sboc-site/revista-sboc/pdfs/12/artigo3.pdf>.

TAVARES, E. C. **Síntese e caracterização de derivados de sulfonamidas e adutos de Morita-Baylis-Hillman e sua atividade antifúngica e aceleradora da vulcanização da borracha natural**. 2013. Tese (Doutorado em Agroquímica). Universidade Federal de Viçosa. Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, Viçosa, 2013.

Introdução Geral

TURAN, I. *et al.* Antiproliferative and apoptotic effect of *Morus nigra* extract on human prostate cancer cells. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 25, n. 2, p. 241-248, feb. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.06.002>

URRUTICOECHEA, A. *et al.* Recent Advances in Cancer Therapy: An Overview. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 1, p. 3-10, 2010. <https://doi.org/10.2174/138161210789941847>

CAPÍTULO 1

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CITOTOXICIDADE CELULAR

1. INTRODUÇÃO

1.1. MORTE CELULAR PROGRAMADA

Desde o desenvolvimento embrionário, as células individuais se deparam com três opções: dividir-se (ciclo celular), especializar-se (diferenciação) ou cometer suicídio (morte celular programada) (ESCOBAR *et al.*, 2015). O equilíbrio entre esses eventos garante uma regulação rígida do número de células dentro dos organismos. Segundo Melino (2001), “se a mitose prosseguisse sem a morte celular, por exemplo, uma pessoa de 80 anos teria aproximadamente 2 toneladas de medula óssea e linfonodos, e, um intestino de 16 km de comprimento”.

A morte celular programada, que pode ser classificada como apoptose, necroptose, autofagia, *anoikis*, amorfose, ferroptose, piroptose, entre outros (em termos de aparência morfológica, aspectos funcionais e outras características), geralmente progride à medida que a capacidade biológica é perdida (GALLUZZI *et al.*, 2018). A desregulação da morte celular programada está intimamente relacionada ao aparecimento de doenças como infecções, autoimunidade e câncer (TAIT *et al.*, 2014). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que no câncer, as células do organismo adquirem mecanismos de resistência à morte celular programada, sendo esta, uma marca registrada da doença (MEHLEN *et al.*, 2006).

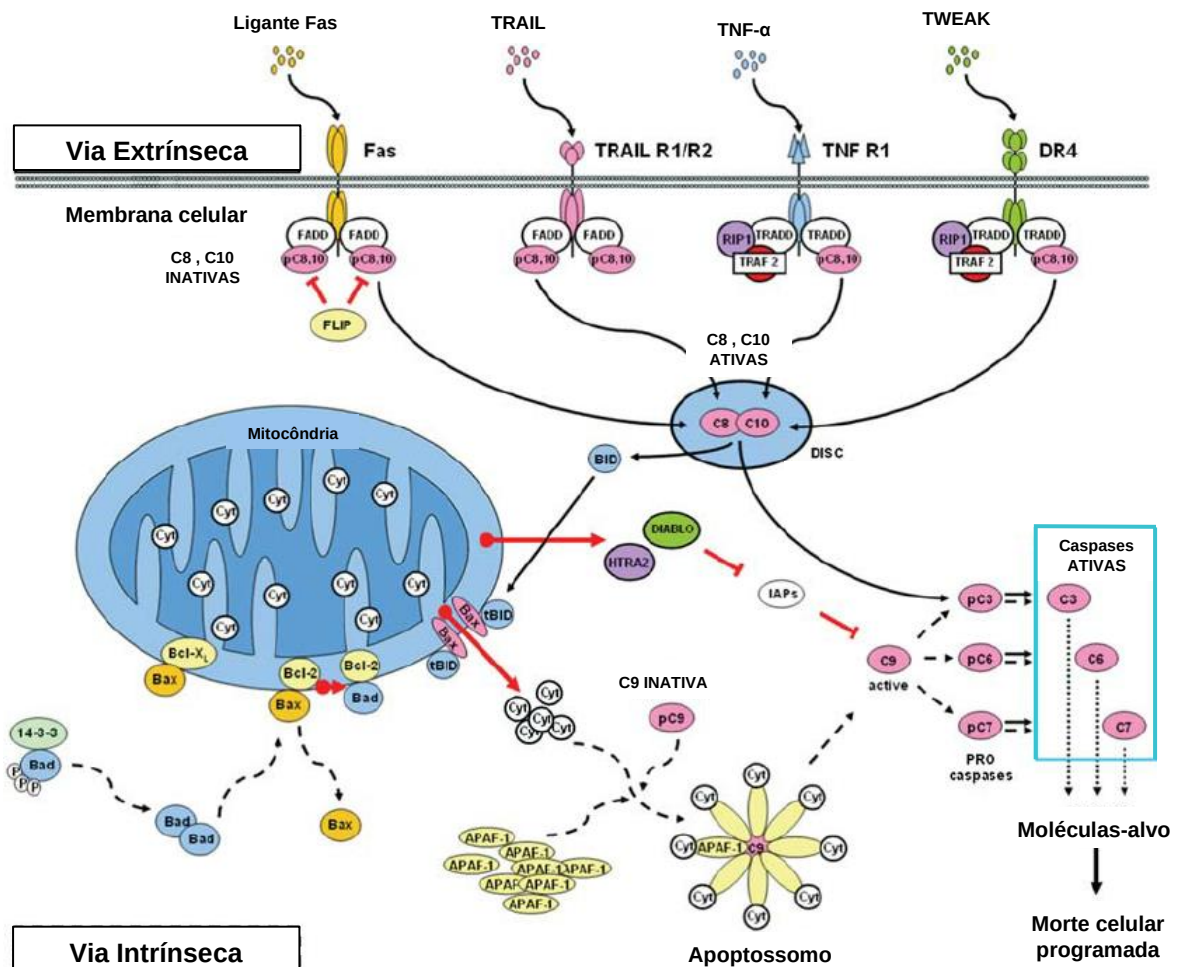
Das diferentes modalidades de morte celular programada, a apoptose é a mais estudada, e, portanto, a mais bem caracterizada (DHANASEKARAN *et al.*, 2017). Morfologicamente, a apoptose é caracterizada pelo arredondamento das células, diminuição citoplasmática, condensação da cromatina e intensa fragmentação nuclear (DOHERTY *et al.*, 2018). Os componentes da célula moribunda são empacotados em vesículas ligadas à membrana plasmática, chamados de corpos apoptóticos, e são rapidamente fagocitados por macrófagos (TAIT *et al.*, 2014). A apoptose é, portanto, considerada um processo anti-inflamatório, por minimizar a liberação de moléculas/estruturas celulares conhecidos como padrões moleculares associados a

Capítulo 1

danos (DAMPs) e evitar o alerta do sistema imune. Isso pode impedir a ocorrência de danos ao tecido causados pela inflamação (LIU *et al.*, 2018).

A apoptose (FIGURA 1) ocorre predominantemente por duas rotas distintas: vias de apoptose intrínseca e extrínseca (HERSEY *et al.*, 2001). A via intrínseca é iniciada por sinais pró-apoptóticos intracelulares, como dano ao DNA ou exposição a agentes citotóxicos. Já a via extrínseca, é iniciada por estímulos pró-apoptóticos extracelulares, incluindo ligantes da família de citocinas TNF (fator de necrose tumoral) que atuam através de receptores de morte localizados na superfície celular (FOX *et al.*, 2016).

Figura 1 – Vias de sinalização da apoptose



Fonte: Adaptado de DALLE-DONNE *et al.* (2011).

A via mitocondrial intrínseca para apoptose é regulada pela família de proteínas BCL-2 que detectam os sinais de morte e resultam em danos à mitocôndria (GALLUZZI *et al.*, 2014). A permeabilização da membrana externa mitocondrial

Capítulo 1

(MOMP) permite a liberação de citocromo c no citosol. A oligomerização do citocromo c, do fator de ativação 1 da apoptose (APAF1) e da procaspase-9, forma o apoptossomo. Uma vez formado, este induz a clivagem da procaspase-9 (caspase iniciadora) em caspase-9 ativada, que posteriormente ativa a caspase-3 (caspase efetora), levando à quebra de substratos celulares e à apoptose (HERSEY *et al.*, 2001). A família BCL-2 consiste em proteínas anti-apoptóticas (incluindo BCL-2, MCL-1 e BCL-xL) e proteínas pró-apoptóticas (incluindo BIM, BID, BAK e BAX). As proteínas BAK e BAX atuam como efetoras que facilitam a formação dos apoptossomos e a ativação das caspases 9 e 3 (GALLUZZI *et al.*, 2018).

A via de sinalização extrínseca para apoptose, ocorre através da interação de ligantes da família do fator de necrose tumoral (TNF) como FASL, TRAIL e TNF- α , presentes na superfície celular de linfócitos (principalmente CD4+) com seus receptores correspondentes nas células moribundas. Os receptores envolvidos são caracterizados pela presença de “domínios de morte” em sua região citoplasmática. Quando os ligantes estão agregados aos seus receptores ocorre a formação do complexo de sinalização indutor de morte (DISC), que ativa a caspase iniciadora 8. A caspase-8 ativada pode então clivar as caspases efetoras 3, 6 e 7 para amplificar o sinal de morte (HERSEY *et al.*, 2001; FOX *et al.*, 2016).

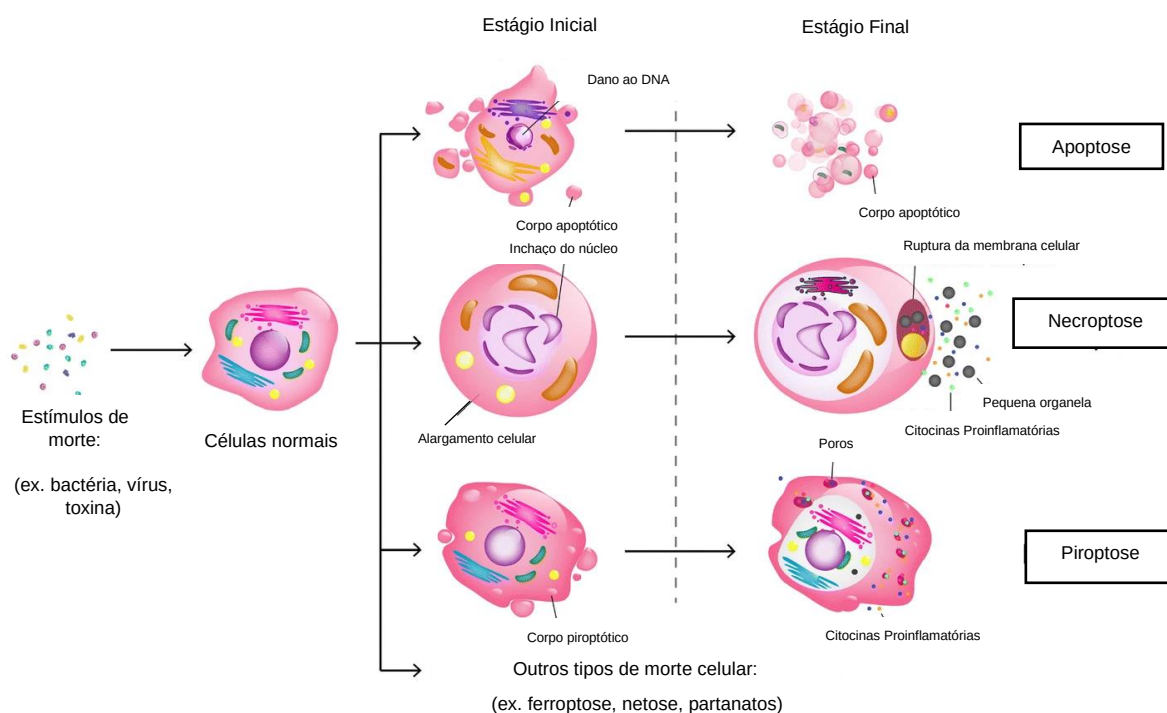
É importante ressaltar ainda, que pode ocorrer interconexão entre as duas vias apoptóticas. Um exemplo, é a via mitocondrial alternativa à apoptose, acionada quando os sinais transmitidos pela via extrínseca parecem ser insuficientes. Segundo Walczak e Krammer (2000), “acredita-se que nessas células, baixas quantidades de caspase-8 são ativadas por DISC, resultando em lenta clivagem da caspase-3, que é inibida pelas proteínas inibidoras de apoptose (IAP)”. A proteína inibidora da apoptose ligada ao X (XIAP) é capaz de inibir a apoptose ligando-se diretamente às caspases 9 e 3, enquanto as proteínas IAP celulares (cIAP) inibem a atividade da caspase 8 indiretamente por meio da atividade da ubiquitina ligase, promovendo a sinalização pró-sobrevivência (FOX *et al.*, 2016). O ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL) induz a caspase-8 ao clivar a proteína pró-apoptótica BID. O fragmento de BID truncado se liga às mitocôndrias, resultando na liberação de SMAC/DIABLO no citosol, inibindo as IAPs e amplificando o sinal de morte (HERSEY *et al.*, 2001).

Em contraste à apoptose, a morte celular por necrose afeta as células vizinhas e desencadeia, ao liberar DAMPs, reações inflamatórias e autoimunes, que podem

Capítulo 1

gerar danos ao tecido (ESCOBAR *et al.*, 2015). Por muitos anos, a apoptose foi considerada a única forma de morte celular regulada, enquanto a necrose foi vista como um tipo de morte celular acidental e não regulada, sob depleção total de ATP, e como resultado de estresse físico-químico extremo. No entanto, evidências recentes revelaram que o processo de necrose regulada inclui várias modalidades de morte celular, como necroptose, partanatos, ferroptose e piroptose (PASPARAKIS *et al.*, 2015). Morfologicamente é impossível distingui-los, e suas principais características são: inchaço celular, degradação do DNA, rompimento da membrana plasmática e liberação do conteúdo citoplasmático no espaço extracelular (ESCOBAR *et al.*, 2015). Piroptose e necroptose são as formas mais bem caracterizadas da necrose regulada (FIGURA 2).

Figura 2 – Mudanças morfológicas da morte celular programada



Fonte: Adaptado de Huang *et al.* (2019).

A piroptose é uma forma inflamatória de morte celular dependente de caspase. A caspase-1 ou a caspase-11 (caspase-5 em humanos) são ativadas em complexos denominados “inflamassomas” que são formados em resposta à detecção de moléculas como toxinas bacterianas ou RNA viral (FRANK *et al.*, 2018). A necroptose, por outro lado, é uma via de morte celular independente de caspase, desencadeada quando a via apoptótica é inibida ou prejudicada. Vários estímulos, incluindo danos

Capítulo 1

ao DNA, infecção viral, envolvimento de receptores, como receptores de células T (TCR), receptores *Toll-Like* (TLR) ou receptores do fator de necrose tumoral (TNFR) levam à ativação da proteína quinase 3 que interage com o receptor (RIPK3). RIPK3 fosforila e ativa o “*mixed lineage kinase domain like pseudoquinase*” (MLKL). O MLKL fosforilado é translocado para a membrana plasmática e resulta no rompimento da célula (FEOKTISTOVA *et al.*, 2014).

Muitas células neoplásicas desenvolvem mecanismos pró-sobrevivência de resistência à apoptose, que incluem a baixa expressão dos receptores de morte e a inibição de vias intracelulares de morte. Uma vez que, a maioria dos tratamentos com quimioterápicos são voltados para a morte celular apoptótica, a capacidade de desenvolver fármacos capazes de induzir a morte celular programada não apoptótica pode oferecer novas oportunidades no contexto terapêutico do câncer (HERSEY *et al.*, 2001).

1.2. CÂNCER

1.2.1. Características

O câncer é uma doença causada por acumulações sucessivas de mutações no material genético das células. Segundo o Ministério da Saúde (2020), os fatores de risco de câncer podem ser devido a causas externas (80 - 90%) ou internas (10%). As causas externas, estão relacionadas ao meio ambiente, ou seja, à exposição a substâncias químicas, irradiação ou infecções. As causas internas dos cânceres, como mudanças hormonais, alterações imunológicas e mutações, são, na maioria das vezes, predeterminadas geneticamente, e por isso, podem ser herdadas. No entanto, é improvável assumir que o câncer seja causado por um único fator. O envelhecimento natural do ser humano acarreta mudanças celulares, que aumentam a sua predisposição à transformação maligna. Esse fato, somado ao maior tempo de exposição das células de pessoas idosas aos diferentes fatores de risco para câncer, explica, em parte, a causa de o câncer ser mais frequente nessa fase da vida (BRASIL, 2020).

Ao longo do desenvolvimento da doença, as células oncogênicas assumem proliferação aberrante, divisão rápida e comportamento agressivo e incontrolável, que podem culminar na formação de tumores (massas sólidas de tecido). Esses tumores quando permanecem *in situ*, ou seja, no tecido primário de origem, são denominados

Capítulo 1

benignos. Quando adquirem a capacidade de invadir tecidos adjacentes e/ou de se espalhar para outras regiões do corpo e formar tumores secundários, são chamados de tumores malignos (SCHULZE, 2007).

À medida que as células tumorais vão substituindo as células normais do organismo, o funcionamento biológico do tecido invadido vai sendo perdido, já que as células transformadas são menos especializadas. Assim, pode haver falência do órgão afetado, que em alguns casos, pode levar à morte do paciente (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2019), existem mais de 100 tipos de cânceres que correspondem à variedade de células que formam o corpo. A estes, dá-se a denominação carcinoma quando a anomalia tem início em células dos tecidos epiteliais, como pele ou mucosas. Sarcomas, se o ponto de partida são as células dos tecidos conjuntivos, como osso, músculo ou cartilagem. Leucemias, quando a origem se dá em células sanguíneas da medula óssea. Linfomas, se for originário das células do sistema linfático. Mielomas, quando tem início nas células plasmáticas da medula óssea que produzem os anticorpos. Melanomas, quando a origem se dá nas células da pele que produzem pigmento (melanócitos). E gliomas, quando o começo da anomalia se dá a partir de células do tecido cerebral.

1.2.2. Tratamento

O tratamento do câncer é baseado no estágio de diagnóstico da doença e na saúde geral do paciente. Os principais tratamentos utilizados são a cirurgia, a radioterapia, a quimioterapia, a terapia hormonal, a terapia direcionada e a imunoterapia (INCA, 2019).

Segundo o Instituto Oncoguia (2018), a **cirurgia** geralmente faz parte de um plano de tratamento quando o paciente apresenta um tumor benigno, ou seja, quando as células tumorais ainda não assumiram o caráter metastático. Além disso, um cirurgião pode remover os linfonodos para reduzir ou impedir a propagação da doença.

A **radioterapia** usa alta dose de raios-X para matar células cancerígenas (MOHAN *et al.*, 2019). A radiação usada é denominada de ionizante porque forma íons (partículas eletricamente carregadas) e deposita energia nas células dos tecidos

Capítulo 1

por onde passa. Essa energia depositada pode matar tanto as células cancerígenas como as células normais vizinhas, causando alterações genéticas e danos ao DNA. Apesar de não ser um método seletivo apenas para células tumorais, resulta, de certa forma, na morte diferencial dessas, já que as células normais são mais eficientes para realizar reparo de danos (BASKAR *et al.*, 2012).

Existem dois tipos principais de radioterapia: de feixe externo e de feixe interno. A radiação externa do feixe é emitida do lado de fora do corpo, onde uma máquina direciona raios de alta energia (fótons, prótons ou radiação de partículas) para a localização do tumor. Essa é a abordagem mais comum no cenário clínico. Já o tratamento por radiação interna, também denominado de braquiterapia, utiliza um vetor (agulhas ou cateteres, por exemplo) para liberar uma fonte de radiação dentro do tecido canceroso do paciente. Essa estratégia é usada principalmente no tratamento de doenças ginecológicas e da próstata (THARIAT *et al.*, 2012). Entretanto, apesar dos avanços na área, os efeitos colaterais causados pela radioterapia continuam sendo muito prejudiciais à saúde dos pacientes (MOHAN *et al.*, 2019).

A **quimioterapia** utiliza medicamentos por via oral (em comprimidos, cápsulas ou líquidos), por via intravenosa (através de injeção ou infusão), ou via uso tópico (pomadas), visando a destruição das células cancerígenas. Geralmente é um recurso paliativo, que pode não levar à cura, mas a uma promissora remissão do tumor e elevação da sobrevida global. Quando associada a outros tratamentos como a radioterapia e a cirurgia, por exemplo, a terapia com quimioterápicos apresenta maior eficácia (SCHIRRMACHER, 2019).

No entanto, a quimioterapia está associada a numerosos efeitos colaterais. Os agentes citotóxicos usados no tratamento não são específicos apenas para células cancerígenas. Eles também visam células saudáveis que se dividem rapidamente em circunstâncias normais, como células hematopoiéticas da medula óssea, mucosa gastrointestinal, pele e folículos pilosos, bem como, células germinativas (FORD *et al.*, 2013). De acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), a intensidade dos danos colaterais do tratamento com quimioterápicos pode ser leve (nota 1), moderada (nota 2), grave (nota 3) ou com risco de vida ou incapacitante (nota 4) (SEEBER *et al.*, 1993).

Capítulo 1

A destruição das células da medula óssea – que normalmente originariam hemácias, leucócitos e plaquetas – pode levar à fadiga, anemia, propensão a infecções e sangramentos. A destruição das células do trato gastrointestinal pode levar a náuseas, vômitos, inflamação das mucosas e diarreia. Enquanto danos aos folículos pilosos podem resultar em queda capilar. Em alguns casos, danos nos órgãos reprodutores podem levar à infertilidade tanto em homens como em mulheres (MCANINCH *et al.*, 2014). Todos os órgãos do corpo podem ser afetados, incluindo órgãos essenciais, como coração (cardiotoxicidade), pulmões (fibrose pulmonar) e cérebro (neurotoxicidade). A neurotoxicidade de grau 3 e 4 pode induzir sonolência, parestesia, paralisia, ataxia, espasmos e coma (SCHIRRMACHER, 2019).

Além disso, segundo McAninch e colaboradores (2014), um dos efeitos crônicos da quimioterapia incluem a resistência a medicamentos. E esse desenvolvimento de resistência a fármacos permanece um problema clínico importante no campo da oncologia. As células malignas desenvolvem resistência de várias formas, como por exemplo, ao induzir bombas de transporte a bombear ativamente o fármaco em questão pra fora da célula, ou ainda, ao aumentar a atividade de enzimas necessárias para inativar o agente quimioterápico.

A **terapia hormonal** envolve a ingestão de hormônios exógenos. Os hormônios são mensageiros químicos produzidos por órgãos específicos do sistema endócrino, e atuam em alvos distantes do local de origem. Essa modalidade de tratamento é muito utilizada para gerenciar doenças malignas quando os hormônios desempenham um papel significativo, como nos cânceres de próstata e de mama (ABRAHAM *et al.*, 2011).

Certos hormônios, como os corticosteroides, têm efeitos antiproliferativos gerais devido à sua capacidade de regular negativamente os genes e induzir a apoptose (SCHMIDT *et al.*, 2004). Assim como a quimioterapia, a resposta à terapia hormonal geralmente resulta em reduções no tamanho do tumor. Ao mesmo tempo, os hormônios podem causar um amplo espectro de complicações, variando de leves a moderadas, como trombose, esteatose hepática, hipertrofia endometrial e osteoporose, até graves, como embolia pulmonar, necrose avascular, perfuração intestinal e câncer endometrial (FAIRCHILD *et al.*, 2015).

Capítulo 1

As **terapias direcionadas ao câncer** visam bloquear especificamente a atividade de proteínas cruciais ou vias de sinalização necessárias para o crescimento e/ou sobrevivência das células tumorais (GIOVANNETTI *et al.*, 2018). Os agentes anticâncer direcionados podem ser inibidores de pequenas moléculas (SMIs) ou anticorpos monoclonais (mAbs) (SEEBACHER *et al.*, 2019). A desvantagem desse tipo de tratamento está relacionada a adesão restrita apenas de pacientes com mutação na molécula-alvo, além disso, pode haver desenvolvimento de resistência pelas células neoplásicas (REBECCA *et al.*, 2019).

Os inibidores de pequenas moléculas (SMIs), que terminam em “-ib/-ibe”, geralmente conseguem atravessar a membrana plasmática e interagir com moléculas de sinalização intracelular (HOELDER *et al.*, 2012). Até o momento, a maioria dos inibidores de pequenas moléculas foi projetada para interferir com enzimas, principalmente as receptoras tirosina-quinases (RTKs) (HOJJAT-FARSANGI, 2014).

Um dos maiores destaques terapêuticos da terapia direcionada, foi o desenvolvimento do inibidor da BCR-Abl, o imatinibe, que recebeu a aprovação da *Food and Drug Administration* (FDA) em 2001 para o tratamento da leucemia mieloide crônica (LMC) (ECK *et al.*, 2009). A translocação BCR/ABL é resultado da fusão de parte do oncogene ABL localizado no cromossomo 9, com o gene BCR, localizado no cromossomo 22, dando origem ao cromossomo *Philadelphia* (Ph) da LMC (CARVALHO *et al.*, 2003). Outro exemplo, é o vemurafenibe que tem como alvo a forma mutante da proteína BRAF (BRAF^{V600E}). Esse medicamento é aprovado para tratar pacientes com melanoma inoperável ou metastático que contém a proteína BRAF alterada (REBECCA *et al.*, 2019).

Os anticorpos monoclonais (mAbs) são usados no tratamento de doenças autoimunes e câncer. Eles podem ser reconhecidos pela terminação “-mab/-mabe”, e por possuírem maior tamanho, só conseguem interagir com moléculas extracelulares e receptores localizados na superfície celular. Alguns dos mAbs mais notáveis incluem: trastuzumabe, aprovado para o tratamento de certos tipos de câncer de mama que superexpressam o HER-2 (receptor do fator de crescimento epidérmico humano); bevacizumab, utilizado no tratamento de câncer colorretal metastático com alta expressão de VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e panitumumab específico para EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico), também utilizado no câncer colorretal (CCR) (SEEBACHER *et al.*, 2019).

Capítulo 1

A **imunoterapia** utiliza fármacos que estimulam o sistema imune no combate às células cancerígenas. Terapias com anticorpos monoclonais, inibidores de *checkpoint* imunológico, transferência de células adotivas e vacinas preventivas são exemplos das estratégias mais utilizadas nesse tipo de tratamento (JORGE, 2019).

Os linfócitos T são células do sistema imune que apresentam a capacidade de reconhecer proteínas cancerígenas, quando ligadas ao complexo de histocompatibilidade principal (MHC) em células apresentadoras de antígenos (APC). Logo, o sistema imunológico é capaz de controlar a carga tumoral (SHARMA *et al.*, 2018). Mas, para ativar o sistema imune, primeiramente é necessário que ocorra uma ligação entre o receptor do linfócito T (TCR) e o antígeno apresentado em uma molécula de MHC na célula apresentadora de antígenos (APC). Em seguida, é necessário que ocorra a conexão da molécula de CD28 no linfócito, com o CD80/CD86 na APC. A molécula de CTLA-4 (antígeno linfocitário T citotóxico 4), expressa nos linfócitos T depois de ativados, possui grande homologia com a molécula CD28. Ela também apresenta maior afinidade ao CD80/CD86 que a molécula de CD28, ativando uma resposta imunorreguladora que inativa a resposta de linfócitos T (KRUMMEL *et al.*, 1995).

A proteína de morte celular programada 1 (PD1) é expressa na superfície de linfócitos T ativados, células dendríticas e células NK (*natural killer*). A PD1 quando ligada a seu ligante (PDL1 ou PDL2) presente na superfície das células neoplásicas, resulta na supressão da proliferação e resposta imune das células T. No entanto, este mecanismo imunorregulador de PD1, assim como o de CTLA-4 que age na interface CD28/CD80, acaba protegendo células do câncer (GONG *et al.*, 2018).

Tumores malignos aproveitam as vias inibitórias CTLA-4 ou PD1 / PD1L para evitar o sistema imunológico, e, ao bloquear a ação dessas moléculas, melhora-se a resposta antitumoral (GAJEWSKI *et al.*, 2013). O Ipilimumabe foi o primeiro anticorpo monoclonal contra CTLA-4. Seu uso se mostrou eficaz na regressão do melanoma, carcinoma renal, câncer de próstata, carcinoma urotelial e câncer do ovário (SHARMA *et al.*, 2015). O Nivolumabe, foi a primeira droga anti-PD1 lançada, usada no tratamento de melanoma metastático. Há também o Atezolizumabe, um inibidor do ligante de PD1 (anti-PD1L), aprovado no tratamento de câncer de bexiga (ROSENBERG *et al.*, 2016).

Capítulo 1

A transferência de células adotivas é um tratamento que coleta linfócitos T saudáveis do paciente ou de um doador, modifica-as geneticamente para expressar um receptor artificial, e as transfere novamente para o paciente (GRAHAM *et al.*, 2018). A substituição do TCR pelo CAR (CAR T-Cells – receptor de antígeno quimérico de células T) é feita por transfecção de plasmídeo, mRNA ou transdução de vetor viral, e se tornou uma terapia bastante eficaz contra neoplasias hematológicas, como leucemias e linfomas (ZHAO *et al.*, 2018).

O paciente a ser tratado, recebe quimioterapia antes da infusão, para esgotar as células imunossupressoras, auxiliando a expansão dos linfócitos modificados. O domínio extracelular do CAR deriva de um anticorpo monoclonal (geralmente o fragmento variável de cadeia única) e é capaz de reconhecer e se ligar a antígenos associados a tumores (TAAs) expostos na superfície da célula tumoral, levando-a à morte (RAFIQ *et al.*, 2019).

O TAA alvo ideal para o direcionamento das células T CAR precisa ser expresso em níveis elevados em 100% das células tumorais, e deve ser inexistente ou expresso em um nível muito baixo, nas células normais. O CD19 se encaixa nesses critérios como um antígeno alvo para malignidades de células B. Praticamente todas as células de leucemia linfoblástica aguda (LLA) expressam CD19 em níveis elevados, e os outros alvos de CD19 - ou seja, células B normais - são relativamente dispensáveis, com suporte de imunoglobulina intravenosa (NEWICK *et al.*, 2017).

No entanto, apesar da eficiência terapêutica, pacientes tratados com células CAR-T podem apresentar efeitos colaterais, como a síndrome de liberação de citocinas (SRC) e a síndrome de encefalopatia relacionada às células CAR-T (SRCE) (ZHANG *et al.*, 2020). Efeitos adversos em outros tipos de terapia imunológica, como o uso de inibidores de *checkpoint* imunológico e anticorpos monoclonais também são relatados. Isso acontece, porque atualmente a maioria das imunoterapias é administrada de forma sistêmica, levando a uma quebra na tolerância e a uma série de toxicidades inflamatórias denominadas eventos adversos imunes-relacionados (irAEs) (DOUGAN *et al.*, 2018). De muitas maneiras, essas toxicidades se assemelham a doenças autoimunes esporádicas, embora os mecanismos envolvidos ainda não estejam totalmente claros (DOUGAN, 2017).

Capítulo 1

1.2.2.1. Quimioterapia

Dentre esses tratamentos, a quimioterapia é a abordagem mais utilizada. Apesar de apresentarem uma resposta terapêutica baixa, o uso de quimioterápicos, ocorre, principalmente, devido ao seu baixo custo (PRASAD *et al.*, 2017). Infelizmente, os tratamentos mais específicos como os inibidores de vias específicas, são muito onerosos tanto para o Sistema Único de Saúde (SUS) quanto para unidades particulares (ADES, 2017).

No início de 1900, o químico alemão Paul Ehrlich desenvolvendo medicamentos para tratar doenças infecciosas, cunhou o termo “quimioterapia”. Ehrlich acreditava no postulado das “balas mágicas”, ou seja, na criação de drogas que seriam direcionadas a alvos estruturais específicos nas células, e que não tivessem afinidade ou efeito tóxico sobre os constituintes normais do corpo. Sem saber, ele havia profetizado o papel da pesquisa farmacêutica moderna, sobre as terapias direcionadas (STREBHARDT *et al.*, 2008). Além de seus grandes feitos, Ehrlich também serviu de inspiração a vários cientistas que desenvolveram importantes tratamentos para doenças humanas, inclusive para o câncer.

Foi assim que Louis Goodman e Alfred Gilman examinaram o potencial terapêutico da mostarda nitrogenada – um composto derivado do gás mostarda, utilizado na guerra química que, além de outros danos, causa lesões nas células sanguíneas e degeneração da medula óssea. A história desse produto químico, entretanto, tem um lado sombrio, já que ele chamou a atenção dos cientistas durante a Segunda Guerra Mundial, quando um derramamento acidental de gás mostarda sobre as tropas de um navio bombardeado em Bari Harbor, deixou inúmeros mortos e feridos. (DEVITA *et al.*, 2008). Os efeitos observados nos homens expostos ao gás mostarda estavam relacionados a uma forte supressão linfóide e mieloide. Dessa forma, os pesquisadores testaram o efeito dessa droga sobre células malignas do sistema linfático em um paciente voluntário com linfoma não-Hodgkin, e o resultado antitumoral foi surpreendente. Essa abordagem fortaleceu a suposição de Ehrlich de que pequenas moléculas (embora neste caso não sejam direcionadas) podem ser usadas no tratamento do câncer (STREBHARDT *et al.*, 2008).

Diversas drogas que interagem com o DNA, por exemplo por intercalação, vêm sendo utilizadas com grande potencial quimioterápico como a Cisplatina, a

Capítulo 1

Doxorubicina e a Dacarbazina. As combinações desses quimioterápicos com compostos mais específicos mostram um aumento na sobrevida dos pacientes. Por exemplo, no tratamento combinado de Dacarbazina com Cisplatina, Vimblastina, Interferon- α e Interleucina-2 (IL-2), 21% dos pacientes alcançaram resposta completa ao tratamento e 43% apresentaram resposta parcial com duração média de 6 meses. Por outro lado, o custo de cada ampola de dacarbazina de 200 mg – em torno de 250,00 reais – por vezes inviabiliza a continuidade do tratamento (NASCIMENTO *et al.*, 2018b).

O modo como essas drogas interagem com o DNA compartilha basicamente do mesmo mecanismo de ação. Ao interagir com a molécula de DNA, esses compostos podem inibir processos de transcrição e tradução, levando à ativação de vias de sinalização que induzem a morte celular programada (OLIVEIRA, 2019).

Um medicamento pode interagir com moléculas de DNA de várias maneiras: por intercalação, ligação ao sulco menor ou maior, ligação covalente e ligação eletrostática. Experimentos de alongamento de molécula única, como os realizados com pinças ópticas e / ou magnéticas, estão sendo muito utilizados nos últimos anos para caracterizar as interações entre o DNA e as pequenas moléculas. A ideia básica desses experimentos é monitorar as alterações nas propriedades mecânicas do DNA induzido pelo fármaco após a interação (NASCIMENTO *et al.*, 2018b).

Antraciclinas (como a doxorubicina, por exemplo) intercalam entre pares de bases de ácidos nucleicos e interrompem o reparo do DNA mediado pela topoisomerase-II. Essa interação impede que a dupla hélice do DNA seja unida novamente, inibindo a replicação do mesmo. Os taxanos (paclitaxel e docetaxel) atuam sobre a tubulina, e estabilizam o polímero do microtúbulo, protegendo-o da desmontagem. Como resultado, ocorre o bloqueio da mitose e a reversão do ciclo celular para a fase G0. Os agentes alquilantes (dacarbazina, cisplatina, oxaliplatina e carboplatina – que são drogas de platina e ciclofosfamida) formam ligações cruzadas de DNA entre e intra-cadeias. Este processo é irreversível e leva à apoptose. A gencitabina atua como antimetabólito das pirimidinas (citosina (C), timina (T) e uracila (U)), competindo com o mesmo sítio de ligação, levando a parada do ciclo. A trabectedina se liga ao sulco menor do DNA, fazendo com que a hélice do DNA se incline em direção ao sulco maior, o que causa a inibição da transcrição (LARIONOVA *et al.*, 2019). Os derivados de dibenzoilmetanos têm sido avaliados quanto a sua

Capítulo 1

capacidade de interação ao DNA, e demonstrou-se que um de seus derivados, o DPBP, interage diretamente com o DNA por ligação ao sulco menor, alterando localmente a estrutura da dupla hélice, e, podendo, portanto, levar ao comprometimento de processos fundamentais como replicação ou transcrição do DNA (NASCIMENTO *et al.*, 2018b).

No entanto, as populações de células tumorais apresentam resistência à maioria dos fármacos empregados na quimioterapia. A concentração do produto que inibe 50% do crescimento celular (IC_{50}) geralmente é alta, e o índice de seletividade (IS) apresentado pela maioria das drogas, é baixo, gerando alta toxicidade a órgãos vitais, levando a efeitos colaterais que podem culminar na morte do paciente.

1.2.3. Resistência multidrogas

A resistência das células tumorais às drogas citotóxicas é a principal causa de falha da quimioterapia. Essa resistência pode ser intrínseca ou adquirida, e é um reflexo de inúmeras alterações genéticas e epigenéticas (ZELLER *et al.*, 2010). A resistência intrínseca é caracterizada pela falta de sensibilidade ao medicamento desde o início do tratamento, levando ao efluxo da substância por transportadores na membrana celular. Já a resistência adquirida, pode se desenvolver pela exposição contínua a medicamentos, que podem desencadear o bloqueio de vias apoptóticas, o aumento da capacidade da célula em reparar seu DNA, alterações nos pontos de controle do ciclo celular ou indução de genes específicos (PETERS, 2018).

Os medicamentos antineoplásicos tem como principal alvo o DNA, atuando na ativação ou no silenciamento da expressão gênica (HURLEY, 2002). Para isso, as drogas precisam penetrar em uma barreira celular importante: a membrana plasmática – que neste caso, atua como uma defesa física a muitas classes de drogas (ALVES *et al.*, 2016).

Dentre os mecanismos de resistência a medicamentos, o predominante nas células cancerígenas, e possivelmente o mais estudado, é o efluxo de drogas. O efluxo de moléculas é realizado por uma superfamília de proteínas transmembranares dependentes de ATP, conhecidas como transportadores ABC (*ATP binding cassette*) (GENOVESE *et al.*, 2017). Esses transportadores usam a energia da hidrólise do ATP para expulsar ativamente os agentes terapêuticos da célula. A principal proteína da família ABC é a glicoproteína P (P-gp), codificada pelo gene ABCB1 ou MDR1

Capítulo 1

(proteína de resistência a múltiplas drogas 1), e superexpressa em tecidos tumorais. Essa proteína é capaz de remover aproximadamente 20 drogas citostáticas da célula, incluindo paclitaxel, doxorrubicina e vincristina (JANUCHOWSKI *et al.*, 2013).

Além da P-gp, outra proteína amplamente investigada é a MRP1 (proteína 1 associada à resistência a múltiplas drogas). O aumento da expressão de MRP1 nas células cancerígenas está fortemente associado à capacidade das mesmas de migrar e formar um tumor secundário (ZÖCHBAUER-MÜLLER *et al.*, 2001). Além disso, em vários tipos de câncer, as proteínas da família BCL-2, Akt e outras proteínas antiapoptóticas são altamente expressas, e moduladores de transcrição como o fator nuclear kappa β (NF- κ B) possuem atividade aberrante. Dessa forma, a quimiorresistência e a imunossupressão induzidas pela quimioterapia, podem resultar na recidiva de tumores e na diminuição da sobrevida em pacientes com câncer (NIERO, 2014; LARIONOVA *et al.*, 2019).

Nas últimas décadas, grande esforço foi dedicado para o desenvolvimento de sistemas de administração de medicamentos baseados em nanopartículas (NP), principalmente para contornar as dificuldades do transporte de drogas para as células cancerígenas (GAO *et al.*, 2012). Abordagens recentes incluem o uso de drogas anticâncer em combinação com pequeno RNA interferente ou microRNA, que podem sensibilizar células resistentes à quimioterapia, silenciando a expressão de genes multirresistentes (CHEN *et al.*, 2009). Além disso, combinações de genes e terapia medicamentosa têm sido amplamente investigadas para superar a resistência aos medicamentos (ZABOIKIN *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2017; SALGIA *et al.*, 2018).

1.3. EXTRATO DE *MORUS NIGRA*

A amoreira-preta (*Morus nigra* L.), pertencente à família Moraceae, é nativa do sudoeste da Ásia, e é largamente utilizada na medicina popular chinesa (PAWLOWSKA *et al.*, 2008). O gênero *Morus* possui pelo menos 24 espécies e uma subespécie, com aproximadamente 100 variedades. A espécie *M. nigra* foi trazida para o Brasil pelos imigrantes japoneses, e se adaptou bem às condições de clima e solo do país (PADILHA *et al.*, 2009).

A árvore caducifólia pode atingir de 5 a 20m de altura, com folhas grossas e frutos negros comestíveis de sabor agridoce. Suas folhas possuem grande importância econômica, por serem utilizadas como alimento para o bicho da seda

Capítulo 1

(*Bombyx mori* L.) em países do oriente (PORNANONG *et al.*, 2010). Além disso, as folhas são utilizadas na forma de chá para o tratamento de diabetes, colesterol, problemas cardiovasculares e obesidade, devido suas ações diuréticas, hipoglicemiante e hipotensoras (OLIVEIRA *et al.*, 2013). A casca da raiz é utilizada como anti-inflamatório, antitússígeno e antitérmico (PAWLOWSKA *et al.*, 2008). O fruto é utilizado para o tratamento de doenças hepáticas e renais. Além disso, as amoras podem ser consumidas *in natura* ou para o preparo de doces, geleias, vinagres, sucos, vinhos e produtos cosméticos (LIM *et al.*, 2019).

As plantas pertencentes ao gênero *Morus* são ricas em compostos fenólicos, tais como, flavonoides, antocianinas e carotenoides, responsáveis pelas propriedades antioxidante, antitumoral e antiinflamatória (PADILHA *et al.*, 2010). Devido ao seu rico conteúdo de antocianina, os frutos de *M. nigra* em particular, exibem maior atividade antioxidante do que as outras espécies de *Morus* (TURAN *et al.*, 2017). Segundo o estudo de Pawlowska e colaboradores (2008), a fração de antocianinas do fruto da amoreira-preta é constituída por quatro compostos principais: (66,3%) cianidina 3-O-glicosídeo, (27,8%) cianidina 3-O-rutinosídeo, (4,4%) pelargonidina 3-O-glicosídeo e (1,5%) pelargonidina 3-O-rutinosídeo.

O extrato etanólico das folhas de *M. nigra* utilizado no presente trabalho, foi preparado por maceração exaustiva, onde o material vegetal foi deixado em contato com álcool etílico comercial 96% durante 7 dias. Após este período, o material foi filtrado em papel de filtro e o extrato foi obtido em evaporador rotatório a baixa pressão. Em um estudo prévio, (BAÊTA, 2014) observou que este extrato etanólico de *Morus nigra* apresenta boa atividade antimicrobiana contra cepas de *Staphylococcus aureus*. Mais tarde, Miranda, 2017, demonstrou que o mesmo extrato de *M. nigra* possui atividade anticancerígena contra células de melanoma murino.

1.4. DERIVADOS DE SULFONAMIDAS

Em 1932, o patologista Gerhard Domagk observou os efeitos do corante vermelho Prontosil em infecções por *Streptococcus sp.* em camundongos. O agente ativo do Prontosil era a sulfanilamida, e esse foi o primeiro medicamento a tratar infecções bacterianas com sucesso e o primeiro de muitos medicamentos com sulfa – precursores de antibióticos (YOUSEF *et al.*, 2018). Essas substâncias têm comprovada ação antibacteriana, diurética, antidiabética, antitireoidiana, anti-

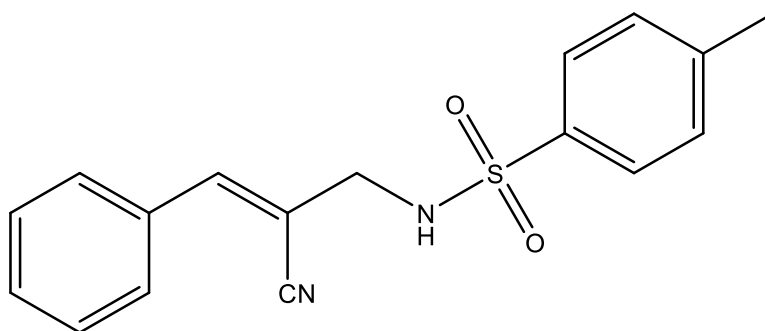
Capítulo 1

hipertensiva e antiviral (HANSCH, 2003), e nos últimos anos, novos derivados de sulfonamida têm demonstrado consideráveis atividades antitumorais (OWA *et al.*, 1999; CRESPO *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2012).

A reação de *Morita-Baylis-Hillman* (MBH) é uma estratégia bem conhecida em síntese orgânica para a formação de ligações C-C, decorrentes de um acoplamento entre aldeídos ou cetonas, e uma olefina com um grupo retirador de elétrons. Esta reação é bem reportada em literatura, podendo encontrar moléculas com diversas atividades biológicas, como antifúngica, bactericida, antileishmania e antitumoral (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2010; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012).

Dessa forma, um grupo de pesquisadores do programa de pós-graduação em Agroquímica da Universidade Federal de Viçosa realizou a síntese e caracterização de uma série de alilsulfonamidas, que são compostos derivados de sulfonamidas e adutos de MBH. Alguns destes compostos já foram publicados e mostraram atividade contra o fungo fitopatogênico *Colletotrichum gloeosporioides* (TAVARES, 2013), porém sua atividade citotóxica ainda não é bem conhecida. Neste trabalho, uma das alilsulfonamidas, o composto de código BHCN (FIGURA 3), foi selecionado para uma primeira análise citotóxica e parece ser um candidato promissor a quimioterápico.

Figura 3 – Alilsulfonamida BHCN, de nome IUPAC (Z)-N-(2-ciano-3-fenilalil)4-metilbenzenossulfonamida e de fórmula molecular $C_{17}H_{16}N_2O_2S$



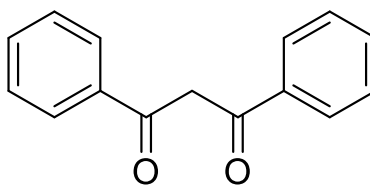
Fonte: Autora (2021).

Capítulo 1

1.5. DERIVADOS DE β -DICETONAS

Dentre as diversas classes de compostos descritos na literatura com atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*, encontram-se os dibenzoilmetanos (DBM) – 1,3-difenilpropano-1,3-diona (FIGURA 4). Essas substâncias pertencentes à classe dos flavonoides, são raramente encontrados na natureza, e têm sido isolados de algumas espécies de *Lonchocarpus*. Essas por sua vez, ocorrem em formações florestais geralmente associadas às margens de rios, como as famílias de *Annonacea*, *Asteracea*, *Menispermaceae*, *Rosaceae*, *Salicaceae* e, especialmente, *Fabaceae* que apresentam distribuição ampla em todo o Brasil (NOGUEIRA *et al.*, 2003).

Figura 4 – Estrutura química do DBM

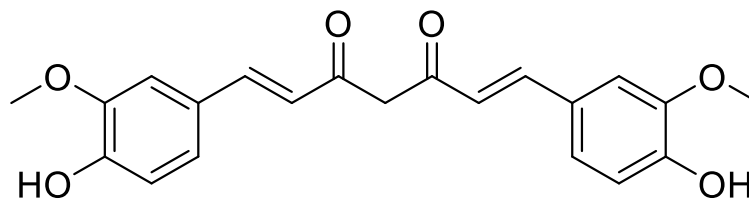


Fonte: Autora (2021).

A curcumina [1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-hepta-1,6-dieno-3,5-diona], pigmento que compõe majoritariamente os rizomas do arbusto perene *Curcuma longa* L., tem como princípio ativo o diferuloilmetano (FILHO *et al.*, 2000; HEWLINGS *et al.*, 2017). Originária da Índia, essa espécie pertence à família de plantas Zingiberaceae, e é conhecida popularmente no Brasil como açafrão-da-terra (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015). Um documento do Ministério da Saúde (BRASIL, 2015b), listou ação antioxidante, potencial anticâncer, propriedades antimicrobianas e atividade anti-inflamatória como sendo as principais propriedades farmacológicas *in vitro* da curcumina (FIGURA 5). Por se mostrarem potentes agentes farmacológicos com diversas propriedades como fotoproteção e atividades anti-inflamatória, antitumoral e antiviral, os derivados de β -dicetonas têm sido foco de estudos (NETO *et al.*, 2006; NOGUEIRA *et al.*, 2003).

Capítulo 1

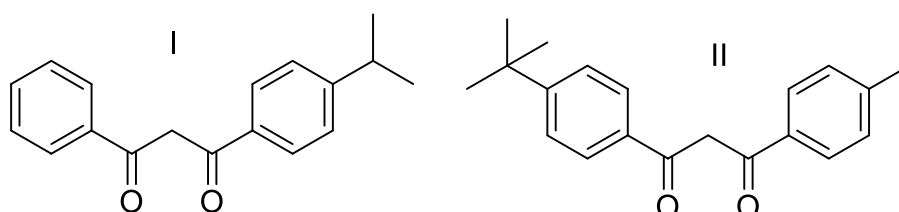
Figura 5 – Estrutura química da curcumina



Fonte: Autora (2021).

Os derivados de dibenzoilmetanos (DBM) Parsol® 1789 (butil-metoxi-dibenzoilmetano) e Eusolex® 8020 (4-isopropil-dibenzoilmetano), são amplamente utilizados na indústria cosmética como componentes de filtros solares, sendo, em sua maioria, muito eficientes contra radiação UVA, por prevenir sua penetração nas células (MOTLEY *et al.*, 1989). Nogueira e colaboradores (2003), realizaram a síntese e a caracterização de dezenove compostos derivados de Eusolex® 8020 e Parsol® 1789 (FIGURA 6).

Figura 6 – Estruturas química do Eusolex® 8020 (I) e o Parsol® 1789 (II)



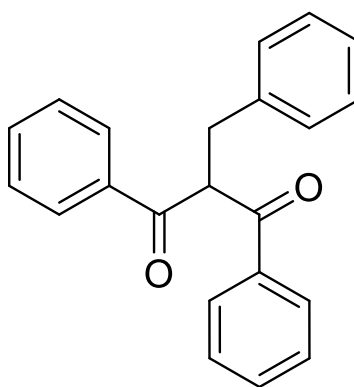
Fonte: Autora (2021).

A atividade antitumoral e citotóxica dos derivados sintéticos de Eusolex® 8020 e Parsol® 1789 foi avaliada em quatro linhagens celulares de câncer humano: MCF-7 (adenocarcinoma mamário), NCI-ADR (adenocarcinoma seroso ovariano de alto grau – que expressa fenótipo de resistência a múltiplas drogas), NCI-H460 (carcinoma pulmonar) e UACC-62 (melanoma). Espectroscopias de absorção revelaram que essas substâncias podem ser usadas como protetores solares contra a radiação UV. Além disso, um dos compostos apresentou IC₅₀ menor do que o apresentado pelo composto doxorrubicina (agente quimioterápico de ampla utilização) para melanoma (OLIVEIRA, 2019).

Capítulo 1

Em trabalhos previamente desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa, foram descritos derivados do DBM com atividade antimelanoma *in vitro* e *in vivo* com valores de IC₅₀, IC₉₀ e índices de seletividades (IS) robustos, sem a observação de efeitos tóxicos nos testes avaliados. Nos ensaios de pinça óptica foi possível observar que o 1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona (DPBP) (NASCIMENTO *et al.*, 2018b) apresenta capacidade de interagir diretamente com a molécula de DNA e iniciar uma cascata de sinalização que culmina em morte celular por apoptose, com alta especificidade a células tumorais murinas (FIGURA 7).

Figura 7 – Estrutura do composto sintetizado 1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona (DPBP)



Fonte: Autora (2021).

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi testar se esse composto também apresenta seletividade em células tumorais humanas. Além disso, a possibilidade de testar compostos sintéticos inéditos e compostos naturais em linhagens tumorais variadas tem mostrado ser uma estratégia promissora para o tratamento do câncer. Sendo assim, no presente trabalho, a hipótese a ser testada sugere que os tratamentos com o extrato de *Morus nigra*, com o derivado de sulfonamida (BHCN), e com os derivados de β -dicetonas (curcumina e DPBP), são seletivos para células tumorais humanas – ou seja, se apresentam IC₅₀ baixo e IS alto.

Capítulo 1

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito citotóxico do extrato etanólico de amora, do composto derivado de sulfonamida (BHCN), e dos derivados de β -dicetonas (curcumina e DPBP) em linhagens celulares humanas normais e tumorais.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Obter o valor da concentração inibitória de 50% (IC_{50}) e de 10% (IC_{10}) dos compostos selecionados;
- b) Calcular o Índice de Seletividade (IS) dos compostos a partir do IC_{50} .
- c) Estimar o perfil farmacocinético e toxicológico dos compostos.

Capítulo 1

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CULTIVO CELULAR

Linhagens celulares de epitélio normal de rim de macaco – VERO (Yasumura *et al.*, 1963), epitélio normal de rim humano embrionário – HEK293 (ATCC® CRL-1573™) e a linhagem de adenocarcinoma de cólon humano – HT29 (ATCC HTB-38™) cedida pela Dra. Ana Lúcia T. G. Ruiz da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Campinas, foram cultivadas em meio DMEM, alta glicose, e/ou RPMI 1640 suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB), ampicilina 100U/mL e estreptomicina 0,1mg/mL (todos Sigma Aldrich). Os frascos de cultura de poliestireno de cada linhagem foram mantidos em incubadora (MCO-18AC Panasonic, U.S. Canada) a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa (condições padrão de cultivo celular). Quando as culturas atingiam a subconfluência, as mesmas eram lavadas em solução PBS-EDTA (2g.L⁻¹) (Sigma-Aldrich) e removidas com solução de tripsina-EDTA (2,5g.L⁻¹) (Sigma-Aldrich), replaqueadas para manutenção e experimentação ou congeladas em N₂ líquido.

3.2. CURVA DE CRESCIMENTO

Após formar uma monocamada subconfluente de células nas garrafas de cultivo, as linhagens celulares foram submetidas ao processo de tripsinização. Em seguida foi analisada a viabilidade celular das mesmas, por meio da aplicação do corante vital Azul de Tripán e contagem das células na câmara de *Neubauer*. Com a viabilidade celular superior a 90%, as linhagens foram plaqueadas a 5×10⁴ células/poço em três placas de 6 poços (triplicata). Após um intervalo de 24 horas, três poços, selecionados ao acaso (um de cada placa), foram tripsinizados e contados na câmara de *Neubauer*. Esse procedimento foi repetido por 8 dias consecutivos. Para o cálculo da percentagem de células viáveis foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de células viáveis} = \frac{\text{Número de células viáveis}}{\text{Número total de células}} \times 100$$

Uma vez obtida a média do número de células viáveis para cada tempo específico, foram calculados os tempos de duplicação de cada linhagem utilizando-se os dados da fase exponencial de crescimento.

Capítulo 1

$$PDT = (t_2 - t_1) \times \frac{\log(2)}{\log q_2/q_1}$$

Onde: PDT é o tempo de duplicação; t_2 é o tempo da última contagem celular; t_1 é tempo da contagem anterior; q_1 e q_2 são as quantidades de células encontradas em cada tempo utilizado para o cálculo.

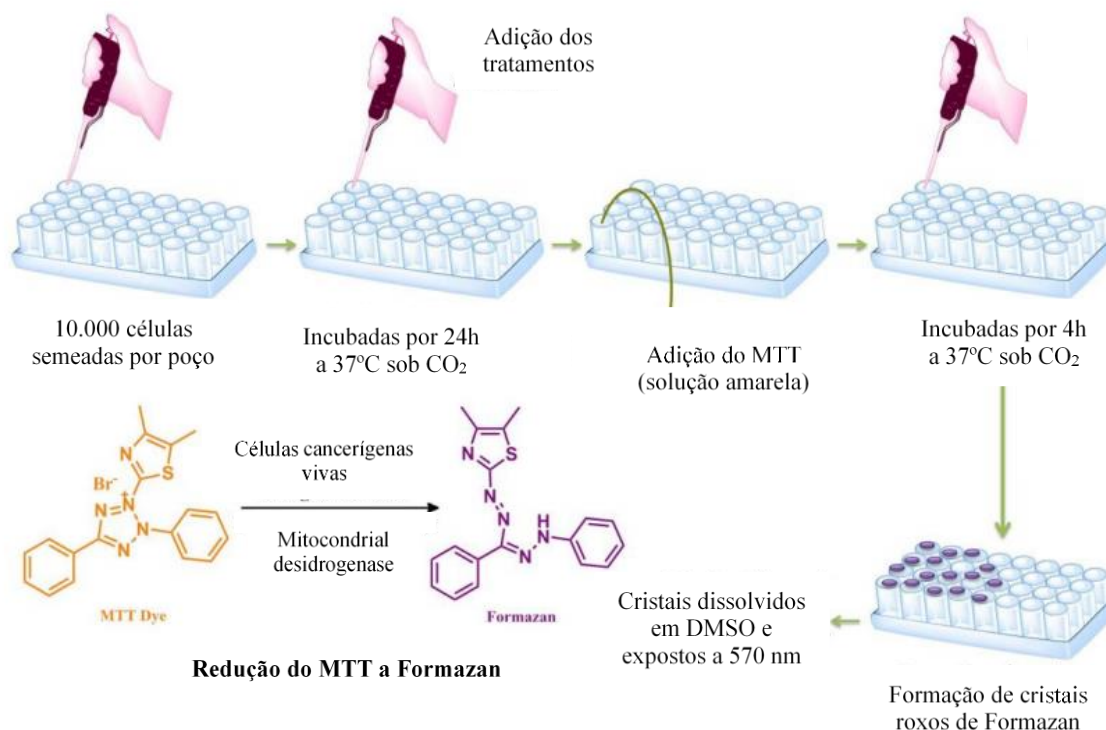
3.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DO COMPOSTO MEDIDA PELO ENSAIO DO MTT

A sobrevivência/proliferação celular foi mensurada por meio do ensaio do MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio). Para as linhagens celulares descritas anteriormente, foi avaliada a atividade citotóxica de cada um dos compostos para obtenção e/ ou confirmação da IC_{50} e IC_{10} das mesmas. Para tanto, as células foram semeadas em placas de 96 poços (1×10^4 células/mL para as linhagens Melan-a, VERO, HT29 e B16F10, e 3×10^4 para a linhagem HEK293) e cultivadas por 24h sob condições padrão de cultivo celular. Em seguida, as placas foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos DPBP, BHCN, curcumina e extrato de amora, e incubadas por 60 horas. As diferentes concentrações dos compostos foram obtidas a partir da diluição em série em dimetilsulfóxido (DMSO) e meio de cultura completo (MC), com concentrações entre 6,25µg/mL e 800 µg/mL, de forma que a concentração de DMSO não ultrapassasse 0,5% do volume total final. Para cada concentração do composto e para cada linhagem celular, foram utilizadas sete repetições (poços) por placa, cada experimento foi repetido 3 vezes. Os controles deste ensaio (100% de células viáveis) foram realizados com MC contendo 0,5% de DMSO (v/v).

Após exposição aos tratamentos específicos, o meio contendo as drogas foi removido e a cada um dos poços foi adicionado MC contendo 10% de solução MTT (3-[4,5- dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio bromido) a 0,5 mg/mL. As placas foram incubadas por 4h a 37°C. O meio foi removido e os cristais de Formazan foram dissolvidos em DMSO. A sobrevivência/proliferação celular foi avaliada a partir dos valores de absorbância das amostras obtidos em espectrofotômetro no comprimento de onda de excitação a 570 nm (FIGURA 8).

Capítulo 1

Figura 8 – Ensaio de Citotoxicidade pelo método de MTT



Fonte: Adaptado de PARIKH (2016).

O valor da concentração inibitória de 50% (IC₅₀) e de 10% (IC₁₀) da população para os compostos foram calculados por meio de uma regressão não-linear log [Dose] versus Resposta Normalizada (porcentagens de células viáveis), utilizando os programas GraphPad Prism® 5.0 e Microsoft Office Excel 2013®.

O índice de seletividade (IS) de cada um dos compostos foi calculado a partir de seu IC₅₀. O IS indica a seletividade de um composto entre uma linhagem neoplásica e uma linhagem normal, e consequentemente, o potencial uso terapêutico desse composto em testes clínicos. Assim, neste estudo, o IS corresponde à divisão entre o valor da IC₅₀ do composto sobre a linhagem de células normais (Melan-A, VERO ou HEK293) e o valor da IC₅₀ do composto sobre a linhagem de células neoplásicas (B16F10 ou HT29), ou seja:

$$IS = \frac{IC_{50_{linhagem\ normal}}}{IC_{50_{linhagem\ neoplásica}}}$$

Capítulo 1

3.4. PERFIL FARMACOCINÉTICO E TOXICOLÓGICO

Para uma abordagem *in silico*, inicialmente a estrutura química de cada um dos compostos foi desenhada no programa ChemDraw e assim foi obtido a linha de código SMILE (*Simplified Molecular Input Line Entry Specification*) da molécula, essa linha de código foi utilizada para a determinação do perfil farmacocinético e toxicológico. Dois algoritmos de Predição de Correlação Quantitativa Estrutura-Atividade (QSAR) foram utilizados para traçar um perfil do composto. O primeiro, preditivo para toxicológica modular da plataforma LAZAR *in silico toxicology* (<https://lazar.in-silico.ch/predict>) (MAUNZ *et al.*, 2013) se baseia na similaridade de estruturas químicas. Já a predição dos parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) foram determinados utilizando o algoritmo farmacocinético pkCSM (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsml/prediction>) (PIRES *et al.*, 2015).

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística de três experimentos independentes foi realizada com o programa GrafPad Prism 5 (*GraphPad Software*, San Diego, CA, EUA). Foram considerados significativos os dados cujo *p value* (*p*-valor) sejam inferiores a 0,05.

Capítulo 1

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

O teste de avaliação citotóxica foi realizado com a linhagem tumoral HT29 e com as linhagens normais VERO e HEK293. A taxa de mortalidade celular em função da concentração do composto para as linhagens celulares está representada nas figuras abaixo: extrato etanólico de amora (FIGURA 9) – curcumina (FIGURA 10) – BHCN (FIGURA 11) e DPBP (FIGURA 12).

As concentrações das porcentagens de morte celular correspondentes a 50% (IC_{50}) da população total de células estão representadas nas tabelas a seguir: extrato de amora (TABELA 1) – curcumina (TABELA 2) – BHCN (TABELA 3) e DPBP (TABELA 4). O valor de IC_{50} foi calculado utilizando uma regressão não linear, log (da concentração do composto em $\mu\text{g/mL}$) x resposta normalizada. Nas tabelas também estão representados os valores do coeficiente de determinação da regressão (R^2). Foi possível calcular também os valores de concentrações equivalentes às porcentagens de morte celular correspondentes a 10% (IC_{10}) da população total de células, utilizando a equação da reta, abaixo, onde X representa o logaritmo da concentração ($\log []$) em $\mu\text{g/mL}$ e Y representa a porcentagem de morte celular.

$$y = \frac{100}{1 + 10^{(LogIC_{50} - X) * HillSlope}}$$

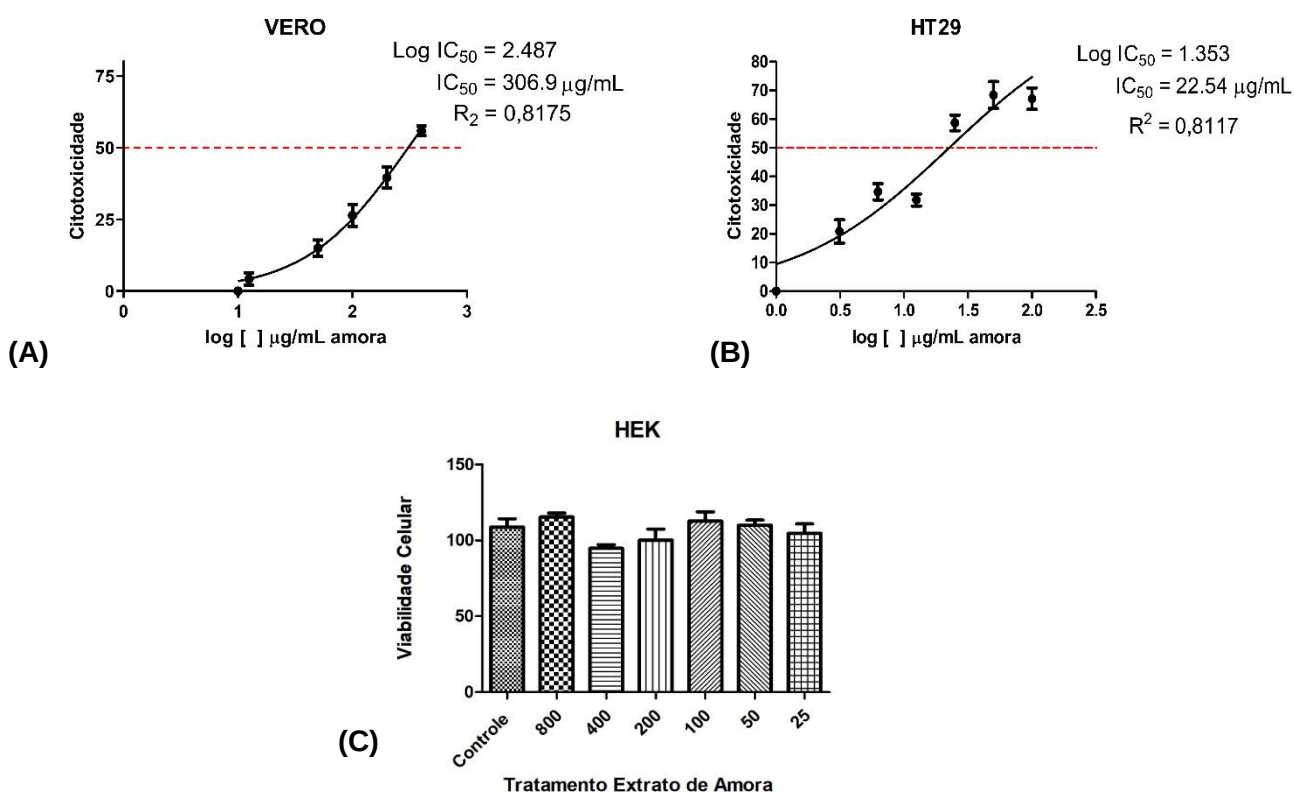
Na FIGURA 9, é possível observar a taxa de mortalidade celular em função do logaritmo da concentração do extrato etanólico de amora. O gráfico (A) demonstra o tratamento da linhagem celular normal VERO, e o gráfico (B) demonstra o tratamento da linhagem tumoral HT29. Em (C) o gráfico de barras demonstra a taxa de viabilidade celular da linhagem normal HEK293 após o tratamento com o extrato.

A concentração que mata 50% das células (IC_{50}) de HT29 é provavelmente inferior à concentração que mata 10% (IC_{10}) das células da linhagem VERO, portanto, o extrato etanólico de amora é considerado seletivo. Essa informação é bastante relevante por sugerir que pode ser administrada a concentração IC_{50} das células tumorais sem que a população de células normais seja afetada de maneira drástica.

Capítulo 1

Em relação à linhagem normal HEK293, o extrato etanólico de amora não demonstrou toxicidade, e como é observado no gráfico C, o tratamento com a maior concentração do extrato (800 µg/mL) levou, inclusive, a uma pequena taxa de proliferação celular. Dessa forma, com as concentrações testadas, não foi possível calcular o valor da IC₅₀ para HEK293. Além disso, devido à grande variação gerada pela presença de vários compostos no extrato, foi possível analisar a presença de dois valores de IC₅₀ (uma em uma concentração mais alta e outra em uma concentração mais baixa). No gráfico B, por exemplo, essa variação gerou vários pontos fora da curva para o cálculo de IC₅₀ de HT29. Como é mais vantajoso para o organismo a ingestão de drogas em uma quantidade menor, foi considerada para o cálculo de IS, apenas a concentração mais baixa do valor de IC₅₀.

Figura 9 – Tratamento das linhagens celulares com o extrato etanólico de amora



Legenda: Gráficos de Regressão não-linear log [Dose] versus Resposta Normalizada. (A) Citotoxicidade do extrato de amora para a linhagem normal VERO; (B) Citotoxicidade do extrato de amora para a linhagem tumoral HT29. Análise estatística Qui quadrado para tendência, $p < 0,001$ (C) Viabilidade das células normais HEK293 tratadas com extrato de amora. Eixo x= log [] do composto em µg/mL; eixo y= % de morte/viabilidade celular.

Na TABELA 1, percebe-se que a linhagem normal VERO (IC₅₀ = 306,9 ± 54,9 µg/mL) é mais resistente frente ao composto em relação a linhagem tumoral HT29

Capítulo 1

($IC_{50} = 22,54 \pm 5,38 \mu\text{g/mL}$). Evidenciando assim, a seletividade do extrato natural de amora por células tumorais de CCR.

Tabela 1 – Concentrações letais do extrato etanólico de amora

Tipo celular	VERO	HT29
$IC_{50} (\mu\text{g/mL})$	$306,9 \pm 54,9$	$22,54 \pm 5,38$
R^2	0,8175	0,8117
Inclinação da reta	0,9701	0,7258

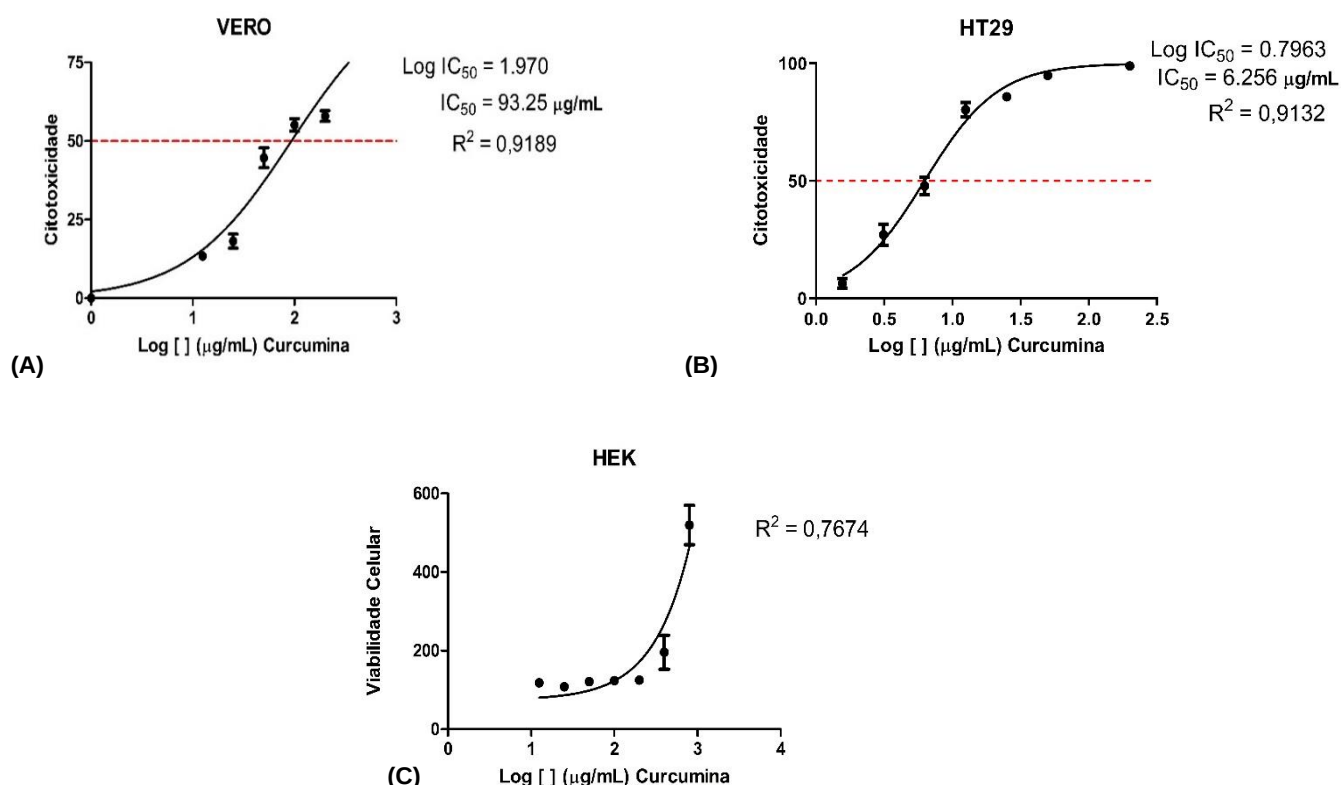
Fonte: Autora (2021).

Na FIGURA 10, foi analisada a taxa de mortalidade celular em função do logaritmo da concentração do composto curcumina. No gráfico A, é representado o tratamento da linhagem normal VERO, e no gráfico B, o tratamento da linhagem tumoral HT29. A concentração que mata 50% das células (IC_{50}) de HT29 ($6,25 \mu\text{g/mL}$), é próxima à concentração que mata 10% (IC_{10}) de células VERO ($6,37 \mu\text{g/mL}$), ou seja, se administrado próximo a essa concentração de $6 \mu\text{g/mL}$ o composto afeta mais células tumorais do que células normais, e portanto, o mesmo também pode ser considerado seletivo.

O gráfico C mostra a taxa de viabilidade celular da linhagem normal humana HEK293 tratada com curcumina. O tratamento não causou a morte celular de HEK293 em nenhuma das concentrações testadas. Dessa forma, não foi possível calcular a IC_{50} de curcumina para essa linhagem.

Capítulo 1

Figura 10 – Tratamento das linhagens celulares com o composto curcumina



Legenda: Gráficos de Regressão não-linear log [Dose] versus Resposta Normalizada. (A) Citotoxicidade de curcumina para a linhagem normal VERO; (B) Citotoxicidade de BHCN para a linhagem tumoral HT29; (C) Viabilidade das células normais HEK293 tratadas com BHCN. Eixo x= log [] do composto em $\mu\text{g/mL}$; eixo y= % de morte celular/viabilidade.

Na TABELA 2 percebe-se que a linhagem VERO ($IC_{50} = 93,25 \pm 11,55 \mu\text{g/mL}$) é mais resistente frente ao composto em relação a linhagem HT29 ($IC_{50} = 6,256 \pm 0,614 \mu\text{g/mL}$). Evidenciando assim, a eficiência do tratamento com curcumina para o CCR.

Tabela 2 – Concentrações letais do composto curcumina

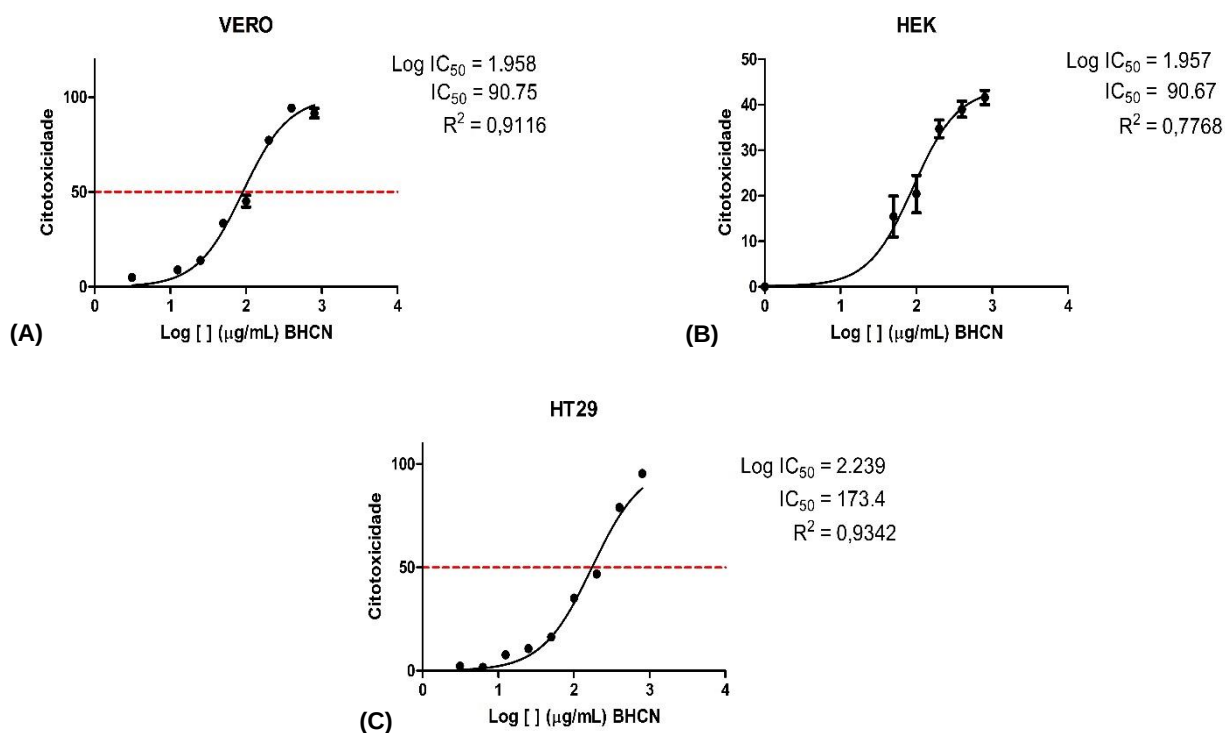
Tipo celular	VERO	HEK293	HT29
$IC_{50} (\mu\text{g/mL})$	$93,25 \pm 11,55$	Não calculado	$6,25 \pm 0,614$
$IC_{50} (\mu\text{M})$	2,53	Não calculado	1,69
Log IC_{50}	1,970	Não calculado	0,7963
R^2	0,9189	0,7674	0,9132
Inclinação da reta	0,05559	Não calculado	0,1034
$IC_{10} (\mu\text{g/mL})$	6,37	Não calculado	3,70

Fonte: Autora (2021).

Capítulo 1

A FIGURA 11 representa a taxa de mortalidade celular em função do logaritmo da concentração do composto BHCN nas linhagens normais VERO (A) e HEK293 (B) e na linhagem tumoral HT29 (C). A análise dos tratamentos com BHCN demonstrou que o composto não é seletivo para o câncer colorretal. Isso porque, a concentração necessária para matar 50% das células tumorais HT29 é superior à concentração necessária para matar 50% das células normais VERO e HEK293. Portanto, se uma dose desse composto for administrada no organismo do paciente, mais células saudáveis do que células cancerosas poderão ser afetadas, podendo causar ao indivíduo inúmeros efeitos colaterais.

Figura 11 – Tratamento das linhagens celulares com o composto BHCN



Legenda: Gráficos de Regressão não-linear log [Dose] versus Resposta Normalizada. (A) Citotoxicidade de BHCN para a linhagem normal VERO; (B) Citotoxicidade de BHCN para a linhagem normal HEK293; (C) Citotoxicidade de BHCN para a linhagem tumoral HT29. Eixo x= log [] do composto em $\mu\text{g/mL}$; eixo y= % de morte celular.

Na TABELA 3, nota-se que a linhagem HT29 ($IC_{50} = 173,4 \pm 11,3 \mu\text{g/mL}$) é mais resistente frente ao composto BHCN em relação às linhagens VERO ($IC_{50} = 90,75 \pm 7,39 \mu\text{g/mL}$) e HEK293 ($IC_{50} = 90,67 \pm 33,43 \mu\text{g/mL}$), e por isso, não deve ser administrada no tratamento do CCR.

Capítulo 1

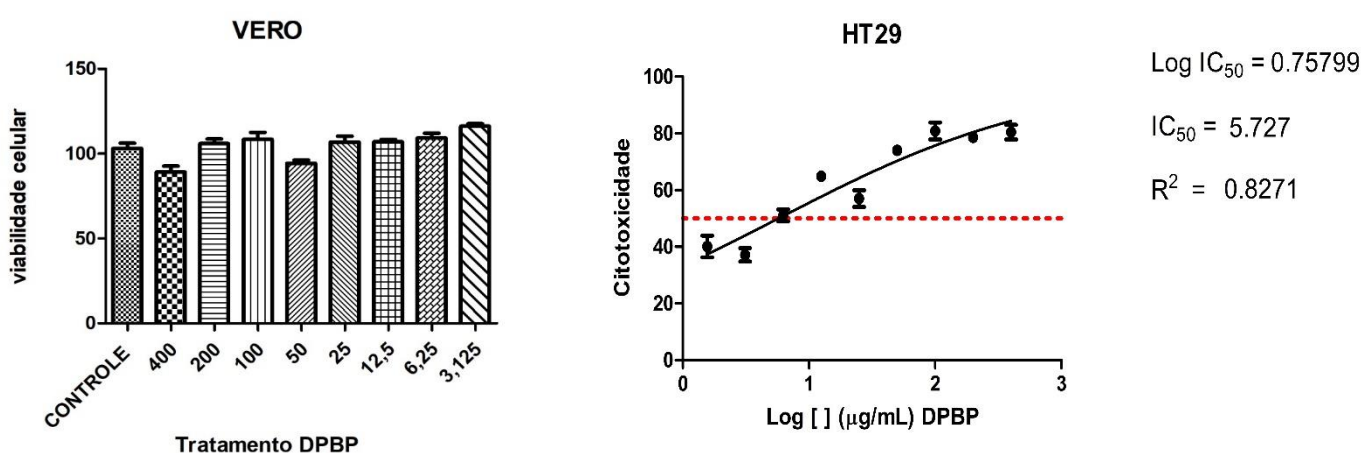
Tabela 3 – Concentrações letais do composto BHCN

Tipo celular	VERO	HEK293	HT29
IC ₅₀ (µg/mL)	90,75 ± 7,39	90,67 ± 33,43	173,4 ± 11,3
IC ₅₀ (µM)	2,905	2,902	5,550
Log IC ₅₀	1,958	1,957	2,239
R ²	0,9116	0,7768	0,9342
Inclinação da reta	1,433	1,467	1,314
IC ₁₀ (µg/mL)	19,59	20,25	32,56

Fonte: Autora (2021).

Na FIGURA 12, foi analisada no gráfico de barras A, a viabilidade celular da linhagem normal VERO tratada com DPBP, e no gráfico B, a taxa de mortalidade celular da linhagem tumoral HT29 em função do logaritmo da concentração do composto DPBP. Os ensaios com a linhagem normal HEK293 não apresentaram reprodutibilidade, e por isso, não foram mostrados aqui. Como pôde ser observado, o composto não matou a célula normal em nenhuma das concentrações testadas, e a concentração que matou 50% das células (IC₅₀) tumorais foi muito baixa. Isso significa que a administração de uma pequena concentração do composto DPBP pode matar as células tumorais de CCR, sem afetar as células normais do organismo, e por isso, é possível afirmar que o mesmo é seletivo.

Figura 12 – Tratamento das linhagens celulares com o composto DPBP



Legenda: Análise estatística Qui quadrado para tendência, $p < 0,001$ (A) Viabilidade das células normais VERO tratadas com DPBP. Gráfico de Regressão não-linear log [Dose] versus Resposta Normalizada. (B) Citotoxicidade do composto DPBP para a linhagem tumoral HT29. Eixo x= log [] do composto em µg/mL; eixo y= % de morte/viabilidade celular.

Capítulo 1

A TABELA 4 apresenta a $IC_{50} = 5,72 \pm 1,95 \mu\text{g/mL}$ para a linhagem tumoral HT29. Uma vez que não foi possível o cálculo do IC_{50} para a linhagem normal VERO, pode-se supor que este seria bastante superior ao utilizado nos experimentos realizados. Assim, pode-se inferir que o composto DPBP é promissor para o tratamento do CCR.

Tabela 4 – Concentração letal do composto DPBP

Tipo celular	HT29
$IC_{50} (\mu\text{g/mL})$	$5,72 \pm 1,95$
$IC_{50} (\mu\text{M})$	1,815
$\text{Log } IC_{50}$	0,7579
R^2	0,8271
Inclinação da reta	0,3978
$IC_{10} (\mu\text{g/mL})$	0,02

Fonte: Autora (2021).

Tal resultado corrobora com estudos prévios realizados por pesquisadores de nosso grupo de pesquisa, que demonstram que o composto DPBP é seletivo para o melanoma murino, apresentando um IC_{50} de valor aproximado, sendo Melan-A ($IC_{50} = 248,9 \pm 9,0 \mu\text{g/mL}$) mais resistente frente ao composto DPBP em relação à B16F10 ($IC_{50} = 6,53 \pm 3,72 \mu\text{g/mL}$), resultando em um $IS = 41,94$ (TABELA 5).

Tabela 5 – Concentrações letais do composto DBPB nas linhagens Melan-A e B16F10

Tipo celular	Melan-A	B16F10
$\text{Log } IC_{50}$	2,396	1,563
$IC_{50} (\mu\text{g/mL})$	$248,9 \pm 9,0$	$6,53 \pm 3,72$
$IC_{50} (\mu\text{M})$	$791,7 \pm 28,6$	$20,77 \pm 11,85$
R^2	0,8655	0,8732
HillSlope	4,004	1,111

Fonte: NASCIMENTO (2018a).

Capítulo 1

4.2. ÍNDICE DE SELETIVIDADE DOS COMPOSTOS

A partir dos dados obtidos pelas análises de citotoxicidade é possível calcular os índices de seletividade (IS) dos compostos testados (TABELA 6).

Tabela 6 – Índice de seletividade (IS) dos compostos

Droga	AMORA	CURCUMINA	BHCN	DPBP
IS _{HT29/VERO} (µg/mL)	13,61	14,00	0,523	Não calculado
IS _{HT29/HEK293} (µg/mL)	Não calculado	Não calculado	Não calculado	Não calculado

Fonte: Autora (2021)

Segundo os dados apresentados na TABELA 6, é possível observar que o extrato etanólico de amora (IS = 13,61) e o composto curcumina (IS = 14,00) apresentam uma seletividade elevada em relação às células de câncer colorretal (HT29). Quanto ao composto BHCN (IS = 0,52), nota-se uma baixa seletividade para o CCR, e por isso, sua administração para o tratamento desse tipo de câncer não é recomendada. O IS é um parâmetro que reflete a quantidade de um composto que é ativo contra a linhagem neoplásica, mas não é tóxico para a célula normal. Durante a pesquisa de novas drogas é tido como significativo um valor de IS maior ou igual a 2,0 em ensaios *in vivo*, ou seja, o composto investigado deve ser duas vezes mais ativo na linhagem de células neoplásicas do que em células normais (SUFFNESS *et. al.*, 1990). Por esse motivo as substâncias naturais testadas – curcumina e o extrato de amora – apresentam um valor de IS significativo, indicando melhor especificidade e grande potencial terapêutico para o CCR.

Inúmeros estudos ao longo dos anos, evidenciam as propriedades antitumorais do extrato de amora (*Morus nigra*). Ahmed e colaboradores (2016), avaliaram a atividade anticancerígena do extrato de frutas frescas e secas de *M. nigra* na linhagem celular de câncer de mama humano (MCF-7). Os resultados demonstraram que o extrato de amora induziu a apoptose, fragmentação e quebra de fitas simples no DNA e inibiu a proliferação celular, sendo os melhores resultados com o extrato fresco. Targhi e colaboradores (2017), investigaram o efeito radioprotetor do extrato de amoreira-preta no tecido hepático e nas células da medula óssea em ratos. Eles observaram que a administração intraperitoneal (ip) de 200 mg/kg do extrato reduziu

Capítulo 1

significativamente a genotoxicidade e a citotoxicidade induzidas pela irradiação gama em células da medula óssea e no fígado de ratos. Turan e colaboradores (2017) avaliaram as atividades anticâncer do extrato da fruta de *M. nigra* em células PC-3 (câncer de próstata humano). O extrato de *M. nigra* exibiu citotoxicidade moderada contra células PC-3 com um valor de IC₅₀ de 370,1 ± 5,8 µg/mL; inibiu a progressão do ciclo celular na fase G0/G1, e induziu a apoptose via aumento da atividade da caspase e redução do potencial de membrana mitocondrial. Yilmaz e colegas (2019) avaliaram o potencial genotóxico e genoprotetor do suco da fruta da amoreira-preta, e observaram que o tratamento protegeu os linfócitos humanos contra alterações genômicas induzidas pelo agente antitumoral mitomicina c (MMC). Esses efeitos protetores do extrato de amora provavelmente se devem à sua atividade de eliminação de radicais livres.

A curcumina é um fitoquímico derivado da cúrcuma (*Curcuma longa*), que é uma planta morfológicamente semelhante, a olho nu, ao gengibre (SHEHZAD *et al.*, 2010). Extensos estudos *in vitro* e *in vivo* relataram a curcumina como um agente capaz de prevenir o crescimento do CCR, bloqueando o ciclo celular e acelerando a apoptose. Sendo, portanto, considerada um agente promissor na quimioprevenção e como tratamento complementar desse tipo de câncer.

Xiang e colaboradores (2020), analisaram os efeitos antitumorais da curcumina em células de carcinoma colorretal humano (HCT-116) e compararam sua eficácia com o 5-FU. Os resultados revelaram que a curcumina inibe significativamente a proliferação e migração celular, induz a parada da fase S e o aumento gradual das taxas de apoptose das células HCT-116 de forma dose-dependente. Esses dados sugerem que o efeito inibitório da curcumina (30 µM) nas células HCT-116 pode ser igual ao do 5-FU (500 µM). Um estudo realizado por Kim e Lee (2010), revelou que a curcumina inibiu a proliferação celular de HCT-116 através da indução da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e regulação negativa de E2F4 e genes relacionados, como ciclina A, p21 e p27. No trabalho de Watson e colegas (2010), sobre a citotoxicidade da curcumina nas linhagens celulares HCT-116 e HT29, foi observado que a proliferação celular foi inibida pela regulação positiva de p53.

Conforme relatado acima, um dos principais mecanismos pelos quais a curcumina bloqueia o crescimento celular é a indução da apoptose. Este processo nas células do CCR envolve múltiplos alvos moleculares, incluindo a inibição da enzima

Capítulo 1

ciclooxigenase-2 (COX 2), inibição da via Wnt / beta-catenina, expressão de Bax e consequente ativação de p53, além da promoção da lise das membranas mitocondriais levando à liberação de ROS (PRICCI *et al.*, 2020).

Finalmente, apesar das inúmeras evidências que apontam as sulfonamidas como potentes agentes antitumorais, o composto de código BHCN testado nas células de CCR não foi eficaz. Os compostos à base de sulfonamidas (precursores de antibióticos) compreendem substâncias que estão em uso clínico há várias décadas, com comprovada ação antibacteriana, diurética, antidiabética, antitireoidiana, anti-hipertensiva, antiviral e antitumoral (OWA *et al.*, 1999; HANSCH, 2003; CRESPO *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2012).

Estudos *in vitro* e *in vivo* relataram o tratamento com celecoxib (um derivado de sulfonamida que inibe COX-2) em vários tipos de cânceres humanos. Em 2018, Yu e colaboradores encapsularam a droga junto com Brefeldina A em nanopartículas direcionadas ao aparelho de Golgi. Em 2019, Sun e colegas trataram células tumorais humanas e murinas com lipossomas contendo celecoxib e curcumina. Em ambos os estudos, os pesquisadores observaram inibição da proliferação e migração celular, e indução da apoptose.

Além disso, outra droga derivada de sulfonamida largamente estudada é o Vemurafenib (PLX4032). Esta, se trata de uma pequena molécula inibidora de BRAF, utilizada na terapia direcionada em células mutantes BRAF^(V600E). Esse medicamento é aprovado para tratar pacientes com melanoma inoperável ou metastático que contém a proteína BRAF alterada (REBECCA *et al.*, 2019). Entretanto, assim como acontece com outros medicamentos, a maioria das células já adquiriu resistência à Vemurafenib. Byeon e colaboradores (2017), mostraram que o tratamento combinatório de PLX4032 e PHA665752 (inibidor de c-Met) em células mutantes BRAF^(V600E) de câncer de tireoide reverteu a transição epitelial-mesenquimal (EMT), sugerindo resposta terapêutica máxima. Em 2018, István e colaboradores demonstraram que o tratamento com EGFR-TKIs (gefitinibe, PD153035, erlotinibe e pelitinibe) é responsável por atenuar a resistência celular ao vemurafenibe. Ainda, o sinergismo entre a melatonina e o vemurafenib gerou uma potencialização do efeito antitumoral no melanoma humano (JIAOJIAO *et al.*, 2019).

Capítulo 1

Os compostos derivados de sulfonamidas atuam nas células interrompendo a dinâmica dos microtúbulos. Isso ocorre pela inibição da polimerização das tubulinas, o que impede a formação do fuso mitótico e leva à parada do ciclo e morte celular (LIU *et al.*, 2012). Os microtúbulos são os principais componentes do citoesqueleto, e são importantes para a mitose, transporte organelar, manutenção da morfologia celular e transdução de sinal (DUMONTET *et al.*, 2010). Dessa forma, a aplicação clínica desses compostos no tratamento de neoplasias humanas parece ser vantajosa, e, apesar do composto estudado não ter mostrado seletividade pela linhagem celular HT29, investigações adicionais em outros tipos celulares devem ser estimuladas.

Quanto ao último composto testado, o derivado de DBM – 1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona (DPBP), percebeu-se seletividade acentuada para o CCR sendo a $IC_{50} = 5,72$ para a linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano (HT29). Sabe-se que os derivados de dibenzoilmetano (1,3-difenilpropano-1,3-diona) são promissores agentes antitumorais. Nogueira e colaboradores (2003), identificaram oito derivados de DBM que apresentaram atividade antitumoral em quatro linhagens de células tumorais: MCF7 (câncer de mama), NCI ADR (câncer de mama multirresistente), NCI460 (câncer de pulmão) e UACC62 (melanoma), encontrando valores de IC_{50} entre 25 e 250 $\mu\text{g/mL}$.

Em 2001, Lin observou que os derivados de DBM possuem a propriedade de evitar a formação de adutos de DNA induzidos por carcinógenos em glândulas mamárias e nos pulmões, e em 2008, Thimmulappa e colaboradores notaram que o mecanismo de ação dos compostos se dá por meio da ativação da via de desintoxicação do Nrf2. JACKSON e colegas (2002) mostraram que o DBM e seus derivados são capazes de induzir a apoptose e interromper o ciclo celular em células de câncer humano de próstata. Em 2007, Hong percebeu as mesmas atividades anticancerígenas dos derivados de DBM em células de câncer de cólon.

Nascimento e colaboradores (2018) investigaram o efeito citotóxico do composto derivado de DBM, 1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona (DPBP), em células de melanoma murino (B16F10), bem como sua interação direta com a molécula de DNA utilizando pinças ópticas. Os resultados mostraram que o DPBP é seletivo para o melanoma: Melan-A ($IC_{50} = 248,9 \mu\text{g/mL}$) e B16F10 ($IC_{50} = 6,53 \mu\text{g/mL}$), resultando em um $IS = 41,94$; quando comparado aos resultados do DBM: Melan-A ($IC_{50} = 5,68 \mu\text{g/mL}$) e B16F10 ($IC_{50} = 11,59 \mu\text{g/mL}$), resultando em um $IS = 0,50$. Estes resultados

Capítulo 1

demonstram que DPBP é uma molécula de alta eficiência, sugerindo que tem um grande potencial como agente quimioterápico para o tratamento de melanoma. Os baixos valores de IC_{50} , encontrados anteriormente e, neste trabalho, reforçam a necessidade e a importância do estudo de β -dicetonas e seus derivados frente a linhagens tumorais.

O quimioterápico de primeira linha utilizado desde sua descoberta (1957) até os dias atuais para o tratamento do adenocarcinoma colorretal é o 5-Fluoracil (5-FU) (CARRILLO, *et al.* 2015). O 5-FU é um antimetabólito análogo das pirimidinas que imita os blocos de construção necessários para a síntese de DNA e RNA, causando lesões na célula que desencadeiam a cascata de apoptose (LONGLEY, *et al.* 2003). Nos anos 80, esse medicamento foi combinado com o ácido folínico - leucovorina (LV), melhorando a sobrevida (SV) dos pacientes quando comparada a monoterapia (± 12 meses). No final dos anos 90, a droga irinotecano (Camptosar®) foi associada ao esquema 5-FU/LV, criando um novo esquema quimioterápico, conhecido como IFL – SV de ± 14 meses. Na mesma época, surgiu a oxaliplatina (Eloxatin®), um agente com mecanismo de ação semelhante aos derivados da platina, que foi associada ao esquema de 5-FU/LV infusional (FOLFOX) – SV ± 16 meses (TONON *et al.*, 2007). Apesar de seu uso rotineiro para o CCR, o 5-FU apresenta inúmeras desvantagens, como toxicidade leve a moderada, falta de seletividade e eficácia (recorrência do tumor após a quimioterapia), bem como, desenvolvimento de resistência medicamentosa (CARRILLO, *et al.* 2015).

Nesse sentido, os compostos testados no presente trabalho, evidenciam potencial melhora na resposta terapêutica do câncer colorretal, já que os índices de seletividade apresentados foram elevados (13,61 para o extrato de amora e 14,0 para a curcumina). Além disso, esses compostos são naturais, sendo, portanto, de baixo custo e apresentando pouco ou nenhum efeito colateral ao paciente.

4.3. PERFIL FARMACOCINÉTICO E TOXICOLÓGICO DOS COMPOSTOS

Os perfis farmacocinéticos dos compostos foram obtidos utilizando o programa de predição *in silico* pkCSM e estão apresentados na TABELA 7. A solubilidade de um composto em água reflete a solubilidade da molécula em H_2O a $25^\circ C$. As drogas lipossolúveis são menos absorvidas pelas células do que as drogas hidrossolúveis. Dentre os compostos analisados, o BHCN é o mais solúvel em água, apresentando

Capítulo 1

solubilidade de -3,591($\mu\text{mol/L}$), seguido da curcumina (-4,904 $\mu\text{mol/L}$) e do DPBP (-5,923 $\mu\text{mol/L}$).

Quanto à absorção intestinal das drogas, foi utilizado o modelo de predição da permeabilidade em células Caco-2 (adenocarcinoma colorretal humano). Um composto é considerado como tendo uma alta permeabilidade com valores previstos $> 0,90$. Os compostos aparentemente apresentam boa permeabilidade intestinal, com exceção da curcumina que apresenta permeabilidade intestinal menor que 10×10^{-6} cm/s. Em relação à permeabilidade na pele, todos os compostos apresentam boa permeabilidade cutânea, o que é interessante caso seja necessária a administração transdérmica desses medicamentos.

Todos os compostos são substratos de glicoproteína-P, ou seja, difundem-se ativamente para dentro das células, enquanto apenas o DPBP é além de substrato, inibidor da glicoproteína-P I e II. A glicoproteína P (P-gp) é a principal proteína da família de transportadores ABC, e é superexpressa em tecidos tumorais. Essa proteína usa a energia da hidrólise do ATP para expulsar ativamente os agentes terapêuticos da célula, sendo esse efluxo de drogas um dos principais mecanismos para a resistência medicamentosa (GENOVESE *et al.*, 2017; JANUCHOWSKI *et al.*, 2013). Dessa forma, ao inibir a P-gp, o DPBP impede o seu bombeamento para fora da célula, permanecendo em ação por mais tempo. Adicionalmente a P-gP, os genes CYP, dos diversos citocromos P450, são responsáveis pelo metabolismo de fármacos que são seus substratos. Essas enzimas encontradas principalmente no fígado, realizam a desintoxicação do corpo, facilitando a excreção de medicamentos. De acordo com nossa análise *in silico*, o DPBP e o BHCN são substrato de pelo menos uma isoforma do citocromo 450, no entanto, os três compostos são inibidores de mais de uma isoforma, conseguindo ter efetividade no organismo em pequenas doses, já que o metabolismo dos mesmos é mais lento.

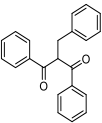
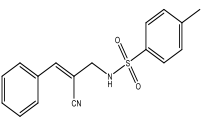
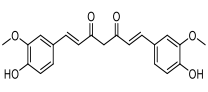
Ainda, podemos inferir que, todos os compostos apresentam baixos volumes de distribuição e fração livre indicando que os mesmos podem atravessar as membranas celulares e se difundir mais eficientemente. Todos esses dados apresentados levam a crer que a administração oral desses compostos pode ser recomendada.

Capítulo 1

Os resultados preditos de toxicologia nos mostram que o DPBP tem potencial ação tóxica tanto no teste de AMES (mutagenicidade) quanto hepatotoxicidade e na sensibilização da pele (risco de dermatite alérgica), porém nos estudos *in vivo* de Nascimento e colaboradores (2018), não foram observadas hepatotoxicidade ou dermatite nas doses aplicadas desse composto. O composto BHCN, assim como o DPBP, apresentou potencial mutagênico e inibição dos canais de potássio codificados pelo gene hERG II. A inibição dos canais hERG podem levar ao desenvolvimento de distúrbios cardíacos que culminam em arritmia ventricular fatal. Já a curcumina, foi o único composto analisado que não apresentou nenhum tipo de predisposição a toxicidade. Além disso, foi o composto com a maior dose máxima tolerada por humanos. Os dados obtidos a partir dessa análise podem ser utilizados para a determinação das doses a serem aplicadas em posteriores testes *in vivo* desses compostos.

Capítulo 1

Tabela 7 – Ensaio *in silico* dos compostos testados

COMPOSTOS		 DPBP	 BHCN	 CURCUMINA	
Propriedade	Nome do modelo	Valor	Valor	Valor	Unidade
Absorção	Solubilidade em água	-5,923	-3,591	-4,904	Numérico (μmol/L)
Absorção	Permeabilidade Caco2	1,865	0,976	0,756	Numérico (Papp em 10 ⁻⁶ cm/s)
Absorção	Absorção intestinal (humana)	100	93,117	75,494	Numérico (% Absorvido)
Absorção	Permeabilidade da pele	-2,677	-2,817	-2,952	Numérico (log Kp)
Absorção	Substrato de glicoproteína-P	Sim	Sim	Sim	Categórico (Sim/Não)
Absorção	Inibidor de glicoproteína-P	Sim	Não	Sim	Categórico (Sim/Não)
Absorção	Inibidor da glicoproteína-P II	Sim	Não	Sim	Categórico (Sim/Não)
Distribuição	VDss (humano)	0,241	-0,117	0,02	Numérico (log L/kg)
Distribuição	Fração não ligada (humano)	0,059	0,046	0,093	Numérico (Fu)
Distribuição	Permeabilidade BBB	-0,091	-0,057	-0,528	Numérico (log BB)
Distribuição	Permeabilidade SNC	-1,202	-2,146	-2,964	Numérico (log PS)
Metabolismo	Substrato de CYP2D6	Não	Não	Não	Categórico (Sim/Não)
Metabolismo	Substrato de CYP3A4	Sim	Sim	Não	Categórico (Sim/Não)
Metabolismo	Inibidor de CYP1A2	Sim	Sim	Sim	Categórico (Sim/Não)
Metabolismo	Inibidor de CYP2C19	Sim	Sim	Sim	Categórico (Sim/Não)
Metabolismo	Inibidor de CYP2C9	Sim	Sim	Sim	Categórico (Sim/Não)
Metabolismo	Inibidor de CYP2D6	Não	Não	Não	Categórico (Sim/Não)

Capítulo 1

Metabolismo	Inibidor de CYP3A4	Não	Não	Sim	Catégorico (Sim/Não)
Toxicidade	Toxicidade AMES	Sim	Sim	Não	Catégorico (Sim/Não)
Toxicidade	Dose máxima tolerada (humanos)	0,256	0,098	0,508	Numérico (mg/kg/dia)
Toxicidade	Inibidor de hERG I	Não	Não	Não	Catégorico (Sim/Não)
Toxicidade	Inibidor de hERG II	Sim	Sim	Não	Catégorico (Sim/Não)
Toxicidade	Toxicidade oral aguda em ratos (LD50)	2,657	2,423	1,684	Numérico (mol/kg)
Toxicidade	Toxicidade oral crônica em ratos (LOAEL)	2,319	1,254	2,875	Numérico (mg/kg/dia)
Toxicidade	Hepatotoxicidade	Sim	Não	Não	Catégorico (Sim/Não)
Toxicidade	Sensibilização da pele	Sim	Não	Não	Catégorico (Sim/Não)

Fonte: Autora (2021).

Capítulo 1

5. CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste trabalho mostram o potencial terapêutico de três medicamentos contra o câncer colorretal (CCR) humano, sendo dois deles, compostos naturais – extrato etanólico de amora e curcumina – e o terceiro, um composto sintético inédito – DPBP. O extrato etanólico de amora apresentou um IS consideravelmente alto de 13,61, e um IC_{50} consideravelmente baixo de 22,54 $\mu\text{g/mL}$. Da mesma forma, o composto curcumina apresentou um IS de 14,00 e um IC_{50} de 6,25 $\mu\text{g/mL}$. O composto DPBP apresentou um IC_{50} de 5,72 $\mu\text{g/mL}$, cujo IS não foi possível calcular, já que a linhagem normal VERO não apresentou IC_{50} nas concentrações testadas. A partir desses resultados, é possível afirmar que os três compostos testados são eficientes para o tratamento do CCR por apresentarem índices de seletividade superiores ao valor mínimo considerado significativo pela comunidade científica em ensaios de novas drogas ($IS = 2,0$). Além disso, os ensaios ADME demonstraram que os compostos tem alta permeabilidade cutânea, baixa fração livre e que podem inibir isoformas do citocromo 450, indicando que esses compostos podem difundir-se rapidamente pelas células e permanecer mais tempo no organismo, devido a seu metabolismo lento, sendo indicada sua administração tanto via transdérmica quanto via oral. Assim, os resultados obtidos na presente dissertação revelam que os compostos naturais – extrato etanólico de amora e curcumina – e o composto sintético derivado de DBM – DPBP – são medicamentos com elevado potencial terapêutico para o câncer colorretal.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Posteriormente, espera-se realizar testes de citotoxicidade com o 5-FU – medicamento de primeira linha utilizado no tratamento do CCR – a fim de comparar a eficácia do mesmo em relação aos compostos testados neste trabalho. Adicionalmente, almejamos realizar experimentos de citometria de fluxo para verificar por qual mecanismo de morte celular os compostos atuam (apoptose ou necrose), bem como, em qual ponto do ciclo celular eles interferem.

Capítulo 1

7. REFERÊNCIAS

ABRAHAM, J.; STAFFURTH, J. Hormonal therapy for cancer. **Medicine**, v. 39, n. 12, p. 723–727, 01 dec. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2011.09.006>

ADES, F. Access to Oncology Drugs in Brazil: Juggling Innovation and Sustainability in Developing Countries. **Medicine Access @ Point of Care**, v. 1, 19 jan. 2017. <https://doi.org/10.5301/maapoc.0000004>

AHMED, A. *et al.* Anticancer activity of *Morus nigra* on human breast cancer cell line (MCF-7): the role of fresh and dry fruit extracts. **Journal of Bioscience and Applied Research**, v. 2, n. 6, p. 352-361, 2016.

ALMEIDA, V. L. *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, jan./fev. 2005. doi.org/10.1590/S0100-40422005000100021

ALVES, A. C. *et al.* Biophysics in cancer: The relevance of drug-membrane interaction studies. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1858, n. 9, p. 2231–2244, 26 jun. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.06.025>

BAÊTA, J. V. B. P. **Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos etanólicos das folhas de amoreira-preta (*Morus nigra*) e erva cidreira (*Melissa officinalis*)**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Bioquímica) Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

BASKAR, R. *et al.* Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. **International Journal of Medical Sciences**, v. 9, n. 3, p. 193–199, 17 feb. 2012. <https://doi.org/10.7150/ijms.3635>

BENNETT, D. C.; COOPER, P. J.; HART, I. R. A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. **International journal of cancer**, v. 39, n. 3, p. 414–418. (1987). <https://doi.org/10.1002/ijc.2910390324>

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Monografia da Espécie *Curcuma longa* L. (Cúrcuma)**. Brasília: 2015b. 151p. Disponível em: <<https://www.saude.gov.br/images/pdf/2016/fevereiro/22/Monografia-Curcuma-CP-corrigida.pdf>> Acesso em: 20 jan. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Monografia da espécie *Morus nigra* L. (AMOREIRA)**. Brasília: 2015a. 68p. Acesso em: 21 de janeiro de 2020. Disponível em: <<https://www.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/11/Monografia-Morus-nigra.pdf>>

Capítulo 1

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. 6. ed. rev. atual. – Rio de Janeiro: INCA, 2020. 112 p. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//livro-abc-6-edicao-2020.pdf>>. Acesso em: 01 jul. 2020.

BYEON, H. K., *et al.* Acquired resistance to BRAF inhibition induces epithelial-to-mesenchymal transition in BRAF (V600E) mutant thyroid cancer by c-Met-mediated AKT activation. **Oncotarget**, v. 8, n. 1, p. 596–609, 03 jan. 2017. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13480>

CARVALHO, P. V. B. *et al.* Expression of p190 BCR-ABL fusion gene in a patient with chronic myeloid leukemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 25, n. 3, p. 173-176, 25 nov. 2003. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842003000300009>

CHEN, A. M. *et al.* Co-delivery of doxorubicin and Bcl-2 siRNA by mesoporous silica nanoparticles enhances the efficacy of chemotherapy in multidrug-resistant cancer cells. **Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)**, v. 5, n. 23, p. 2673-2677, dez. 2009. <https://doi.org/10.1002/smll.200900621>

CRESPO, R. *et al.* *In vitro* antitumor activity of N-glycosyl sulfonamides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 22, p. 6469-6471, 15 nov. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.09.052>

DALLE-DONNE, I. S-Glutathiolation in life and death decisions of the cell. **Free Radical Research**, v. 45, n. 1, p. 3–15. 2011. doi:10.3109/10715762.2010.515217

DEVITA, V.T.; CHU, E. A History of Cancer Chemotherapy. **Cancer Research**, v. 68, n. 21, p. 8643-8653, 30 oct. 2008. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-07-6611>

DHANASEKARAN, D. N.; REDDY, E. P. JNK-signaling: A multiplexing hub in programmed cell death. **Genes & Cancer**, v. 8, n. 9-10, p. 682-694, 11 sep. 2017. <https://doi.org/10.18632/genesandcancer.155>

DOHERTY, J.; BAEHRECKE, E. H. Life, death and autophagy. **Nature Cell Biology**, v. 20, p. 1110-1117, 17 sep. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0201-5>

DOUGAN, M. Checkpoint blockade toxicity and immune homeostasis in the gastrointestinal tract. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1547, 15 nov. 2017. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01547>

DOUGAN, M.; DRANOFF, G.; DOUGAN, S. K. Cancer Immunotherapy: Beyond Checkpoint Blockade. **Annual Review of Cancer Biology**, v. 3, n. 1, p. 55-75, 07 nov. 2018. <https://doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-030518-055552>

DUMONTET, C.; JORDAN, M. A. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 10, p. 790-803, 01 oct 2010. <https://doi.org/10.1038/nrd3253>

Capítulo 1

ECK, M.J.; MANLEY, P.W. The interplay of structural information and functional studies in kinase drug design: insights from BCR-Abl. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 21, n. 2, p. 288–295, 11 feb. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.01.014>

ESCOBAR, M. L.; ECHEVERRÍA, O. M.; VÁZQUEZ-NIN, G. H. Necrosis as Programmed Cell Death. *In*: NTULI, T. (Ed.). **Cell Death - Autophagy, Apoptosis and Necrosis**. London: IntechOpen, 2015, cap. 19. <https://doi.org/10.5772/61483>

FAIRCHILD, A. *et al.* Hormonal Therapy in Oncology: A Primer for the Radiologist. **American Journal of Roentgenology**, v. 204, n. 6, p. 620-630, jun. 2015. <https://doi.org/10.2214/ajr.14.13604>

FEOKTISTOVA, M.; LEVERKUS, M. Programmed necrosis and necroptosis signalling. **FEBS Journal**, v. 282, n. 1, p. 19-31, 11 nov. 2014. <https://doi.org/10.1111/febs.13120>

FIDLER I. J. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. **Cancer research**, v. 35, n. 1, p. 218–224. (1975).

FILHO, A.B.C. *et al.* Cúrcuma: planta medicinal, condimentar e de outros usos potenciais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 171-177, jan./mar. 2000. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782000000100028>.

FORD, R. B.; MAZZAFERRO, E. M. **Kirk & Bistner — Manual de Procedimentos Veterinários e Tratamento Emergencial**. 9. ed. Elsevier. São Paulo: Guanabara Koogan, 2013.

FOX, J. L.; MACFARLANE, M. Targeting cell death signalling in cancer: minimising “Collateral damage.” **British Journal of Cancer**, v. 115, n. 1, p. 5-11, 03 may. 2016. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.111>

FRANK, D.; VINCE, J. E. Pyroptosis versus necroptosis: similarities, differences, and crosstalk. **Cell Death & Differentiation**. v. 26, n. 1, p. 99-114, 19 oct. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0212-6>

GAJEWSKI, T. F.; SCHREIBER, H.; FU, Y. X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. **Nature immunology**, v. 14, n. 10, p. 1014–1022, oct. 2013. <https://doi.org/10.1038/ni.2703>

GALLUZZI, L. *et al.* Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. **Cell Death & Differentiation**. v. 22, n. 1, p. 58-73, 19 sep. 2014. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.137>

GALLUZZI, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, n. 3, p. 486-541, 23 jan. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>

GAO, Z.; ZHANG, L.; SUN, Y. Nanotechnology applied to overcome tumor drug resistance. **Journal of controlled release: official journal of the Controlled**

Capítulo 1

Release Society, v. 162, n. 1, p. 45-55, 20 aug. 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.05.051>

GENOVESE, I. *et al.* Not only P-glycoprotein: Amplification of the ABCB1- containing chromosome region 7q21 confers multidrug resistance upon cancer cells by coordinated overexpression of an assortment of resistance-related proteins. **Drug Resistance Updates**, v. 32, p. 23-46, 11 oct. 2017.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2017.10.003>

GIOVANNETTI, E.; RODRIGUEZ, J.A. Targeted therapies in cancer: where are we going? **Cancer Drug Resistance**, v. 1, p. 82-86, 19 jun. 2018.
<http://dx.doi.org/10.20517/cdr.2018.05>

GONG, J. *et al.* Development of PD-1 and PD-L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy: a comprehensive review of registration trials and future considerations. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 6, n.8, 23 jan. 2018.
<http://dx.doi.org/10.1186/s40425-018-0316-z>

GRAHAM, C. *et al.* Cancer immunotherapy with CAR-T cells – behold the future. **Clinical Medicine**, London, v. 18, n. 4, p. 324-328. 02 aug. 2018.
<https://doi.org/10.7861/clinmedicine.18-4-324>

HANSCH, C. Comparative QSAR of the sulfonamide function. **Il Farmaco**, v. 58, n. 9, p. 625-629, 28 jun. 2003. [https://doi.org/10.1016/S0014-827X\(03\)00105-8](https://doi.org/10.1016/S0014-827X(03)00105-8)

HERSEY, P.; ZHANG, X. D. How melanoma cells evade trail-induced apoptosis. **Nature Reviews Cancer**, v. 1, n. 2, p. 142-150, 01 nov. 2001.
<https://doi.org/10.1038/35101078>

HEWLINGS, S. J.; KALMAN, D. S. Curcumin: A Review of Its Effects on Human Health. **Foods (Basel, Switzerland)**, v. 6, n. 10, p. 92, 22 oct. 2017.
<https://doi.org/10.3390/foods6100092>

HOELDER, S.; CLARKE, P.A.; WORKMAN, P. Discovery of small molecule cancer drugs: successes, challenges and opportunities. **Molecular Oncology**, v. 6, n. 2, p. 155-76, 03 mar. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2012.02.004>

HOJJAT-FARSANGI, M. Small-molecule inhibitors of the receptor tyrosine kinases: promising tools for targeted Cancer therapies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 8, p. 13768-13801, 08 aug. 2014.
<https://doi.org/10.3390/ijms150813768>

HONG, J.L. **Dibenzoylmethane induced cell cycle arrest in human colon cancer cells and its pharmacokinetic disposition in the rats**. 2007. Thesis (Master of Science Graduate Program in Pharmaceutical Science). The State University of New Jersey. Graduate School-New Brunswick Rutgers, New Jersey, 2007.

HUANG, X. *et al.* Caspase-11, a specific sensor for intracellular lipopolysaccharide recognition, mediates the non-canonical inflammatory pathway of pyroptosis. **Cell & Bioscience**, v. 9, n. 31. 27 mar. 2019. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0292-0>

Capítulo 1

HURLEY, L. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 188-200, mar. 2002. <https://doi.org/10.1038/nrc749>

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **O que é câncer**. Brasília, DF, 2019. Disponível em <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>. Acesso em 30 out. 2019.

INSTITUTO ONCOGUIA. **Tratamentos do câncer**. São Paulo, SP, 2018. Disponível em: < <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/tratamentos/77/50/>>. Acesso em: 05 nov. 2019.

ISTVÁN, K. *et al.* Inhibition of epidermal growth factor receptor improves antitumor efficacy of vemurafenib in BRAF-mutant human melanoma in preclinical model. **Melanoma Research**. (2018) 10.1097/CMR.0000000000000488

JACKSON, K.M. *et al.* Dibenzoylmethane induces cell cycle deregulation in human prostate cancer cells. **Cancer Letters**, v. 178, n. 2, p. 161-165, 25 apr. 2002. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(01\)00844-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(01)00844-8)

JANUCHOWSKI, R. *et al.* MDR Gene Expression Analysis of Six Drug-Resistant Ovarian Cancer Cell Lines. **BioMed Research International**, v. 2013, n. 241763, p. 1-10, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/241763>

JIAOJIAO, H. *et al.* Melatonin synergizes BRAF-targeting agent vemurafenib in melanoma treatment by inhibiting iNOS/hTERT signaling and cancer-stem cell traits. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**. (2019) 10.1186/s13046-019-1036-z

JORGE, J.J. Imunoterapia no tratamento do câncer. **Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia**, v. 3, n. 2, p. 133-138, 20 jun. 2019. <https://doi.org/10.5935/2526-5393.20190023>

KIM, K.C.; LEE, C.H. Curcumin induces downregulation of E2F4 expression and apoptotic cell death in HCT116 human colon cancer cells; involvement of reactive oxygen species. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, n. 14, p. 391–397, 2010. doi: 10.4196/kjpp.2010.14.6.391

KRUMMEL, M.F.; ALLISON, J.P. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 182, n. 2, p. 45-65, 01 aug. 1995. <https://doi.org/10.1084/jem.182.2.459>.

LARIONOVA, I., *et al.* Interaction of tumor-associated macrophages and cancer chemotherapy. **Oncolimmunology**, v. 8, n. 7, e1596004, 09 mar. 2019. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1596004>

LIM, S.; CHOI, C.-I. Pharmacological Properties of *Morus nigra* L. (Black Mulberry) as A Promising Nutraceutical Resource. **Nutrients**, v. 11, n. 2, 20 feb. 2019. <https://doi.org/10.3390/nu11020437>

LIMA-JÚNIOR, C. G. *et al.* Efficient synthesis of 16 aromatic Morita-Baylis-Hillman adducts: biological avaliation on *Leishmania amazonensis* and *Leishmania chagasi*.

Capítulo 1

Bioorganic & Medicinal Chemistry, v.6, n.38, p.279-284, 01 sep. 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2010.08.002>

LIMA-JÚNIOR, C. G.; VASCONCELLOS, M. L. A. A. Morita–Baylis–Hillman adducts: Biological activities and potentialities to the discovery of new cheaper drugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.20, p.3954-3971, 09 may. 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.04.061>

LIN, C.C. *et al.* Inhibition by dietary dibenzoylmethane of mammary gland proliferation, formation of DMBA–DNA adducts in mammary glands, and mammary tumorigenesis in Sencar mice. **Cancer Letters**, v. 168, n. 2, p. 125-132, 26 jul. 2001.
[https://doi.org/10.1016/s0304-3835\(01\)00506-7](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(01)00506-7)

LIU, X. *et al.* There are only four basic modes of cell death, although there are many ad-hoc variants adapted to different situations. **Cell & Bioscience**, v. 8, n. 1, 01 feb. 2018. <https://doi.org/10.1186/s13578-018-0206-6>

LIU, Z., *et al.* A novel sulfonamide agent, MPSP-001, exhibits potent activity against human cancer cells in vitro through disruption of microtubule. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 33, n. 2, p. 261-270, 03 feb. 2012. <https://doi.org/10.1038/aps.2011.156>

LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. 5, p. 330–338. 2003.
<https://doi.org/10.1038/nrc1074>

MAUNZ, A. *et al.* Lazar: a modular predictive toxicology framework. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4, n. 38, 2013. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00038>

MCANINCH, J. W.; LUE, T. F. **Urologia geral de Smith e Tanagho**. 18 ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.

MEHLEN, P.; PUISIEUX, A. Metastasis: a question of life or death. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 6, p. 449-458, 01 jun. 2006. <https://doi.org/10.1038/nrc1886>

MELINO, G. The Sirens' song. **Nature**. v. 412, n. 23, 05 jul. 2001.
<https://doi.org/10.1038/35083653>

MIRANDA, J. S. **Atividade citotóxica do extrato etanólico de *Morus Nigra* em células de câncer de pele do tipo melanoma**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Bioquímica) Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2017.

MOHAN, G. *et al.* Recent advances in radiotherapy and its associated side effects in cancer—a review. **The Journal of Basic and Applied Zoology**, v. 80, n. 14, 27 feb. 2019. <https://doi.org/10.1186/s41936-019-0083-5>

MOTLEY, R.J.; REYNOLDS, A.J. Photocontact dermatitis due to isopropyl and butyl methoxy dibenzoylmethanes (Eusolex 8020 and Parsol 1789). **Contact Dermatitis**, v. 21, n. 2, p. 109-110, aug. 1989. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1978.tb03845.x>

Capítulo 1

NASCIMENTO, F. R. **Síntese, caracterização e avaliação da atividade antimelanoma *in Vitro* e *in Vivo* do derivado sintético 1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona**. 2018a. Tese (Doutorado em Bioquímica Aplicada). Universidade Federal de Viçosa. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, Viçosa, 2018a.

NASCIMENTO, F. R. *et al.* New antineoplastic agent based on a dibenzoylmethane derivative: Cytotoxic effect and direct interaction with DNA. **Biophysical Chemistry**, v. 239, p. 1-6. 28 apr. 2018b. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2018.04.009>

NETO, Q. A.L. *et al.* Estudo da relação estrutura-atividade quantitativa de dibenzoilmetanos α -substituídos quanto à atividade anticâncer da mama (linhagem celular MCF7). **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 4, p. 345-357, 02 mai. 2006.

NEWICK, K. *et al.* CAR T Cell Therapy for Solid Tumors. **Annual Review of Medicine**, v. 68, n. 1, p. 139-152, jan. 2017. doi:10.1146/annurev-med-062315-120245

NIERO, E. *et al.* The multiple facets of drug resistance: one history, different approaches. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 33, n. 37, 28 apr. 2014. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-33-37>

NOGUEIRA, M. A. *et al.* A novel sunscreen agent having antimelanoma activity. **IL Farmaco**, v. 58, n. 11, p. 1163-1169, 10 jul. 2003. [https://doi.org/10.1016/s0014-827x\(03\)00195-2](https://doi.org/10.1016/s0014-827x(03)00195-2)

OLIVEIRA, A.C.B. *et al.* Avaliação toxicológica pré-clínica do chá das folhas de *Morus nigra* L. (Moraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 2, p. 244-249, 2013. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722013000200012>

OLIVEIRA, M.A.B.R. **Avaliação da atividade antitumoral *in vitro* de derivado de dibenzoilmetano, 1-[(4'-iso-propil)fenil]-2-propano-3-fenil-1,3-propanodiona (ip2-DBM), em linhagens de melanoma, glioma e adenocarcinoma do colorretal**. 2019. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural). Universidade Federal de Viçosa. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, Viçosa, 2019.

OWA, T. *et al.* Discovery of Novel Antitumor Sulfonamides Targeting G1 Phase of the Cell Cycle. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 19, p. 3789-3799, 26 aug. 1999. <https://doi.org/10.1021/jm9902638>.

PADILHA, M. M. *et al.* Estudo farmacobotânico das folhas de amoreira-preta, *Morus nigra* L., Moraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 621-626, aug/sep. 2010. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000400024>

PADILHA, M. M. *et al.* Antinociceptive effect of the extract of *Morus nigra* leaves in mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, n. 6, p. 1381-1385, 30 dez. 2009. <https://doi.org/10.1089/jmf.2009.0012>

Capítulo 1

PARIKH, K. P. **Gemini Surfactants synthesis, physicochemical properties and applications**. 2016. Thesis (Ph Doctoral dissertation). Maharaja Sayajirao University of Baroda. Department of Chemistry. Baroda, 2016. Available in: <http://hdl.handle.net/10603/133143>

PASPARAKIS, M.; VANDENABEELE, P. Necroptosis and its role in inflammation. **Nature**, v. 517, n. 7534, p. 311-320, 15 jan. 2015. <https://doi.org/10.1038/nature14191>

PATEL, V. B. *et al.* Colorectal Cancer: Chemopreventive Role of Curcumin and Resveratrol. **Nutrition and Cancer**, n. 62, v. 7, p. 958–967. 2010. doi:10.1080/01635581.2010.510259

PAWLOWSKA, A. M.; OLESZEK, W.; BRACA, A. Quali-quantitative Analyses of Flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (Moraceae) Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 9, p. 3377-3380, 16 apr. 2008. <https://doi.org/10.1021/jf703709r>

PETERS, G. J. Cancer drug resistance: a new perspective. **Cancer Drug Resist**, v. 1, p. 1-5, 19 mar. 2018. <https://doi.org/10.20517/cdr.2018.03>

PIRES, D. E.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. **Journal of medicinal chemistry**, v. 58, n. 9, p. 4066–4072. 2015. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00104>

PORNANONG, A.; NIPAPORN, B.; TEERAPOL, S. The properties and stability of anthocyanins in mulberry fruits. **Food Research International**, v. 43, n. 4, p. 1093-1097, 30 apr. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.01.022>

PRASAD, V. Do cancer drugs improve survival or quality of life? **British Medical Journal**, v. 359, n. j4528. 04 oct. 2017. <https://doi.org/10.1136/bmj.j4528>

PRICCI, M. *et al.* Curcumin and Colorectal Cancer: From Basic to Clinical Evidences. **International journal of molecular sciences**, n. 21, v. 7, p. 2364. 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21072364>

RAFIQ, S.; HACKETT, C. S.; BRENTJENS, R. J. Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*. v. 17, n. 3, p. 147-167, 17 dec. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0297-y>

REBECCA, V. W.; HERLYN, M. Nongenetic Mechanisms of Drug Resistance in Melanoma. *Annual Review of Cancer Biology*, v. 4, n. 1, p. 315-330, 25 nov. 2019. <https://doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-030419-033533>

ROSENBERG, J.E. *et al.* Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. **The Lancet**,

Capítulo 1

v. 387, n. 10031, p. 1909-1920, 04 mar. 2016. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00561-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00561-4)

SALGIA, R.; KULKARNI, P. The Genetic/Non-genetic Duality of Drug “Resistance” in Cancer. **Trends in Cancer**, v. 4, n. 2, p. 110-118, 01 feb. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2018.01.001>

SCHIRRMACHER, V. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). **International Journal of Oncology**, v. 54, n. 2, p. 407-419, feb. 2019. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4661>

SCHMIDT, S. *et al.* Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. **Cell Death Differ**, v. 11, p. 45-55, 09 jul. 2004. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401456>

SCHULZE, M. M. Tratamento Quimioterápico em Pacientes Oncológicos. **Revista Brasileira Oncologia Clínica**, v. 4, n. 12, p. 17-23, set./dez. 2007. <https://www.sbec.org.br/sbec-site/revista-sbec/pdfs/12/artigo3.pdf>

SEEBACHER, N. A. *et al.* Clinical development of targeted and immune based anti-cancer therapies. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 38, n. 156, 11 apr. 2019. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1094-2>

SEEBER, S.; SCHÜTTE, J. (Ed.). **Therapiekonzepte Onkologie**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1993.

SHARMA, A. *et al.* Immunotherapy of cancer. In: RICH, R.R. *et al.* (Ed.). **Clinical immunology: principles and practice**. 5 ed. Elsevier, 2018.

SHARMA, P.; ALLISON, J.P. The future of immune checkpoint therapy. **Science**, v. 348, n. 6230, p. 56-61, 03 apr. 2015. <https://doi.org/10.1126/science.aaa8172>

SHEHZAD, A.; WAHID, F.; LEE, Y.S. Curcumin in cancer chemoprevention: Molecular targets, pharmacokinetics, bioavailability, and clinical trials. **Archiv der Pharmazie**, v. 343, p. 489–499, 2010. doi: 10.1002/ardp.200900319.

SUN, Y. *et al.* Cell Permeable NBD Peptide-Modified Liposomes by Hyaluronic Acid Coating for the Synergistic Targeted Therapy of Metastatic Inflammatory Breast Cancer. **Molecular pharmaceutics**, v. 16, n. 3, p. 1140–1155, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b01123>

STREBHARDT, K.; ULLRICH, A. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, p. 473-480, 12 may. 2008. <https://doi.org/10.1038/nrc2394>

SUETH-SANTIAGO, V. *et al.* CURCUMIN, THE GOLDEN POWDER FROM TURMERIC: INSIGHTS INTO CHEMICAL AND BIOLOGICAL ACTIVITIES. **Química Nova**, v. 38, n. 4, 538-552, 05 mar. 2015. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150035>

Capítulo 1

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J.M. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann K, editor. **Methods in plant biochemistry: assay for bioactivity**. London: Academic Press; 1990. pp. 71–133.

TAIT, S. W. G.; ICHIM, G.; GREEN, D. R. Die another way – non-apoptotic mechanisms of cell death. **Journal of Cell Science**, v. 127, n. 10, p. 2135-2144, 15 may. 2014. <https://doi.org/10.1242/jcs.093575>

TAVARES, E. C. **Síntese e caracterização de derivados de sulfonamidas e adutos de Morita-Baylis-Hillman e sua atividade antifúngica e aceleradora da vulcanização da borracha natural**. 2013. Tese (Doutorado em Agroquímica). Universidade Federal de Viçosa. Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, Viçosa, 2013.

THARIAT, J. *et al.* Past, present and future of radiotherapy for the benefit of patients. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 10, n. 1, p. 52-60, 27 nov. 2012. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2012.203>

THIMMULAPPA, R.K. *et al.* Dibenzoylmethane activates Nrf2-dependent detoxification pathway and inhibits benzo(a)pyrene induced DNA adducts in lungs. **Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 5, p. 473-481, sep. 2008. <https://doi.org/10.2174/157340608785700199>

TONON, L. M.; SECOLI, S. L.; CAPONERO, R. Câncer colorretal: uma visão da abordagem terapêutica com bevacizumabe / A review of bevacizumab and its use in colorectal cancer. **Revista Brasileira de Cancerologia**. V. 53, n. 2, p. 173-82, abr.-jun. 2007. https://rbc.inca.gov.br/site/arquivos/n_53/v02/pdf/revisao2.pdf

TURAN, I. *et al.* Antiproliferative and apoptotic effect of *Morus nigra* extract on human prostate cancer cells. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 25, n. 2, p. 241-248, feb. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.06.002>

WALCZAK, H.; KRAMMER, P. H. The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) Apoptosis Systems. **Experimental Cell Research**, v. 256, n. 1, p. 58-66, 10 apr. 2000. <https://doi.org/10.1006/excr.2000.4840>

WATSON, J.L. Curcumin causes superoxide anion production and p53-independent apoptosis in human colon cancer cells. *Cancer Letters*, n. 297, p. 1–8, 2010. doi: 10.1016/j.canlet.2010.04.018.

XIANG, L. *et al.* Antitumor effects of curcumin on the proliferation, migration and apoptosis of human colorectal carcinoma HCT-116 cells. **Oncology Reports**, n. 44, p. 1997-2008, 2020. <https://doi.org/10.3892/or.2020.7765>

YILMAZ, S.; UÇAR, A.; GÖKTAŞ, B. Genotoxic and Genoprotective Potential of Black Mulberry (*Morus nigra*) Fruit. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 4, e20190337. 28 oct. 2019. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920190337>

Capítulo 1

YOUSEF, F.; MANSOUR, O.; HERBALI, J. Sulfonamides: Historical Discovery Development (Structure-Activity Relationship Notes). ***In-vitro In-vivo In-silico Journal***, v. 1, n. 1, p. 1-15, 06 may. 2018.

YU, R. Y. *et al.* Regulating the Golgi apparatus by co-delivery of a COX-2 inhibitor and Brefeldin A for suppression of tumor metastasis. *Biomaterials science*, v. 6, n. 8, p. 2144–2155, 24 jul. 2018. <https://doi.org/10.1039/c8bm00381e>

ZABOIKIN, M.; SRINIVASAKUMAR, N.; SCHUENING, F. Gene therapy with drug resistance genes. *Cancer Gene Therapy*, v. 13, p. 335-345, 01 apr. 2006. <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700912>

ZELLER, C.; BROWN, R. Therapeutic modulation of epigenetic drivers of drug resistance in ovarian cancer. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, v. 2, n. 5, p. 319-329, sep. 2010. <https://doi.org/10.1177/1758834010375759>

ZHANG, M. *et al.* Nanotechnology-based combination therapy for overcoming multidrug-resistant cancer. *Cancer Biology & Medicine*, v. 14, n. 3, p. 212, 03 jul. 2017. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2017.0054>

ZHANG, Q. *et al.* CAR-T Cell Therapy in Cancer: Tribulations and Road Ahead. *Journal of Immunology Research*, v. 2020, n. 1924379, 17 jan. 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/1924379>

ZHAO, Z. *et al.* The application of CAR-T cell therapy in hematological malignancies: advantages and challenges. ***Acta Pharmaceutica Sinica B***, v. 8, n. 4, p. 539-551, 5 apr. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.03.001>

ZÖCHBAUER-MÜLLER, S. *et al.* P-glycoprotein and MRP1 expression in axillary lymph node metastases of breast cancer patients. ***Anticancer research***, v. 21, n. 1A, p. 119-124, jan./fev. 2001.

CAPÍTULO 2

EFEITO DO COMPOSTO CANDIDATO À QUIMIOTERÁPICO (DPBP) NA MECÂNICA DAS CÉLULAS TUMORAIS MURINAS B16F10

1. INTRODUÇÃO

1.1. MARCAS DO CÂNCER

No ano de 2000, para elucidar a compreensão da notável diversidade de doenças neoplásicas, os oncologistas Douglas Hanahan e Robert A. Weinberg publicaram o trabalho *“The Hallmarks of Cancer”*, trazendo um compilado dos traços responsáveis pela evolução progressiva de células normais em tumorigênicas. Segundo os autores, as características do câncer dizem respeito a seis capacidades adquiridas pelas células neoplásicas ao longo da progressão tumoral: sustentação da sinalização proliferativa, evasão de supressores do crescimento, resistência à morte celular, imortalidade replicativa, sustentação da angiogênese, e invasão e metástase. Essas marcas se organizam de acordo com as etapas de complexidade da doença, e seguem uma ordem de sucessão análoga à evolução darwiniana, conferindo vantagens adaptativas às células malignas (HANAHAN *et al.*, 2000). No artigo *“Hallmarks of Cancer: The Next Generation”* de 2011, os autores acrescentaram duas novas características, consideradas emergentes, por não serem generalizadas ou validadas a todos os tumores. São elas, a capacidade da célula desregular o metabolismo energético, e a capacidade de fugir da destruição imunológica. No mesmo trabalho, os cientistas propuseram dois fatores consequentes das neoplasias que atuam como facilitadores da doença, sendo eles a instabilidade genômica que leva à mutabilidade e a promoção da inflamação (HANAHAN *et al.*, 2011).

1.2. PROCESSO METASTÁTICO

Entre as propriedades que distinguem os diferentes tipos de cânceres estão a velocidade com que as células se multiplicam e a capacidade de invasão das mesmas, conhecida como metástase (ALMEIDA *et al.*, 2005). A metástase representa o estágio mais relevante da neoplasia, sob o ponto de vista clínico, visto que é a causa de 90% das mortes por câncer (WEIGELT *et al.*, 2005).

Capítulo 2

O estadiamento do câncer é um processo que permite a determinação da extensão da doença oncológica no organismo do paciente. Ele possibilita estimar prognósticos, definir a melhor conduta terapêutica, e estabelecer uma linguagem universal. O sistema de estadiamento mais utilizado é o TNM, mantido pelo AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) e UICC (*Union for International Cancer Control*) (NCCN, 2020), e se trata de uma classificação anatômica, que descreve tumores da seguinte forma: T = grau de extensão do tumor primário; N = presença ou ausência de acometimento linfonodal regional e sua extensão; e M = presença ou ausência de metástases. A classificação clínica (cTNM) é realizada através de exame físico, exames de imagem ou biópsias das áreas afetadas, sendo uma abordagem inicial da doença. O estadiamento patológico (pTNM) ocorre após o tratamento cirúrgico, quando se obteve uma amostragem tumoral. Já o estadiamento pós-tratamento (ypTNM), permite a avaliação do novo grau de extensão da doença (AJCC, 2020). É importante ressaltar que o estadiamento varia de acordo com o tipo de tumor primário e órgão em que ele se encontra, e por isso, torna-se importante entender a complexidade das metástases e das interações entre a célula e seu microambiente tumoral.

Durante o processo metastático, algumas células tumorais se soltam do tumor primário, penetram o epitélio vascular (intravasamento) e viajam pela corrente sanguínea ou linfática. Essas células “viajantes” saem da circulação (extravasamento) e conseguem se estabelecer em tecidos e órgãos vizinhos ou distantes, onde dão origem a um tumor secundário. Apenas uma em cada cem células transformadas é capaz de sobreviver à defesa imune na corrente sanguínea para formar metástases (MEHLEN *et al.*, 2006). No novo tecido, essas células podem entrar em um estado de dormência ou proliferar e formar um novo tumor, onde darão origem a micrometástases e posteriormente a macrometástases (SHIBUE *et al.*, 2011).

Nesse sentido, os eventos que compõem a cascata metastática são marcados por alta complexidade. Segundo Nishida e colaboradores (2006), com a intensa proliferação e disseminação das células, o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos se faz necessário para suprir o aumento da demanda de oxigênio e nutrientes, bem como, para eliminar maior quantidade de resíduos do metabolismo celular. As interações celulares com o microambiente tumoral, ou seja, com o estroma circundante, que é constituído por proteínas da matriz extracelular (MEC), macrófagos, fibroblastos e células endoteliais, contribuem para a formação de novos

Capítulo 2

vasos sanguíneos e linfáticos (angiogênese e linfangiogênese, respectivamente) (NISHIDA *et al.*, 2006). Além disso, as células metastáticas do tumor primário sofrem uma série de alterações morfológicas e moleculares que resultam na perda da polaridade celular, diminuição do contato célula-célula e aquisição de motilidade (PEREIRA, 2005).

Para iniciar o processo metastático, as células neoplásicas precisam se mover para dentro dos vasos sanguíneos, sendo que estes, podem estar dentro do próprio tumor primário (neovasculatura) ou próximos a este. Esse movimento se dá através de uma transmigração paracelular (entre as adesões juncionais das células endoteliais) ou através de uma transmigração transcelular (onde elas atravessam o corpo das células endoteliais) (REYMOND *et al.*, 2013).

Durante a transmigração paracelular, as metaloproteinases da matriz (MMPs) realizam a digestão dos componentes da matriz extracelular (como colágeno, fibronectina e laminina) e das junções aderentes que mantêm o contato epitelial célula-célula. Essa degradação promove a substituição do complexo E-Caderina/ β -Catenina, por N-Caderina, fornecendo maior flexibilidade juncional e uma motilidade celular aprimorada (MURALI *et al.*, 2013).

As MMPs são enzimas proteolíticas, dependentes de zinco. Atualmente são conhecidas 24 MMPs, onde 23 são humanas (PEREIRA *et al.*, 2006). Elas podem ser classificadas de acordo com sua especificidade ao substrato, e as principais são: MMP-1 ou collagenase I, MMP-8 ou collagenase II e MMP-13 collagenase III (degradam colágeno I, II e III, respectivamente); MMP-2 ou gelatinase A e MMP-9 ou gelatinase B (degradam gelatina e colágeno IV); MMP-3 ou estromelisina 1 e MMP-10 ou estromelisina 2 (fibronectina e proteoglicanos); MMP-7 ou matrilisina 1 e MMP-26 ou matrilisina 2 (degradam fibronectina e colágeno IV); e as metaloproteinases ligadas à membrana – MMP-14 ou MT1-MMP transmembrana (degrada colágeno I, II, III, gelatina e fibronectina); MMP-15 ou MT2-MMP transmembrana (degrada fibronectina e laminina); MMP-16 ou MT3-MMP transmembrana (degrada colágeno III e fibronectina); MMP-17 ou MT4-MMP ancorada ao GPI (degrada gelatina e fibronectina); MMP-24 ou MT5-MMP transmembrana (degrada proteoglicanos); MMP-25 ou MT6-MMP ancorada ao GPI (degrada gelatina) (NAGASE *et al.*, 2006).

Capítulo 2

Nas células normais, em condições fisiológicas, as MMPs atuam em baixas concentrações. No entanto, nas células tumorais, elas são produzidas em quantidades excessivas e podem gerar danos teciduais (KERKELÄ *et al.*, 2003). Sua produção ocorre por todas as células que compõem o microambiente tumoral, incluindo as próprias células tumorais, as células do estroma e as células inflamatórias intratumorais, no entanto, as principais responsáveis pela expressão dessas enzimas são as células estromais adjacentes não malignas, induzidas pelas células tumorais a partir da liberação de citocinas e fatores de crescimento (NOËL *et al.*, 2008). As MMPs 2 e 9 apresentam a capacidade peculiar de degradar o colágeno IV que compõe a lâmina basal, e por isso, são consideradas importantes na aquisição do fenótipo invasivo das células neoplásicas (KERKELÄ *et al.*, 2003).

1.3. MIGRAÇÃO CELULAR

As células possuem diferentes modos de migração (individual ou coletiva). Células do sistema imune como os leucócitos por exemplo, migram de forma individual, respondendo rapidamente a estímulos. Enquanto isso, células epiteliais migram de forma coletiva, como durante o processo de cicatrização de feridas. As células tumorais, irão migrar de forma individual ou coletiva, de acordo com o tipo de tumor e de ambiente em que se encontram (KRAKHMAL *et al.*, 2015).

A migração individual pode ser classificada em ameboide ou mesenquimal. No modo de migração mesenquimal, a reorganização do citoesqueleto de actina é crítica para a transdiferenciação de células epiteliais em células mesenquimais móveis, um processo que se inicia nas células tumorais localizadas nas margens do tumor, e que é conhecido como “transição epitélio-mesenquimal” (EMT: *Epithelial-Mesenchymal Transition*) (THIERY *et al.*, 2009). Células que passam pela EMT se tornam indiferenciadas e com um comportamento similar às células mesenquimais. Quanto menos diferenciada for a célula, maior será sua capacidade migratória (ALIZADEH *et al.*, 2014).

As células que migram de modo mesenquimal se desprendem do tumor e adquirem forma de fuso. Estas exibem protrusões proeminentes, ricas em F-actina, e adesões que interagem fortemente com o substrato (dependentes de integrinas) (STUELLEN *et al.*, 2018). As protrusões são nomeadas com base em suas formas: filopódios (formato de agulha), pseudópodes (falsos pés redondos), lobópodes

Capítulo 2

(cilíndricos), lamelipódios (véus planos) e invasópodos (semelhantes aos lamelipódios, mas com atividade proteolítica da MEC) (GUAN, 2015). O fibroblasto é um exemplo clássico de célula que possui este modo de migração. Ele possui uma morfologia alongada, e libera MMPs para degradar as fibras da MEC, e assim, facilitar sua passagem. Por isso, esse movimento é conhecido como “gerador de caminho” (HECHT *et al.*, 2015). A migração individual do tipo mesenquimal é mais lenta, devido à forte interação da célula com as proteínas da matriz, característico de células de carcinoma e sarcoma (WELCH, 2015).

No movimento do tipo ameboide, as células adquirem um formato arredondado ou elipsoide que se deforma rapidamente, permitindo que as mesmas se comprimam para passarem através de estreitas lacunas na matriz extracelular. A motilidade é caracterizada por ciclos de expansão e contração do corpo celular mediados pela actinmiosina (PAŇKOVÁ *et al.*, 2010). É um tipo de migração mais rápida, no qual as células possuem fracas interações com o substrato, e, formam pequenas protrusões (WELCH, 2015).

Na migração ameboide, propulsões no formato de “bolhas” permitem à célula investigar o microambiente tumoral para encontrar a rota de movimento mais adequada. Por isso, esse tipo de migração é por vezes chamado de “localização de caminho” (HECHT *et al.*, 2015). Além disso, células que executam esse tipo de migração não são capazes de liberar enzimas proteolíticas, portanto, esse movimento prevalece quando a matriz extracelular encontrada é relativamente “mole”, por exemplo no sistema linfático e circulatório. Leucócitos, células dendríticas, células-tronco hematopoiéticas e células transformadas de leucemias e linfomas migram dessa forma (KRAKHMAL *et al.*, 2015).

Além disso, as células tumorais exibem grande plasticidade fenotípica, e são capazes de adaptar seu modo de migração frente às mudanças nas condições microambientais do estroma circundante (TADDEI *et al.*, 2013). A transição da migração do tipo ameboide em mesenquimal ou vice-versa é regulada por mudanças na densidade e na rigidez da MEC, e pode envolver um estado intermediário, onde as células apresentam características de ambos os fenótipos (TALKENBERGER *et al.*, 2017). Assim, sob efeito de medicamentos inibidores de integrinas e MMPs, as células tumorais recorrem ao mecanismo de invasão ameboide, que por ser mais primitivo, torna-se o único e mais eficaz modo de migração (KRAKHMAL *et al.*, 2015).

Capítulo 2

Como já foi dito anteriormente, a migração de célula única pode ser do tipo mesenquimal – dependente de protease –, ou ameboide – independente de protease. Contudo, para o movimento de um agrupamento de células, apenas o modo mesenquimal é empregado (GUAN, 2015). Além disso, já foi demonstrado que células da mesma linhagem, quando estão em grupo, respondem diferentemente de quando estão isoladas, frente aos mesmos sinais quimiotáticos e mecânicos (JIANG *et al.*, 2013).

Na migração coletiva as células se locomovem em conjunto, mantendo a sinalização e o contato intercelular. Um grupo de células se desprende do tumor mantendo as junções célula-célula, e uma ou pouca(s) célula(s) líder(es) abre caminho entre as proteínas da matriz extracelular. As células líderes passam pela EMT, adquirindo características mesenquimais, mas ainda permanecem aderidas ao grupo, com alta mobilidade e liberação MMPs para facilitar a passagem das outras células (HAEGER *et al.*, 2014).

As células tumorais migram coletivamente como folhas, fios, tubos ou aglomerados, que podem permanecer conectados ao tumor primário (invasão coordenada) ou mover-se como grupos ou aglomerados de células destacados (migração de coorte). A migração coletiva de células requer geração de força para puxar as células pela frente ou empurrá-las pela parte traseira. Essa energia é fornecida pelas integrinas, proteínas de ligação ao substrato nas células principais. Células de melanoma e cânceres de origem epitelial como carcinomas, em geral, utilizam este modo de migração (GUAN, 2015).

Resultados prévios obtidos por nosso grupo de pesquisa (NASCIMENTO *et al.*, 2018) identificaram que a linhagem celular de melanoma murino (B16F10) é sensível ao composto DPBP. B16F10 (ATCC® CCL-6475 TM) é uma linhagem celular de melanoma murino gerada como o subclone da décima passagem em série de células tumorais B16 em camundongos C57BL / 6J. *In vitro*, essas células crescem como uma população aderente, assumindo uma morfologia epitelial com comportamento altamente metastático (NAKAMURA *et al.*, 2002). Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi analisar se além de seletivo, esse composto também promove a inibição da migração celular (metástase) no melanoma.

Capítulo 2

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do composto derivado de DBM, 1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona (DPBP) na capacidade migratória da linhagem celular tumoral de melanoma murino – B16F10.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o comportamento migratório não induzido (normal) das células, por meio do modelo de migração não direcional;
- b) Medir o comprimento da lacuna de migração das células após o tratamento com a droga.

Capítulo 2

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ENSAIO DE MIGRAÇÃO

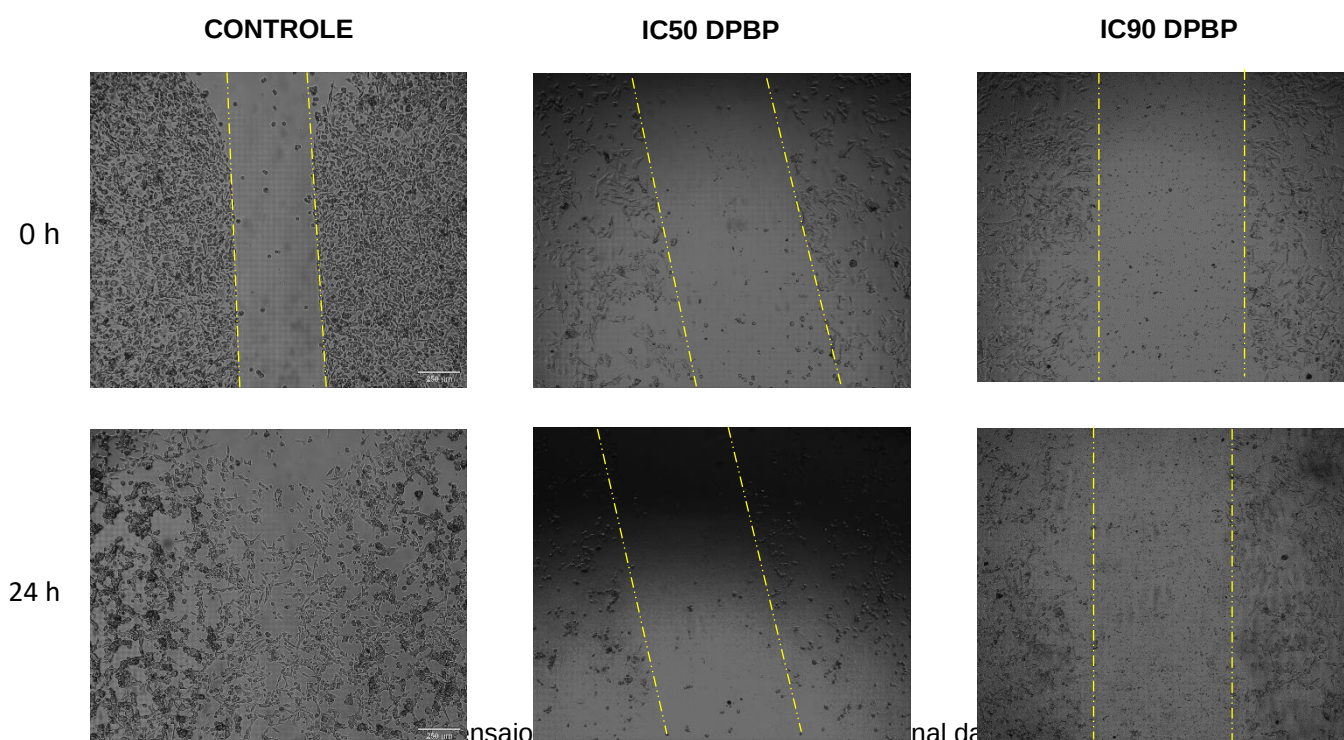
O ensaio de cicatrização de feridas (*Wound healing* ou *Fence assay*) foi utilizado para avaliar o efeito do composto DPBP sobre a capacidade migratória não-direcional das células tumorais murinas. Para o desenvolvimento destes experimentos, foram semeadas em placas de 24 poços 3×10^5 células por poço. Em seguida, as placas foram incubadas sob condições padrão por 24h ou até atingirem 80-90% de confluência. Após este período, em cada poço, foi feita uma “ferida” na monocamada celular através da delicada passagem da ponta de uma ponteira de micropipeta de 200 μ L. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS (solução fosfato salino) e adicionado meio de cultivo isento de SFB puro ou juntamente com o tratamento (DPBP) nas respectivas concentrações de IC₅₀ e IC₉₀ (NASCIMENTO, 2018b). As placas foram fotografadas com o auxílio de um microscópio invertido em diferentes tempos após o ferimento (0, 24h). Foram avaliados três poços por experimento e este foi realizado em triplicata. O comprimento da lacuna de migração foi medido usando o *software* ImageJ. Concomitantemente, a taxa de migração celular foi calculada utilizando a seguinte fórmula (HAMMADI *et al.*, 2017):

$$\% \text{ de fechamento da lacuna} = \frac{\text{Área da lacuna no tempo 0} - \text{Área da lacuna no tempo } n}{\text{Área da lacuna no tempo 0}} \times 100$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes de migração celular foram realizados com as células B16F10 tratadas com as respectivas concentrações de IC₅₀ e IC₉₀ do composto DPBP (FIGURA 13). Assim que a ferida foi formada na monocamada celular, o composto foi adicionado aos poços e as placas foram fotografadas em seguida (0h) e após 24h ao tratamento.

Figura 13 – Ensaio de cicatrização de feridas em células de melanoma murino



B16F10 controle e tratadas com o composto DPBP em 0 e 24hs após a realização da ferida. Medidas obtidas através do software ImageJ. Barras de escala de 250 μ m.

A TABELA 8 mostra os comprimentos das lacunas de células B16F10 nos poços medidas com a utilização do software ImageJ. A taxa de migração celular foi calculada a partir da fórmula sugerida por (HAMMADI *et al.*, 2017), onde a área no tempo 0 é subtraída pela área da lacuna após 24h, esse valor é multiplicado por 100 e dividido pela área da lacuna do tempo 0. Como pode ser observado na FIGURA 14, o composto DPBP inibe a migração da célula de melanoma murino (B16F10), tanto na concentração inibitória de 50% (IC₅₀) quanto na concentração inibitória de 90% (IC₉₀), sendo a porcentagem de fechamento da lacuna de 8,29% e 4,74% respectivamente, quando comparados ao controle, 53,93%. Esse dado é de extrema relevância, visto que a metástase é a principal causa de mortes por câncer em todo o mundo. O composto analisado além de ser tóxico para a célula tumoral, dificulta a

Capítulo 2

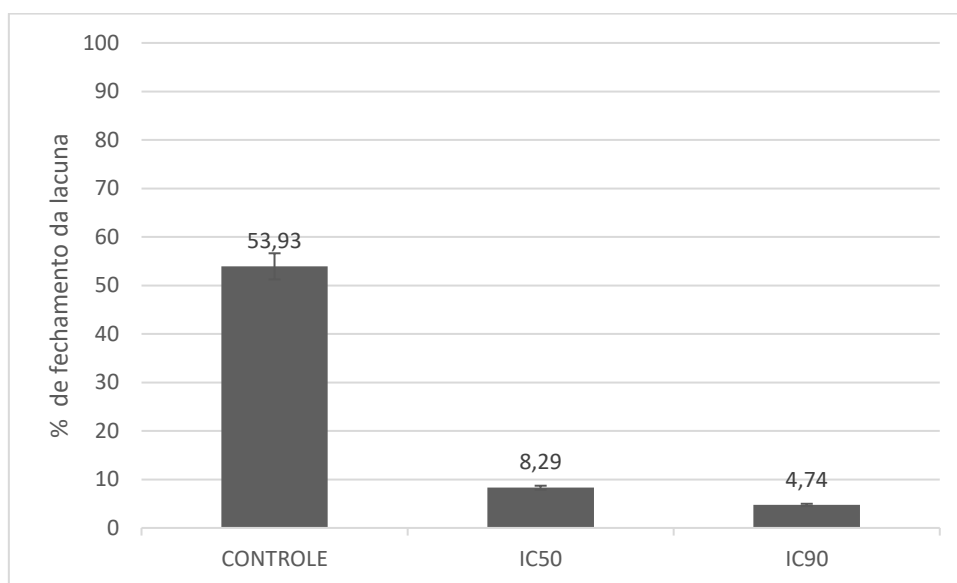
motilidade das células cancerígenas sobreviventes, impedindo que elas colonizem outros tecidos.

Tabela 8 – Resultado representativo da migração celular

Tempo	Área (longitude)	
	0h	24h
Controle	508 μm	234 μm
IC ₅₀ (6,53 $\mu\text{g/mL}$)	868 μm	796 μm
IC ₉₀ (65,0 $\mu\text{g/mL}$)	970 μm	924 μm

Fonte: Autora (2021).

Figura 14 – Efeito do DPBP sobre a mecânica das células B16F10 após 24 horas de tratamento



Fonte: Autora (2021).

O melanoma é formado a partir da transformação maligna dos melanócitos, as células derivadas de células-tronco da crista neural (NCSCs) responsáveis pela produção de melanina na pele (CRAMER, 1991). A origem nas NCSC dos melanócitos explica a capacidade das células de melanoma de migrar e prosperar em órgãos importantes, principalmente no cérebro e nos pulmões. Embora o melanoma constitua cerca de 5% de todos os cânceres de pele, ele é responsável por mais de 75% das mortes por câncer de pele, e a taxa de sobrevivência relativa em 5 anos de pacientes com doença localizada ou regional é de 98% e 64%, respectivamente. Em contraste, a taxa

Capítulo 2

de sobrevida de 5 anos cai para 23% em pacientes com melanoma metastático (SCHMIDBERGER *et al.*, 2018). Uma vez disseminado, apenas alguns pacientes com melanoma apresentam cura de longa duração com as atuais terapias direcionadas e imunológicas. No entanto, 60-70% dos pacientes com melanoma não respondem às terapias com inibidores de *checkpoint* devido à toxicidade e resistência intrínseca das células cancerosas. Dessa forma, as principais opções de tratamento nos dias atuais continuam sendo a cirurgia, a radiação, e a quimioterapia (JERBY-ARNON *et al.*, 2018).

Zhao e equipe (2014) relataram que a wogonina (5,7-diidroxi-8-metoxiflavona), um dos componentes ativos dos flavonóides do extrato *Radix Scutellariae*, que é extraído da raiz seca da planta *Scutellaria baicalensis Georgi*, causa supressão da migração celular, adesão, invasão e remodelamento da actina ao inibir a expressão da MMP-2 e Rac1 *in vitro*, além de reduzir o número de nódulos tumorais do pulmão *in vivo*. GUO *et al.* (2020) relataram que a S-Petasina, um sesquiterpeno dietético isolado da planta *Petasites japonicus*, pode induzir a apoptose e inibir a migração celular por meio da ativação da sinalização da via p53 em células de melanoma B16F10 e células A375. Im e colegas (2012) investigaram se a migração de células de melanoma (B16F10) poderia ser controlada pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em condições de normoxia. Eles observaram tanto *in vitro* como *in vivo*, que o aumento da migração celular foi acompanhado pela produção de ROS e fosforilação de ERK. Esse resultado sugere que ROS pode ser um modulador para controlar a migração por meio da regulação do microambiente tumoral, sendo promissora a inibição de suas vias de sinalização no desenvolvimento de terapias antimetastáticas. Nogueira e colaboradores (2018) observaram em estudos *in vivo*, que o DPBP promoveu um aumento nos níveis de superóxido dismutase em gel transdérmico, e diminuição dos níveis de óxido nítrico na aplicação tópica de pomada, levando ao aumento da produção de radicais livres pelas células. Além disso, os resultados histopatológicos dos linfonodos sentinela não revelaram sinais de invasão em nenhum dos grupos tratados, revelando assim, que o DPBP pode prevenir a formação de metástases quando aplicado como pomada ou gel transdérmico.

Segundo Baêta (2019), no Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS) utiliza como principal agente quimioterápico o composto Dacarbazina, devido, principalmente, a seu baixo custo. Este medicamento apresenta IS = 1,0 o que significa que ele é pouco

Capítulo 2

seletivo para as células tumorais e atua em qualquer fase do ciclo celular, apresentando uma resposta terapêutica muito baixa, sendo assim classificado como um agente pouco específico para o tratamento desse câncer (FAGHFURI *et al.*, 2015).

Os dados aqui citados e os resultados obtidos neste trabalho evidenciam ainda mais o efeito terapêutico promissor do composto DPBP, que além de apresentar alta seletividade para células tumorais de melanoma murino (IS= 41,94) (NASCIMENTO, 2018a), possui também efeito inibitório da migração dessa linhagem celular, ou seja, protege o organismo contra o surgimento de metástases em outros tecidos.

Capítulo 2

5. CONCLUSÃO

No presente estudo, testamos a eficiência antimetastática de um novo derivado de dibenzoilmetano, DPBP, em células de melanoma murino – B16F10. Resultados prévios obtidos pelo grupo de pesquisa demonstraram que o composto DPBP é um agente promissor para o tratamento do melanoma, por apresentar um IS consideravelmente alto (41,94) e um IC₅₀ consideravelmente baixo (6,53 µg/mL), além de possuir mecanismo de ação molecular por interação direta com o DNA (DPBP-DNA), verificada por testes com pinça óptica. A partir desses dados, propusemos que o DPBP também poderia ser capaz de promover a inibição da motilidade celular. Após a realização de ensaios de migração não-direcional pelo teste de cicatrização de feridas (*Wound healing*), obtivemos a confirmação dessa hipótese, ao verificar que nas concentrações de IC₅₀ e IC₉₀ o composto impede que as células migrem, fornecendo proteção adicional contra a formação de metástases. Portanto, esses resultados indicam que o composto DPBP é um potencial medicamento para o tratamento do melanoma.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

A seguir, esperamos realizar os testes de *Wound healing* na linhagem tumoral humana de CCR (HT29), tratada com o composto DPBP, bem como, verificar em ambas as linhagens – B16F10 e HT29 –, como o composto interfere nas especializações da membrana responsáveis pela adesão célula-célula, nas proteínas do citoesqueleto responsáveis pela motilidade celular e nas metaloproteinases da matriz (MMPs) responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular.

Capítulo 2

7. REFERÊNCIAS

ALIZADEH, A. M.; SHIRI, S.; FARSINEJAD, S. Metastasis review: from bench to bedside. **Tumor Biology**, v. 35, p. 8483-8523, 08 aug. 2014. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2421-z>

ALMEIDA, V. L. *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, jan./fev. 2005. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000100021>

AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER (AJCC). **What is Cancer Staging?** Chicago, EUA, 2020. Disponível em: <https://www.cancerstaging.org/references-tools/Pages/What-is-Cancer-Staging.aspx> Acesso em: 20 jun. 2020.

BAÊTA, J. V. B. P. **Síntese e avaliação da atividade antimelanoma *in vitro*, *in silico* e *in vivo* do 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DAP)**. 2019. Tese (Doutorado em Bioquímica Aplicada). Universidade Federal de Viçosa. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, Viçosa, 2019.

CRAMER, S. F. The origin of epidermal melanocytes. Implications for the histogenesis of nevi and melanomas. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**. v. 115, n. 2, p. 115–119. 01 feb. 1991.

DENG, S.-Z. *et al.* Human marrow stromal cells secrete microRNA-375-containing exosomes to regulate glioma progression. **Cancer Gene Therapy**, v. 27, p. 203-215, 07 feb. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41417-019-0079-9>

FAGHFURI, E. *et al.* Nivolumab and pembrolizumab as immune-modulating monoclonal antibodies targeting the PD-1 receptor to treat melanoma. **Expert review of anticancer therapy**, v. 15, n. 9, p. 981-993, 2015.

GUAN, X. Cancer metastases: challenges and opportunities. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 5, n. 5, p. 402-418, 08 sep. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.07.005>

GUO, L. *et al.* S-petasin induces apoptosis and inhibits cell migration through activation of p53 pathway signaling in melanoma B16F10 cells and A375 cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 692, n. 108519, 15 oct. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108519>

HAEGGER, A., *et al.* Cell jamming: Collective invasion of mesenchymal tumor cells imposed by tissue confinement. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1840, n. 8, p. 2386-2395, 08 apr. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.03.020>

HAMMADI, N.I. *et al.* Evaluation of *in vitro* efficacy of docetaxel-loaded calcium carbonate aragonite nanoparticles (DTX-CaCO₃NP) on 4T1 mouse breast cancer cell line. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal**, v. 53, n. 10, p. 896-907, 15 sep. 2017. <https://doi.org/10.1007/s11626-017-0197-3>

Capítulo 2

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 04 mar. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 07 jan. 2000. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)

HECHT, I. *et al.* Tumor Invasion Optimization by Mesenchymal-Amoeboid Heterogeneity. **Scientific Reports**, v. 5, n. 10622. 27 may. 2015. <https://doi.org/10.1038/srep10622>

IM, Y. S.; RYU, Y. K.; MOON, E. Y. Mouse Melanoma Cell Migration is Dependent on Production of Reactive Oxygen Species under Normoxia Condition. **Biomolecules & therapeutics**, v. 20, n. 2, p. 165–170. 2012. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2012.20.2.165>

JERBY-ARNON, L. *et al.* A cancer cell program promotes T cell exclusion and resistance to checkpoint blockade. **Cell**, v. 175, n. e24, p. 984–97. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.006>

JIANG, J. *et al.* Collective cell migration: Implications for wound healing and cancer invasion. **Burns & Trauma**, v. 1, n. 1, p. 21-26, 18 jun. 2013. <https://doi.org/10.4103/2321-3868.113331>

KERKELÄ, E.; SAARIALHO-KERE, U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. **Experimental dermatology**, v. 12, n. 2, p. 109–125, apr. 2003. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0625.2003.120201.x>

KRAKHMAL, N.V. *et al.* Cancer Invasion: Patterns and Mechanisms. **Acta Naturae**, v. 7, n. 2, p. 17-28, 27 feb. 2015. <https://doi.org/10.32607/20758251-2015-7-2-17-28>

LEVE, F. **Participação da GTPase Rho na dinâmica do complexo juncional apical e do citoesqueleto de actina na progressão do câncer colorretal**. 2011. Tese (Doutorado em Oncologia). Instituto Nacional de Câncer. Programa de Pós-graduação em Oncologia, Rio de Janeiro, 2011.

MEHLEN, P.; PUISIEUX, A. Metastasis: a question of life or death. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 6, p. 449-458, 01 jun. 2006. <https://doi.org/10.1038/nrc1886>
monoclonal antibodies targeting the PD-1 receptor to treat melanoma. **Expert review**

MURALI, A. K.; NORRIS, J. S. The Role of E-Cadherin-Catenin Complex in Prostate Cancer Progression. *In*: HAMILTON, G. **Advances in Prostate Cancer**. London: IntechOpen, 2013, chap. 26, p. 641-692. <https://doi.org/10.5772/52751>

NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovascular research**, v. 69, n. 3, p. 562–573, 15 feb. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.12.002>

Capítulo 2

NAKAMURA, K. *et al.* Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. **Life Sciences**, v. 70, n. 7, 791–798, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(01\)01454-0](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(01)01454-0)

NASCIMENTO, F. R. *et al.* New antineoplastic agent based on a dibenzoylmethane derivative: Cytotoxic effect and direct interaction with DNA. **Biophysical Chemistry**, v. 239, p. 1-6. 28 apr. 2018b. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2018.04.009>

NASCIMENTO, F. R. **Síntese, caracterização e avaliação da atividade antimelanoma *in Vitro* e *in Vivo* do derivado sintético 1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona**. 2018a. Tese (Doutorado em Bioquímica Aplicada). Universidade Federal de Viçosa. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, Viçosa, 2018a.

NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK (NCCN). Cancer **Staging Guide**. Pennsylvania, EUA, 2020. Disponível em: <https://www.nccn.org/patients/resources/diagnosis/staging.aspx> Acesso em: 20 jun. 2020.

NISHIDA, N. *et al.* Angiogenesis in cancer. **Vascular Health and Risk Management**, v. 2, n. 3, p. 213-219, sep. 2006. <https://doi.org/10.2147/vhrm.2006.2.3.213>

NOËL, A.; JOST, M.; MAQUOI, E. Matrix metalloproteinases at cancer tumor-host interface. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 19, n. 1, p. 52–60, feb. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2007.05.011>
of anticancer therapy, v. 15, n. 9, p. 981-993, 2015.

PAŇKOVÁ, K. *et al.* The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 67, n. 1, 63–71, jan. 2010. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0132-1>

PEREIRA, A. *et al.* O papel da MMP-2 e -9 no desenvolvimento do carcinoma epidermoide. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, p. 257–262, 2006.

PEREIRA, A.L.A., *et al.* O papel das proteínas da matriz extracelular e das metaloproteinases em carcinomas de cabeça e pescoço: uma atualização bibliográfica. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 71, n. 1, p. 81-86, jan./fev. 2005. <https://doi.org/10.1590/s0034-72992005000100014>

REYMOND, N.; D'AGUA, B. B.; RIDLEY, A. J. Crossing the endothelial barrier during metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 12, p. 858–870, 22 nov. 2013. <https://doi.org/10.1038/nrc3628>.

SCHMIDBERGER, H. *et al.* Long-term survival of patients after ipilimumab and hypofractionated brain radiotherapy for brain metastases of malignant melanoma: sequence matters. **Strahlentherapie und Onkologie**. v. 194, p. 1144–1151. 2018. <https://doi.org/10.1007/s00066-018-1356-5>

Capítulo 2

SHIBUE, T.; WEINBERG, R.A. Metastatic colonization: Settlement, adaptation and propagation of tumor cells in a foreign tissue environment. **Seminars in Cancer Biology**, v. 21, n. 2, p. 99-106, apr. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2010.12.003>

STUELTEN, C.H.; PARENT, C.A.; MONTELL, D.J. Cell motility in cancer invasion and metastasis: insights from simple model organisms. **Nature reviews. Cancer**, v. 18, n. 5, p. 296-312, may. 2018. <https://doi.org/10.1038/nrc.2018.15>

TADDEI, M. L. *et al.* Microenvironment and tumor cell plasticity: An easy way out. **Cancer Letters**, v. 341, n. 1, p. 80-96, 28 nov.2013. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.01.042>

TALKENBERGER, K. *et al.* Amoeboid-mesenchymal migration plasticity promotes invasion only in complex heterogeneous microenvironments. **Scientific Reports**, v. 7, n. 9237, 23 aug. 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09300-3>

THIERY, J. P., *et al.* Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. **Cell**, v. 139, n. 5, p. 871-890, 25 nov. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007>

WEIGELT, B.; PETERSE, J. L.; VAN 'T VEER, L. J. Breast cancer metastasis: markers and models. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 8, p. 591-602, 01 aug. 2005. <https://doi.org/10.1038/nrc1670>

WELCH, M. D. Cell Migration, Freshly Squeezed. **Cell**, v. 160, n. 4, p. 581-582, 12 feb. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.053>

ZHAO, K. *et al.* Wogonin Suppresses Melanoma Cell B16-F10 Invasion and Migration by Inhibiting Ras-Medicated Pathways. **PLoS ONE** n. 9, v.9, p. e106458., 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106458>

APÊNDICE A

Devido à pandemia da doença COVID-19 causada pelo corona vírus Sars_CoV-2, o desenvolvimento deste trabalho de pesquisa sofreu atrasos.

Em março de 2020, assim que a doença foi declarada como pandêmica pela OMS, o funcionamento do laboratório foi suspenso por tempo indeterminado, de forma a cumprir com as medidas emergenciais de restrição e acessibilidade a locais públicos e privados. Em novembro de 2020, iniciou-se a retomada gradativa das atividades, e ainda assim, houveram avanços significativos na pesquisa, cujos resultados foram apresentados.