

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA E
FARMACOLOGIA**

**Avaliação da ativação de apoptose e autofagia como mecanismo
de citotoxicidade induzida por um nitrocomposto e uma
hidrazona em células tumorais humanas**

GABRIELE DE MATOS CARDOSO PERDIGÃO

**Belo Horizonte
2016**

GABRIELE DE MATOS CARDOSO PERDIGÃO

Avaliação da ativação de apoptose e autofagia como mecanismo de citotoxicidade induzida por um nitrocomposto e uma hidrazona em células tumorais humanas

Projeto desenvolvido no Programa de pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Elaine Maria de Souza Fagundes

**Belo Horizonte
2016**

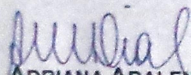
- 043 Perdigão, Gabriele de Matos Cardoso.
Avaliação da ativação de apoptose e autofagia como mecanismo de citotoxicidade induzida por um nitrocomposto e uma hidrazona em células tumorais humanas [manuscrito] Gabriele de Matos Cardoso Perdigão. – 2016.
- 98 f.: il. ; 29,5 cm.
- Orientadora: Prof.^a Dr.^a Elaine Maria de Souza Fagundes.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.
1. Farmacologia - Teses. 2. Fármacos. 3. Hidrazona. 4. Nitrocompostos.
5. Apoptose. I. Fagundes, Elaine Maria de Souza. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 615

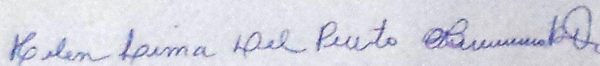
**"AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE APOPTOSE E AUTOFAGIA
COMO MECANISMO DE CITOTOXICIDADE INDUZIDA POR UM
NITROCOMPOSTO E UMA HIDRAZONA
EM CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS"**

GABRIELE DE MATOS CARDOSO PERDIGÃO

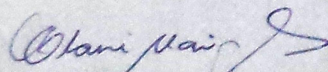
Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 23 de setembro de 2016, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROFA. DR^a. ADRIANA ABALEN MARTINS DIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROFA. DR^a. HELEN LIMA DEL PUERTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROFA. DR^a. ELAINE MARIA DE SOUZA FAGUNDES
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADORA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 23 de setembro de 2016

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Elaine Maria de Souza Fagundes.

APOIO FINANCEIRO:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

COLABORADORES:

- Prof^a Dra. Renata Barbosa de Oliveira
- Prof^a Dra. Heloisa Beraldo

AGRADECIMENTOS

Obrigada à Prof. Dra^a Elaine Fagundes pela orientação, contribuição e ensinamentos que contribuíram imensamente para meu crescimento tanto pessoal quanto profissional desde os tempos da graduação.

Às professoras Renata de Oliveira (FAFAR - UFMG) e Heloísa Beraldo (DQ – UFMG) pelas substâncias concedidas e pela resolução das minhas dúvidas.

À Kamila pela disposição e pela paciência em me ouvir e aconselhar. Obrigada pela “co-orientação” e por trabalhar com tanta excelência. Grande parte deste trabalho não teria sido possível sem sua colaboração!

Aos colegas de laboratório pelas ajudas nos experimentos, sugestões e pelas discussões dos resultados: Lucas, Pedro, Vítor, Robson, Jonas, Bruno, Ludmila, Débora, Fabiana e Chico.

Ao departamento de Fisiologia e Farmacologia e ao programa de pós-graduação pelo conhecimento transmitido e oportunidade.

À Capes, pela bolsa de mestrado.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Agora, gostaria de agradecer em especial aos que dão sentido a todo trabalho e a toda a minha vida:

Ao Senhor Deus, por ser meu melhor amigo e abrigo. Sua Presença durante diversos momentos foi tudo o que tive. Obrigada por ter me concedido força e a paciência necessária para finalizar mais esta etapa da minha vida.

Ao meu marido e grande amor, Juliano. Obrigada pelo incentivo diário, por abrir mão de tanta coisa, pela compreensão, amor e ajuda. Te amo!

À minha mãe por sempre me incentivar a continuar estudando, pelas orações e por ser quem é. Se algum dia eu chegar a ser metade da grande mulher que você é, já me considerarei imensamente realizada.

Ao meu pai, exemplo de honestidade, pai, esposo, cristão, filho. Muito obrigada por ter feitos tantos sacrifícios para que eu e minha irmã conseguíssemos estudar.

À minha irmã Natalia, pelo exemplo de profissional, estudante e pesquisadora. Seu exemplo me fez ter coragem de abrir mão de um emprego e correr atrás desse sonho.

Aos meus amigos da faculdade que contribuem para que eu seja cada dia uma profissional e pessoa melhor: Laís, Francinely, Ana Marta, Joyce, Carla, Grazielle, Fabiana e Bruno.

Às minhas amigas que com certeza ficarão para sempre: Lorena, Nabila e Ranucy. Muito obrigada por sempre me incentivarem e acreditarem em mim e no meu trabalho.

Às minhas amigas de oração: as mães do Samuel, Lucca e Álvaro (Glaucia, Núbia e Tainah). Obrigada por cada palavra, cada intercessão, cada vez que foram usadas por Deus para me abençoar.

Obrigada aos meus demais amigos também sempre presentes por ouvirem meus desabafos e por me aconselharem com tanta sabedoria: Aline, Patrícia Kelly, Pedro mais, Daniela, Camila e tantos outros.

Enfim, a todos os meus amigos e familiares, pelo apoio e incentivo.

“Quem conheceu a mente do Senhor? Quem foi seu conselheiro?

Porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas.

Glória a Ele eternamente. Amém!”

Romanos 11: 34 e 36

“Aplica o teu coração à instrução e os teus ouvidos às palavras de conhecimento.”

Provérbios 23:12

RESUMO

A busca por novos fármacos antitumorais é uma necessidade principalmente devido aos tratamentos atuais apresentarem alta toxicidade, baixa efetividade e aparecimento de resistência em alguns tipos de cânceres. No processo de descoberta de fármacos, compostos de diferentes classes químicas são avaliados em modelos preditivos para seleção dos mais ativos. Estes são submetidos a melhoramento químico e estudos da relação estrutura-atividade (REA) para obtenção dos candidatos mais promissores. Neste trabalho, realizamos uma investigação do potencial antitumoral e elucidação do mecanismo de ação de duas substâncias: uma hidrazona (E6) e um nitrocomposto (EBAC). Essas substâncias demonstraram baixa toxicidade em modelos de células normais como Vero e de sangue periférico humano (PBMC). A avaliação do mecanismo de ação foi realizada na linhagem humana leucêmica (HL60) através de cinética de tempo por microscopia de contraste de fase e liberação de LDH, sendo possível verificar que as células HL60 apresentavam aspectos compatíveis com apoptose após tratamento com as duas substâncias. Fragmentação de DNA foi confirmada após 24 horas de tratamento por citometria de fluxo com marcação com PI, análise em gel de agarose e por observação dos núcleos após marcação com Hoescht 33342. Ensaios com inibidor de caspases Z-VAD-FMK, Anexina V e PI, quantificação de espécies reativas de oxigênio, ativação de caspase-3 confirmaram morte por apoptose induzida pelas duas substâncias. Perda do potencial de membrana mitocondrial e detecção de caspase -9 sugerem apoptose por meio de ativação da via mitocondrial nessa linhagem leucêmica. Diferenças no mecanismo de morte foram observadas para a EBAC que induziu acúmulo de vacúolos autofágicos após análise com alaranjado de acridina e aumento da quantidade de células viáveis após utilização do inibidor de autofagia Bafilomicina A1. Estes resultados são sugestivos de que EBAC induziu autofagia e apoptose simultaneamente, o que não foi observado para E6. Os resultados em conjunto demonstram que as substâncias EBAC e E6 são substâncias promissoras com potencial antitumoral e se justifica a continuidade de estudos de relação estrutura-atividade para obtenção de derivados mais ativos.

Palavras Chave: atividade citotóxica, apoptose, hidrazona, nitrocomposto.

ABSTRACT

The search for new antitumor drugs is a necessity mainly due to current treatments present high toxicity, low effectiveness and emergence of resistance in some types of cancers. In the process of drug discovery, compounds of different chemical classes are assessed in models predictive and selected for chemical optimization and studies of structure-activity relationship (SAR) to obtain the most promising candidates. We carried out an investigation of mechanism of action and the antitumor potential of two substances: a hydrazone (E6) and nitrocomposto (EBAC). These substances showed low toxicity for normal cells such as human peripheral blood mononuclear cell (PBMC). The evaluation of the mechanism of action was performed on leukemic cell line (HL60) by phase contrast microscopy and LDH release, being able to verify that HL60 cells had features consistent with apoptosis after EBAC and E6 treatment. DNA fragmentation was confirmed after 24 hours of treatment by cell cycle, DNA electrophoresis and fluorescence microscopy after Hoechst 33342-staining. The use of pan-caspase inhibitor (Z-VAD-FMK), Annexin V and PI, quantification of reactive oxygen species and caspase-3 activation confirmed apoptosis. Loss of the mitochondrial membrane potential and caspase -9 detection suggest mitochondrial pathway activation in this cell line. Differences in the mechanism of death were observed for EBAC that induced accumulation of autophagic vacuoles analysis after acridine orange and increasing the amount of viable cells after use of the autophagy inhibitor bafilomycin A1. These results suggest that EBAC induced autophagy and apoptosis simultaneously, which was not observed for E6. The results together show that EBAC and E6 are promising substances with anti-tumor potential and justify the continuation of studies of structure-activity relationship for obtaining more active derivatives.

Keywords: cytotoxicity, apoptosis, hydrazone, nitrocompounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Via intrínseca e extrínseca da apoptose.	28
Figura 2	Representação da fórmula estrutural EBAC.	32
Figura 3	Representação da fórmula estrutural da E6.	34
Figura 4	Curva dose resposta em soft-ágar e inibição da formação de colônias em células MCF-7 tratadas com EBAC.	50
Figura 5	Inibição da formação de colônias de células MCF-7 e HCT-116 tratadas com EBAC e E6.	52
Figura 6	Alterações morfológicas em células HL60 induzidas pelo tratamento com EBAC.	55
Figura 7	Tratamento E6 provoca mudanças morfológicas em células HL60.	56
Figura 8	Alterações nos parâmetros morfométricos FSC e SSC de células HL60 após tratamento com EBAC.	57
Figura 9	Liberação de LDH após tratamento com EBAC 40 μ M em células HL60	58
Figura 10	Efeito da liberação de LDH após tratamento com E6 10 μ M em células HL60.	58
Figura 11	Efeito da substância EBAC sobre o ciclo celular das células HL60.	60
Figura 12	Efeitos da substância E6 sobre o ciclo celular da linhagem HL60 após 24 horas de tratamento.	61
Figura 13	Efeitos da substância E6 sobre o ciclo celular da linhagem HL60 após 48 horas de tratamento.	62
Figura 14	Análise da morfologia nuclear das células HL60 tratadas com o nitrocomposto EBAC.	63
Figura 15	Análise da morfologia nuclear das células HL60 tratadas com a hidrazona E6.	64
Figura 16	Eletroforese de DNA das células HL60 tratadas com EBAC e E6.	65
Figura 17	Avaliação da morte celular, através da marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo (PI) por citometria de fluxo.	67

Figura 18	Inibição da fragmentação de DNA induzida por EBAC e E6 após pré-tratamento com Z-VAD-FMK em células HL60.	69
Figura 19	Efeito de EBAC e E6 na ativação de caspase -3 em células HL60.	70
Figura 20	Avaliação da ativação da caspase -8 e -9 por clivagem do substrato específico.	71
Figura 21	Diminuição do potencial de membrana mitocondrial de células HL60 tratadas com EBAC e E6.	72
Figura 22	Alteração nos níveis de espécies reativas de oxigênio em células HL60 tratadas com EBAC.	73
Figura 23	Alteração nos níveis de espécies reativas de oxigênio em células HL60 tratadas com E6 em células HL60.	74
Figura 24	Marcação dos agregados acídicos com alaranjado de acridina em células autofágicas.	75
Figura 25	Inibição da fragmentação de DNA induzida por EBAC após utilização de Bafilomicina A1 em células HL60.	76
Figura 26	Esquema representativo do mecanismo de indução de morte da substância EBAC em células HL60.	90
Figura 27	Esquema representativo do mecanismo de indução de morte da substância E6 em células HL60.	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de IC50 e índice de seletividade (IS) da amostra E6 em diferentes linhagens celulares cultivadas em modelo bidimensional e em soft-ágar.....51

Tabela 2 - Valores de IC50 e índice de seletividade (IS) das substâncias EBAC e E6 em células HL60 e PBMC.....53

LISTA DE ABREVIADURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

µg – Micrograma

µM - Micromolar

2N - Células Diploides

ANB- Ácido 4-bromometil-3-nitrobenzóico

ANOVA – Análise de Variância Entre Grupos

AO – Alaranjado de acridina (do inglês, *acridine orange*)

ATCC – Coleção americana dos tipos celulares (do inglês, *American Type Culture Collection*)

ATG – Proteínas associadas à autofagia (do inglês, *autophagy-related protein*)

ATP – Adenosina Tri-Fosfato

AVO – vacúolos autofágicos (do inglês, *autophagic vacuoles*)

Baf – Bafilomicina A1

BCL-2 – Célula tipo B de linfoma (do inglês, *B-cell lymphoma 2*)

Ca⁺⁺ - Cátion de Cálcio

Céls - células

CO₂ – Dióxido de Carbono

CRTL - Controle

DCF - 2,7-diclorofluoresceína

DCFH - 2,7-diclorodihidrofluoresceína

DCFH-DA -Diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

EROS- Espécies reativas de oxigênio.

Eto – Etoposídeo

FAS – Fator relacionado a apoptose (do inglês, *Factor related apoptosis*)

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

G0/G1 – Fase de Gap 1

G2/M – Fase de Gap 2 e mitose

HCl – Ácido Clorídrico

HFS- Solução fluorocrômica hipotônica (do inglês, *hypotonic fluorescent solution*)

HL60 – Linhagem promielocítica de sangue periférico

IAP – Inibidores de apoptose (do inglês, *inhibitors of apoptosis*)

IARC– Agência internacional de pesquisa no câncer (do inglês, *International Agency for Research on Cancer*)

IC50- Concentração inibitória para 50% da viabilidade celular.

IC90- Concentração inibitória para 90% da viabilidade celular.

INCA – Instituto Nacional de Câncer

LDH - Lactato Desidrogenase

min - Minuto

mL – Mililitro

MTT- Brometo de 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difeniltetrazol.

NAD - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida

°C – Graus Celsius

pb – Par de Base

PBMC- Células mononucleares do sangue periférico humano (do inglês, *peripheral blood mononuclear cells*).

PBS - Tampão fosfato-salino (do inglês, *phosphate buffered saline*)

PBS-W – Tampão fosfato-salino para lavagem (0,5% de albumina sérica bovina) (do inglês, *phosphate buffered saline - wash*)

PBS-P – PBS-W com 0,5% de saponina

pH – Potencial Hidrogeniônico

PI- Iodeto de Propídeo (do inglês, *propidium iodide*).

PMM – potencial de membrana mitocondrial

PS – Fosfatidilserina (do inglês, *phosphatidilserine*)

RNA – Ácido Ribonucléico

rpm – Rotações por Minuto

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute medium* – Meio de cultura

S – Fase de Síntese

Sub-G1 – Sub Gap 1

TNF – Fator de necrose tumoral (do inglês, *tumor necrosis factor*)

Z-VAD-FMK - benziloxycarbonil-Val-Ala-Asp (oMe) fluorometilquetona.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 CÂNCER.....	18
1.2 DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS ANTITUMORAIS.....	22
1.2.1 Alvos Terapêuticos E Vias De Morte Celular.....	24
1.2.2 Apoptose.....	25
1.2.3 Autofagia	29
1.3 NITROCOMPOSTOS E HIDRAZONAS COMO “HITS” ÚTEIS NA DESCOBERTA DE NOVOS ANTITUMORAIS.....	30
1.3.1 Nitrocompostos.....	30
1.3.2 Hidrazonas.....	32
2 JUSTIFICATIVA	35
3 OBJETIVOS	36
3.1 Geral	36
3.2 Específicos.....	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 MATERIAIS.....	37
4.1.1 Substâncias sintéticas.....	37
4.1.2 Linhagens celulares.....	37
4.1.3 Células de Sangue Periférico Humano.....	38
4.2 MÉTODOS.....	38
4.2.1 Ensaio de clonogenicidade em células MCF-7 e HCT-116 tratadas com EBAC e E6.....	38

4.2.2 Determinação da concentração inibitória de 50% do crescimento celular em linhagem HCT-116 e MCF-7 cultivadas em soft-ágar, um modelo de cultura 3D <i>in vitro</i>	39
4.2.3 Avaliação da atividade citotóxica em células mononucleares do sangue periférico humano tratadas com EBAC e E6.....	40
4.2.4 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de resazurina.....	41
4.2.5 Análise de alterações morfológicas em células HL60 tratadas com EBAC e E6 por meio de microscopia de contraste de fase.....	42
4.2.6 Avaliação da liberação da enzima lactato desidrogenase em células HL60 tratadas com EBAC e E6.....	42
4.2.7 Avaliação do efeito de EBAC e E6 no ciclo celular e no conteúdo de DNA fragmentado em células HL60 por citometria de fluxo.....	43
4.2.8 Perfil da fragmentação nuclear através de eletroforese em gel de agarose em células HL60 após tratamento com EBAC e E6.....	44
4.2.9 Análise de alterações nucleares por microscopia de fluorescência após marcação com Hoechst 33342 em células HL60 tratadas com EBAC e E6.....	44
4.2.10 Avaliação da exposição de fosfatidilserina por Anexina-V e marcação de DNA com iodeto de propídeo por citometria de fluxo em células HL60 tratadas com EBAC e E6.....	45
4.2.11 Bloqueio da ativação de caspases por Z-VAD-FMK em células HL60.....	45
4.2.12 Detecção de caspase -3 ativa por citometria de fluxo em células HL60 após tratamento com EBAC e E6.....	46
4.2.13 Detecção de caspases-8 e -9 ativa por leitura espectrofotométrica em células HL60 após tratamento com EBAC e E6.....	47
4.2.14 Determinação de variações no potencial de membrana mitocondrial em células HL60 após tratamento com EBAC e E6.....	47

4.2.15 Detecção da produção de espécies reativas de oxigênio em células HL60 tratadas com EBAC e E6.....	48
4.2.16 Avaliação da indução de autofagia em células HL60 tratadas com EBAC.....	48
4.2.17 Bloqueio de autofagia em células HL60 por Bafilomicina A1.....	49
4.2.18 Delineamento experimental e análise estatística.....	49
5 RESULTADOS.....	50
5.1 Avaliação do efeito de EBAC e E6 no ensaio de clonogenicidade em monocamada e em modelo de cultura 3D (Soft-Ágar) em células MCF-7 e HCT-116.....	50
5.2 Avaliações da atividade citotóxica e seletividade em células mononucleares do sangue periférico humano.....	52
5.3 Alterações morfológicas em células HL60 provocadas após tratamento com EBAC e E6.....	53
5.4 Avaliação da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) após tratamento com EBAC e E6 em células HL60.....	57
5.5 Análise do ciclo celular e determinação do conteúdo subdiploide de DNA após tratamento com EBAC e E6 em células HL60.....	59
5.6 Eletroforese e marcação com Hoechst 33342 do DNA celular de células HL60 após tratamento com EBAC e E6.....	62
5.7 Avaliação da exposição de fosfatidilserina e marcação de DNA com iodeto de propídeo em células HL60 por citometria de fluxo.....	65
5.8 Avaliação da associação da ativação de caspases na fragmentação de DNA induzida pelo tratamento com EBAC e E6 em células HL60.....	68
5.9 Avaliação da ativação de caspase-3 em células HL60 induzida pela substância EBAC e E6.....	69

5.10 Avaliação da ativação das caspases -8 e -9 em células HL60 após tratamento com EBAC e E6.....	70
5.11 Alterações no potencial de membrana mitocondrial após tratamento com EBAC em células HL60.....	71
5.12 Avaliação da geração de espécies reativas de oxigênio após tratamento com EBAC e E6 em células HL60.....	72
5.13 Avaliação da indução de autofagia por EBAC em células HL60.....	74
5.14 Avaliação da utilização do bloqueador de autofagia Bafilomicina A1 na progressão do ciclo celular após tratamento por EBAC em células HL60.....	76
5.15 Resumo esquemático dos resultados obtidos em células HL60 após tratamento com EBAC e E6.....	77
6 DISCUSSÃO.....	78
7 CONCLUSÃO.....	90
8 PERSPECTIVAS.....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

Câncer é o termo utilizado para se referir às neoplasias que são caracterizadas por uma proliferação desordenada e com capacidade de invadir outros tecidos e órgãos (ALMEIDA et al., 2005). Câncer é o nome genérico dado a um conjunto de mais de 100 doenças que são correspondentes aos diversos tipos celulares do nosso organismo e são nomeadas de acordo com o órgão atingido ou tecido onde se inicia a lesão. As principais categorias de câncer são carcinoma (derivados de mucosas e células epiteliais), sarcoma (tecido conjuntivo, ósseo, muscular ou cartilaginoso), linfoma (sistema linfático) e leucemia (tecido sanguíneo) (“INCA - Instituto Nacional de Câncer, 2016”).

A carcinogênese, ou seja, a formação do câncer é um processo multifatorial e é marcada por alterações no DNA as quais geram uma transformação progressiva de células saudáveis em células malignas ou cancerígenas (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Essas alterações genéticas ocorrem com ativação de proto-oncogenes (genes que estão inativos nas células normais) ou inibição de genes supressores de tumores, o que resulta em proliferação celular descontrolada. As células malignas ao se multiplicarem ilimitadamente perdem sua funcionalidade e acabam formando um conjunto de estruturas celulares irregulares que recebe o nome de tumor. O crescimento do tumor evolui até o aparecimento das manifestações clínicas (ALMEIDA et al., 2005).

Tumores podem ser classificados como benignos ou malignos, sendo que somente os malignos são designados como câncer. Tumores benignos são caracterizados por taxa de proliferação lenta, alto grau de diferenciação e apresentarem delimitação. Dependendo da localização, esses tumores podem ser retirados por cirurgia e apresentam um melhor prognóstico. Os tumores malignos ou câncer, ao contrário dos benignos, têm baixa diferenciação e sofrem um processo de

vascularização, chamado angiogênese, que promove rápido crescimento. Cânceres também perdem fatores de adesão e desenvolvem fatores de migração, adquirindo assim capacidade de invadir outros tecidos e formar novos tumores, fenômeno denominado como metástase (ALMEIDA et al., 2005). As metástases tornam o tratamento mais difícil e as recidivas mais freqüentes. Portanto, os marcadores clássicos do câncer (em inglês, *hallmarks*) são a auto-suficiência em relação aos sinais de crescimento, evasão à morte celular programada (apoptose), potencial ilimitado de replicação, angiogênese, a invasão tecidual e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Os fatores de risco relacionados ao aparecimento de câncer podem ter causas internas ou externas. As causas externas são fatores ambientais, tais como substâncias químicas, irradiação, vírus e fatores comportamentais. De todos os casos de câncer, entre 80% e 90% estão associados a fatores ambientais. Cerca de 1/3 de todas as mortes por cânceres são decorrentes do estilo de vida, tais como obesidade, baixa ingestão de frutas e verduras, sedentarismo, uso de tabaco e álcool (“WHO | 2016”, 2016).

As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente predeterminadas e estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas. Apesar de o fator genético exercer um importante papel na oncogênese, são raros os casos de câncer que se devem exclusivamente a fatores hereditários, familiares e étnicos. Todavia, alguns tipos de câncer como, por exemplo, os cânceres de mama, estômago e intestino parecem ter um forte componente familiar. Existem ainda alguns fatores genéticos que tornam determinadas pessoas mais susceptíveis à ação dos agentes cancerígenos ambientais e isso parece explicar por que algumas delas desenvolvem câncer e outras não, quando expostas a um mesmo carcinógeno (ABC do Câncer, 2011).

A leucemia é um tipo de câncer do sistema sanguíneo que geralmente acomete os glóbulos brancos (leucócitos). Os principais sintomas da leucemia decorrem da acumulação de células jovens anormais na medula óssea (SALEH et al., 2015). Existem quatro tipos principais de leucemia leucocitária e sua classificação considera a rapidez de sua evolução e o tipo de leucócito afetado. Elas

são divididas em crônicas com desenvolvimento mais lento e em aguda com rápido agravamento da doença. Também se podem classificar as leucemias pelo tipo celular que é acometido as que afetam os linfócitos são chamadas de linfóide, linfocítica ou linfoblástica. A leucemia que afeta os mielócitos são chamadas mieloide ou mieloblástica. (“INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2016”).

Câncer é uma das maiores causas de mortes no mundo e de grande impacto em saúde pública em especial nos países desenvolvidos, onde é esperado que o impacto dessa doença na população corresponda a mais de 80% dos 20 milhões de novos casos estimados para 2025 (“INCA - Instituto Nacional de Câncer, 2016”). Baseado nas estimativas do GLOBOCAN, realizado pelo *International Agency for Research on Cancer* (IARC), houve no ano de 2012 cerca de 14,1 milhões de novos casos e 8,2 milhões de morte no mundo. Os tipos de câncer mais incidentes no mundo foram pulmão (1,8 milhão), mama (1,7 milhão), intestino (1,4 milhão) e próstata (1,1 milhão), sendo que os mais comuns entre as causas de morte foram: câncer de pulmão, fígado e estômago (FERLAY et al., 2015).

De acordo com as informações de mortalidade do Ministério da Saúde do Brasil as neoplasias ou tumores representam a segunda causa de óbito na população, o que representa mais de 14,6% do total de mortes ocorridas no país (ABC do câncer, 2011). A estimativa para o Brasil, biênio 2016-2017, aponta a ocorrência de cerca de 600 mil novos casos de câncer. Os tipos mais incidentes são (à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma) próstata (28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%) e cavidade oral (5,2%) nos homens. Nas mulheres, os cânceres de mama (28,1%), intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%) estarão entre os principais. (INCA, 2016). Em relação às leucemias, estimam-se 5.540 casos novos de leucemia em homens e 4.530 em mulheres no Brasil no ano de 2016. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,63 casos novos a cada 100 mil homens e 4,38 para cada 100 mil mulheres (“INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2016”).

Para o Brasil, no ano de 2016, estimam-se 5.540 casos novos de leucemia em homens e 4.530 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado

de 5,63 casos novos a cada 100 mil homens e 4,38 para cada 100 mil mulheres (“INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2016”).

Atualmente, o tratamento do câncer pode ser feito por meio de diferentes abordagens, dependendo do tipo e do estágio de desenvolvimento do tumor. Os tratamentos mais realizados são a remoção cirúrgica dos tumores (no caso de tumores sólidos), radioterapia e quimioterapia, que podem ser realizados de forma isolada ou combinados. Além desses existem ainda outros tipos de tratamento que incluem a terapia-alvo, hormonioterapia, imunoterapia, entre outros. Além disso, em alguns tipos de câncer, como as leucemias, podem ser tratadas por transplante de medula óssea (PCDT oncologia, 2016). A escolha da abordagem terapêutica depende da meta do tratamento, podendo ser a cura, prolongamento da vida e/ou melhoria na qualidade de vida.

Em tumores sólidos localizados, geralmente, a remoção cirúrgica e posteriormente a radioterapia têm apresentado grande eficácia (ALMEIDA et al., 2005). A radioterapia se baseia em um feixe ondas eletromagnéticas que incide sobre a área do tumor e promove ionização de moléculas, como água e as cadeias de DNA. Os danos sofridos pelo DNA promovem uma incapacidade de divisão celular e provocam a ativação de apoptose das células tumorais (LOWE; LIN, 2000). Dependendo do tipo de tumor e do risco de recidiva, o tratamento poderá ser complementado, por quimioterapia, hormonioterapia, imunoterapia e/ou terapias-alvo (PCDT oncologia, 2016).

Os atuais tratamentos de radio- e quimioterapia geralmente atuam no ciclo celular, uma vez que células tumorais se proliferam mais rápido que células normais, e têm por objetivo induzir a morte das células cancerígenas por apoptose (ALMEIDA et al., 2005). A quimioterapia é a utilização de fármacos com atividade antitumoral administrados via endovenosa ou via oral. O objetivo é destruir completamente as células tumorais, que apresentam alta taxa de proliferação. Entretanto, alguns tecidos humanos normais, como mucosas e epiderme, também apresentam rápido crescimento e ficam suscetíveis à ação dos quimioterápicos (“Types of Cancer Treatment: Chemotherapy - National Cancer Institute”, 2015). A maioria das drogas utilizadas na quimioterapia antineoplásica age diretamente no DNA celular, sendo

que a maioria atua nas etapas da divisão celular. Os agentes antineoplásicos que exercem sua ação sobre as células que se encontram no ciclo celular são denominados fármacos ciclo-celular específicos, dentre os quais se encontram, por exemplo, agentes antimetabólitos, alcalóides e hormônios. Já os agentes que apresentam a capacidade de exterminar as células tumorais que não estão se dividindo são denominados ciclo-celular não específicos, como é o caso dos antibióticos, complexos de platina e agentes alquilantes (ALMEIDA et al., 2005).

A quimioterapia pode ser usada exclusivamente em alguns tumores, como certos tipos de leucemias e linfoma, com finalidade curativa. Em outros tipos de tumores, principalmente os sólidos, a quimioterapia pode ser usada no momento pré-cirurgia, sendo denominada neo-adjuvante e que tem como objetivo diminuir o tamanho do tumor ou no momento pós-cirurgia (adjuvante) a fim de destruir células tumorais que ainda permaneceram no local, bem como as metastáticas (PCDT oncologia, 2016). Além disso, a quimioterapia pode ser usada em combinação com outras estratégias e frequentemente é usada para tratar as metástases (“Types of Cancer Treatment: Chemotherapy - National Cancer Institute”, 2015)

Por conta dos amplos impactos gerado pela doença, sendo tanto sociais quanto econômicos (JEMAL et al., 2011) e à alta toxicidade e efeitos adversos causados pelos atuais tratamentos, se faz necessária a busca por novos fármacos antitumorais que apresentem duas características principais – eficácia e seletividade (MCKIM, 2010).

1.2 DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS ANTITUMORAIS

A pesquisa e o desenvolvimento de novos compostos, candidatos a novos fármacos, é um processo complexo, duradouro e dispendioso. Estima-se que todo este processo demanda cerca de 10 anos e seja necessário um bilhão de dólares e ainda assim somente um dentre dez mil compostos testados consegue chegar ao mercado (MCKIM, 2010). Este processo abrange diversas etapas, desde a identificação do alvo até a sua aplicação terapêutica e pode ser dividida

funcionalmente em duas estratégias: descoberta e desenvolvimento. Sendo que a fase da descoberta pode ser dividida em inicial e tardia e a fase do desenvolvimento é marcada pelos ensaios pré-clínicos e clínicos.

Historicamente, a descoberta de uma ampla gama de novos fármacos tem sido relacionada ao uso de produtos de origem vegetal de forma empírica e mais recentemente, de forma planejada. Como consequência do processo de pesquisa e da busca por produtos mais eficazes, a síntese orgânica tem contribuído significativamente com os avanços da indústria farmacêutica (HOELDER; CLARKE; WORKMAN, 2012).

A descoberta de novas drogas nos últimos anos também tem sido possível graças à introdução de modelos de “*screening*” ou triagem de compostos de origem sintética ou natural através do método de “*high-Throughput Screening* (HTS)”. HTS é um processo de alto desempenho baseado em ensaios bioquímicos que permite testar milhares de compostos em um curto período de tempo principalmente em culturas celulares (HOELDER; CLARKE; WORKMAN, 2012). Estes ensaios podem utilizar um alvo único bem definido, como enzimas ou receptores, ou múltiplos alvos como organismos íntegros (parasitas, bactérias, fungos, etc) e cultura de células. Durante esses ensaios são identificadas substâncias ativas que são conhecidas como “*hits*” e podem ser usadas como modelo para síntese de análogos que são identificados como “*lead compounds*”. Esses compostos líderes podem ser otimizados de maneira a aumentar seletividade, potência e outras características para serem então encaminhados para fases pré-clínica e clínica (MCKIM, 2010).

Durante a última década, muita ênfase foi dada à avaliação de métodos *in vitro* para redução da toxicidade sistêmica *in vivo*. O uso de ensaios *in vitro*, que mimetizam especificamente o ambiente *in vivo*, como o ensaio de formação de colônias em soft-ágar, pode levar a uma predição de maior acurácia no processo de descoberta de drogas (ZIPS; THAMES; BAUMANN, 2005). Testes em animais são indispensáveis, entretanto devido à impossibilidade de se testar uma grande quantidade de agentes *in vivo*, é necessário que sejam feitos experimentos *in vitro* com o objetivo de selecionar candidatos promissores e obter dados do mecanismo de ação intracelular.

1.2.1 ALVOS TERAPÊUTICOS E VIAS DE MORTE CELULAR

Os agentes antineoplásicos atualmente utilizados afetam, em sua maioria, o processo de divisão celular. Esses agentes não exercem nenhum efeito inibitório específico sobre o poder invasivo, a perda da diferenciação ou o poder metastático. Além disso, como seu efeito principal é exercido sobre a divisão celular, eles afetam tecidos normais que se dividem rapidamente, produzindo então, em maior ou menor grau, os conhecidos efeitos adversos de uma quimioterapia. Após os avanços da biologia molecular e celular foram conhecidos diversos fenômenos envolvidos no processo de formação do tumor se tornaram alvos potenciais para terapia antitumoral. Dentre os principais alvos estão os inibidores de angiogênese, das metaloproteinases, de fatores de crescimento, agentes diferenciadores, inibidores imunogênicos e indutores de apoptose (BERNARDI; CAROLINE JACQUES-SILVA; LENZ, 2003).

Fármacos indutores de apoptose apresentam um interessante potencial de tratar eficazmente alguns tipos de cânceres (FESIK, 2005). É sabido que em vários tipos de tumor o processo normal de resposta à indução de morte por apoptose está desregulado, o que leva ao crescimento do tumor e desenvolvimento de resistência. A avaliação de novas substâncias com atividade pró-apoptótica e um menor potencial de toxicidade para células normais têm sido o principal foco das pesquisas e tem aberto perspectivas para a identificação e desenvolvimento de novos agentes farmacológicos na terapia do câncer. A maioria das substâncias quimioterápicas em uso clínico induz a apoptose das células malignas, tais como inibidores de topoisomerasas, antimetabólitos, glicocorticóides e agentes alquilantes (HICKMAN, 1992).

Além da indução de apoptose, outro mecanismo de morte que vem sendo estudado é a ativação de autofagia. Autofagia é um processo de degradação lisossomal e sob condições normais é essencial para a homeostase celular. Entretanto, sua desregulação está sendo implicada em diversos processos patológicos, tais como doenças metabólicas, neurodegenerativas, infecciosas, inflamatórias e no câncer (LIU et al., 2013a). Por isso, moduladores de autofagia têm

recebido muita atenção e podem ser uma oportunidade para descoberta e desenvolvimento de novos fármacos antitumorais.

Autofagia atua de forma dual e complexa na regulação de genes supressores de tumor e nos oncogenes, atuando ambigualmente como pró-sobrevivência e pró-morte do tumor. Além disso, há uma complexa relação entre apoptose e autofagia (WANG et al., 2012). Proteínas da família BCL-2 podem interagir com proteínas envolvidas no processo de autofagia como ATG ou BECLIN-1 e ativar ou desativar autofagia (BANJERDPONGCHAI; KHAW-ON, 2013). Outro fator importante a se considerar é a inativação de apoptose frequentemente encontrada em células tumorais, portanto, a ativação de autofagia poderia funcionar como uma forma primária de morte celular nessas células.

Por conta do seu papel ambíguo, é necessário que se defina o papel específico da autofagia em cada contexto para que se possa ponderar a intervenção terapêutica adequada (YOKOYAMA et al., 2008; LEE et al., 2014; WANG et al., 2012). Nos casos em que a autofagia atua na promoção da sobrevivência, inibidores de autofagia podem ser úteis. Entretanto se a autofagia age provocando a eliminação das células tumorais, indutores como rapamicina e cloroquina, pode ser vantajosa terapeuticamente (LI et al., 2013).

Apoptose e autofagia são mecanismos de morte celular programada que compreendem processos altamente regulados e envolvem diversas alterações morfológicas e bioquímicas descritas a seguir.

1.2.2 APOPTOSE

O termo apoptose foi definido por KERR; WYLLIE e CURRIE(1972)para representar um tipo de morte celular específico, que é marcado por características morfológicas e bioquímicas e pode ser comparada metaforicamente a um "suicídio celular". Neste processo de morte ocorre ativação de proteases endógenas (caspases), as quais comprometem a integridade do citoesqueleto, levando à contração do volume citoplasmático e inversão do posicionamento dos lipídios da

membrana plasmática, como é o caso da fosfatidilserina, que se encontra na face intracelular das células normais, mas em células apoptóticas se encontra na camada externa. Durante a apoptose ocorrem também alterações características no núcleo como condensação da cromatina e ativação de endonucleases que degradam o DNA, resultando fragmentação do núcleo. Simultaneamente, as bolhas que se formam no citoplasma separam a célula em fragmentos circundados por membrana, contendo partes do núcleo e organelas intactas formando os corpos apoptóticos, que serão fagocitados pelos macrófagos teciduais ou células adjacentes *in vivo* (ELMORE, 2007).

Mesmo que morfologicamente similares, a apoptose pode ser ativada por duas vias bioquímicas diferentes: via extrínseca (via dos receptores de morte ou via caspase -8) e intrínseca (via mitocondrial ou via caspase -9) (**Figura 1**). Estas vias podem ocorrer de maneira independente ou correlacionada culminando na ativação de caspases, principalmente -3, que possuem um papel fundamental neste tipo de morte celular (KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007).

Na via extrínseca, a sequência de eventos começa quando sinais de morte ligam-se aos receptores presentes na membrana da célula conhecidos como TNF tipo 1 e os receptores Fas. O complexo formado pelo ligante/receptor de morte leva à ativação das caspases iniciadoras-8 e -10 que ativam a caspase -3 (TAYLOR; CULLEN; MARTIN, 2008).

A via intrínseca ou via mitocondrial (**Figura 1**) é iniciada por meio de estímulos internos, como danos ao DNA, estresse oxidativo, predominância de estímulos pró-apoptóticos (KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007). Esses estímulos internos podem induzir perda do potencial de membrana mitocondrial (PMM) tornando a membrana mitocondrial mais permeável e liberação para o citoplasma de moléculas pró-apoptóticas, como o citocromo C. A liberação desses fatores pró-apoptóticos leva a célula à apoptose independentemente da ativação das caspases (apoptose não clássica) ou através da ativação de caspase -3 e -9 (ELMORE, 2007). Este processo é bastante complexo e outros mecanismos também estão envolvidos como, por exemplo, a família de proteínas BCL-2, que se dividem em: pró-apoptóticas (Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim e Hrk) e anti-apoptóticas

(Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 e Mcl-1) (BORUTAITE, 2010). O balanço entre as proteínas pró- e anti-apoptóticas determinam o início da apoptose (ELMORE, 2007).

O citocromo C ao ser liberado da membrana interna para o citoplasma se liga ao Apaf-1 (*apoptosis protease-activating factor1*) e essa ligação, na presença do ATP, forma o apoptossomo juntamente com a caspase -9. Este apoptossomo é o responsável pela ativação da caspase efetora caspase-3 (KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007). É importante ressaltar que citocromo C pode ser liberado também após ativação da via extrínseca, via Bid, levando posteriormente à ativação de caspase -9. As caspases também podem ser ativadas pelas Smac/DIABLO ou Omi/HtrA2, que se ligam às proteínas inibidoras da apoptose (IAPs) fazendo com que essas rompam a interação com as caspases -3 e -9 (BORUTAITE, 2010).

A caspase -3 induz a clivagem de proteínas do citoesqueleto e proteínas de reparo do DNA. Como consequência, a morfologia da célula e o ciclo celular são alterados e são formados os corpos apoptóticos, que são rapidamente englobados pelos fagócitos que reconhecem a fosfatidilserina exposta (WONG, 2011).

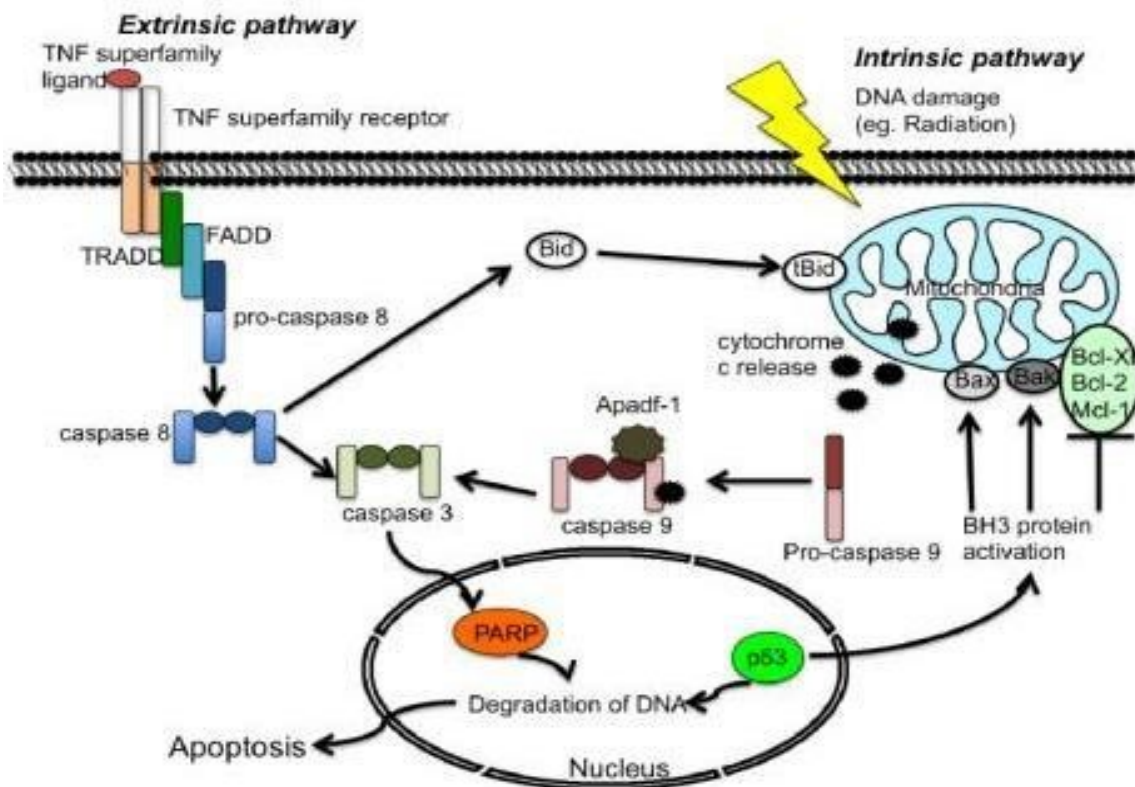


Figura 1: Esquema representativo das vias intrínseca e extrínseca da apoptose. Apoptose é um tipo de morte celular programada que pode ser ativada com ativação de caspases pela via intrínseca e extrínseca. Na via intrínseca há liberação pela mitocôndria de moléculas pró-apoptóticas, como o citocromo C, que resulta na formação do apoptossomo e ativação de caspase -9. A via extrínseca é ativada por ligação em receptores específicos localizados na membrana plasmática e ocorre com ativação de caspase -8. Caspase -9 e -8 provocam a ativação de caspases, como a -3, resultando em morte celular

Fonte: YUAN; FILIPPOVA; DUERKSEN-HUGHES, (2012)

Células tumorais podem adquirir resistência a apoptose por meio do desequilíbrio do balanço das proteínas pró- e anti-apoptóticas, redução da função das caspases, prejuízo na sinalização dos receptores de morte, aumento a expressão de IAPs ou por mutação do p53 (HUANG; OLIFF, 2001). Desta maneira, e tendo em vista que a evasão à morte celular é uma das características clássicas do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011), a compreensão de outros tipos de morte celular se faz necessária na busca por novas abordagens que superem, principalmente, a resistência à apoptose induzida por determinados quimioterápicos.

1.2.3 AUTOFAGIA

O termo autofagia é derivado do grego "Auto" (auto) e "fagia" (comer) e refere-se à um processo evolutivamente conservado e dinamicamente catabólico que é essencial para a sobrevivência, desenvolvimento, diferenciação e homeostase celular. O papel principal da autofagia é na degradação e reciclagem de componentes e organelas celulares danificadas, porém este processo pode levar à morte autofágica ou morte celular programada tipo II. Este tipo de morte é morfológicamente definido quando há ausência de condensação da cromatina e é marcada por grande vacuolização autofágica no citoplasma (KROEMER; LEVINE, 2008). Existem três vias principais de degradação, as quais diferem essencialmente nos meios de entrega dos constituintes células para o lisossomo. São eles: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas (TSUJIMOTO; SHIMIZU, 2005).

A indução de macroautofagia (vulgarmente conhecida por autofagia) ocorre com eventos celulares ordenados e é iniciada pela formação de uma membrana em torno de proteínas e organelas, designada de fagóforo, que pode ser uma extensão da membrana citoplasmática, do retículo endoplasmático ou da membrana mitocondrial externa e proteínas de cadeia leve associadas ao microtúbulo (LC3) são também recrutadas nesta etapa. A fusão das extremidades do fagóforo origina a formação de uma estrutura fechada com dupla membrana, o autofagossomo. Os autofagossomos, onde estão englobados diversos constituintes celulares, fundem-se aos lisossomos para juntos formarem os autolisossomos, onde ocorre a digestão dos componentes celulares sequestrados (TSUJIMOTO; SHIMIZU, 2005). Na microautofagia, os componentes citosólicos são incorporados através de invaginações da membrana lisossomal diretamente para o interior do lisossomo e a autofagia mediada por chaperonas é mediada por chaperonas específicas, que permitem a translocação de determinadas proteínas para o interior do lisossomo, resultando no desenrolamento das proteínas e sua degradação.

Autofagia é regulada família Atg (*autophagy genes*), que são genes conservados e indispensáveis pela indução de autofagia. As proteínas Atg5,

Atg6/Beclin, Atg8/LC3, Atg10 e Atg12 são as primeiras a serem recrutadas e atuam no processo de formação do autofagossomo (GONZÁLEZ-POLO et al., 2005). Atg6/Beclin tem um papel central regulador da autofagia e na oposição ao processo de morte por apoptose (CAO; KLIONSKY, 2007). Essa proteína interage com vários co-fatores e a sua clivagem pelas caspases promove um *crosstalk* entre autofagia e apoptose. Além disso, atua também como supressor tumoral e sua deleção é encontrada em diversos tipos de tumores (KANG et al., 2011). Outra proteína importante, principalmente na investigação de autofagia, é a Atg8/LC3, que existe em duas formas: LC3-I, localizada no citoplasma e LC3-II, localizada na membrana do autofagossomo. A LC3-II é usada como um marcador específico nas avaliações de ativação de autofagia (KLIONSKY et al., 2008).

Definição de morte celular por autofagia atualmente é um desafio, pois existem poucos recursos experimentais de investigação dos mecanismos ativados através da autofagia (TSUJIMOTO; SHIMIZU, 2005). Além da marcação das proteínas da família Atg, uma outra alternativa é a supressão da autofagia, através da utilização de inibidores farmacológicos ou abordagens genéticas. A supressão da autofagia pode ser útil para avaliar, se houve resgate ou prevenir a morte celular (WILSON et al., 2011). Dentre os inibidores específicos da autofagia, a Bafilomicina A1 atua na fase mais tardia ao impedir a acidificação dos lisossomos ao inibir ATPase do tipo vacuolar e, conseqüentemente, a fusão dos mesmos aos autofagossomos (KANEMATSU et al., 2010).

1.3 NITROCOMPOSTOS E HIDRAZONAS COMO “HITS” ÚTEIS NA DESCOBERTA DE NOVOS ANTITUMORAIS.

1.3.1 NITROCOMPOSTOS

Haletos de nitrobenzila constituem uma importante classe de compostos com potencial atividade antitumoral e o seu mecanismo de ação está relacionado à

bio-redução do grupo nitro com consequente formação de espécies altamente eletrofílicas capazes de alquilar o DNA, atuando, portanto como agentes alquilantes.

Os agentes alquilantes são os agentes antineoplásicos mais antigos e mais usados na quimioterapia. São compostos capazes de ligar covalentemente um radical alquil a uma biomolécula, como o DNA, em condições fisiológicas (solução aquosa, 37 °C, pH 7,4). Ao se ligarem ao DNA impedem a separação dos dois filamentos da dupla fita espiralar, fenômeno este indispensável para a replicação. A alquilação além de impedir a replicação provoca a fragmentação do DNA por reações hidrolíticas. Os agentes alquilantes afetam as células em todas as fases do ciclo celular de modo inespecífico (KOSTOVA, 2006). Os principais fármacos utilizados como agentes alquilantes incluem as mostardas nitrogenadas, ciclofosfamida e ifosfamida, o bussulfam, as nitrosuréias, a cisplatina e seu análogo carboplatina (BRUCE; LIN, 1969).

APICELA SOARES e colaboradores (2010) estudaram diversas substâncias sintéticas, sendo uma delas o ácido 4-bromometil-3-nitrobenzóico (ANB). O ANB demonstrou atividade contra linhagens tumorais UACC e Jurkat. Além disso, esse nitrocomposto induziu fragmentação de DNA e ativação de caspase -3 em células Jurkat (concentração a 100 µM) após 18 horas de tratamento.

Com base nos efeitos pró-apoptóticos e da atividade citotóxica apresentada pelo ANB, planejou-se a síntese de novos análogos do ANB, variando-se os substituintes no anel aromático de forma a melhorar as características físico-químicas e otimizar a interação com o DNA. A molécula EBAC (**Figura 2**) foi sintetizada a partir do ANB e foi planejada com o intuito de otimizar a atividade anti-proliferativa dos análogos obtidos, devido à sua associação com uma molécula de ácido butírico via a formação de um grupo éster (LOPES et al., 2015).

O ácido butírico é um ácido graxo de cadeia curta, sendo um produto natural encontrado em alguns alimentos, que induz apoptose e diferenciação celular de várias linhagens tumorais *in vitro* (AVIRAM et al., 1994). O ácido butírico foi testado na clínica e não foram verificados efeitos tóxicos, entretanto também apresentou baixa potência devido ao seu rápido metabolismo e excreção (ZIMRA et al., 1997).

Testes clínicos demonstraram remissão parcial e temporária da doença em crianças com leucemia mielóide aguda, mas não foram observados efeitos em adultos (REPHAELI et al., 1991). O mecanismo de ação do ácido butírico não foi completamente compreendido, embora se saiba que promove uma hiperacetilação de histonas, o que pode acarretar em mudanças na atividade transcricional e levando à inibição da proliferação por facilitar quebra do DNA (AVIRAM et al., 1994). Devido aos baixos efeitos em testes *in vivo*, uma das estratégias adotadas é o planejamento de um pró-fármaco que seja capaz de contornar as limitações do sistema *in vivo* e produzir efeitos citotóxicos nas células tumorais (NUDELMAN et al., 1992 e REPHAELI et al., 1991). EBAC é um composto nitroaromático conjugado ao ácido butírico e pode ser considerado também um pró-fármaco e foi testado *in vivo* com o objetivo de se avaliar se o efeito antitumoral seria potencializado após a liberação do butirato (LOPES et al., 2015).

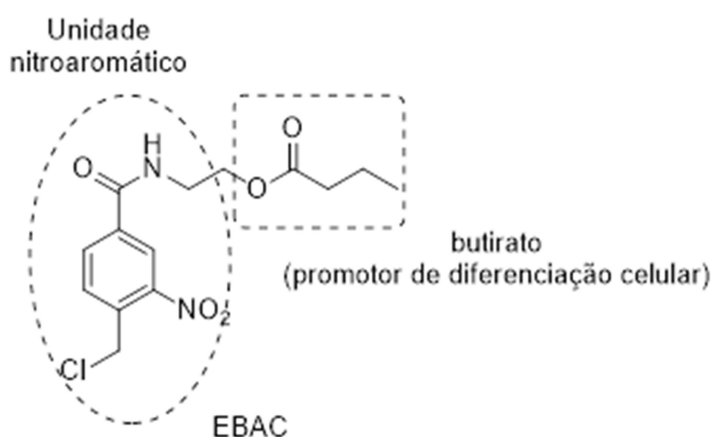


Figura 2 – Representação da fórmula estrutural EBAC. O nitrocomposto EBAC sintetizado a partir do ácido 4-bromometil-3-nitrobenzóico (ANB) com adição de um grupo butirato à unidade nitroaromática.

Fonte: LOPES et al. (2015)

1.3.2 HIDRAZONAS

As hidrazonas são uma importante classe de compostos para desenvolvimento de novas drogas (ROLLAS; KÜÇÜKGÜZEL, 2007). Elas pertencem à classe das azometinas e são sintetizadas por uma reação, em meio ácido, entre

um aldeído/cetona e uma hidrazina e também apresentam um significativo papel como agente antitumoral (NASR; BONDOCK; YOUNS, 2014).

Esta classe é muito estudada devido as suas propriedades químicas e biológicas (PILÓ *et al*, 2015). Muitos estudos demonstram que suas propriedades quimioterapêuticas incluem atividade anticonvulsivante, antidepressiva, analgésica e antiinflamatória, antimicrobiana, antiviral, vasodilatadora e antitumoral (ROLLAS; KÜÇÜKGÜZEL, 2007).

Um fármaco já bastante utilizado na clínica pertencente a essa classe é a isoniazida, que é usado como tuberculostático. As hidrazonas podem formar ligação coordenada com metais por meio do átomo de nitrogênio da azometina. Essa capacidade é aumentada se houver grupos doadores de elétrons ligados ao carbono da função azometina. Essa característica estrutural das hidrazonas faz com que elas se comportem como agentes quelantes. Alguns análogos de hidrazonas também têm sido investigados pelo seu poder quelante para tratamento de doenças genéticas tal como a talassemia (DESPAIGNE *et al.*, 2009).

Diversos estudos têm mostrado que a presença do metal aumenta a atividade desses compostos (ROLLAS; KÜÇÜKGÜZEL, 2007). Alguns complexos com metais e gálio tem alto efeito citotóxico em linhagens de cânceres humanas e atividade antimicrobiana, outros estudos mostram que complexos com antimônio aumentam a atividade antifúngica de hidrazonas (FERREIRA *et al.*, 2016)

A substância E6 (**Figura 3**) pertence à classe das hidrazonas e sua estrutura molecular e síntese já são conhecidas (DESPAIGNE *et al.*, 2009). E6 demonstrou ter atividade antifúngica bem como seu complexo antimônio (PILÓ *et al.*, 2015). Além disso, já foi testada sua atividade contra linhagens de cânceres cerebrais U87 e T98. E6 foi mais citotóxica em células U87 ($IC_{50} = 26,1 \pm 14,6$ nM) que em células T98 ($IC_{50} = 415 \pm 31$ nM) e não se mostrou citotóxica em linhagem de células normais (MRC5), com IC_{50} maior que 700 nM (DESPAIGNE *et al.*, 2012).

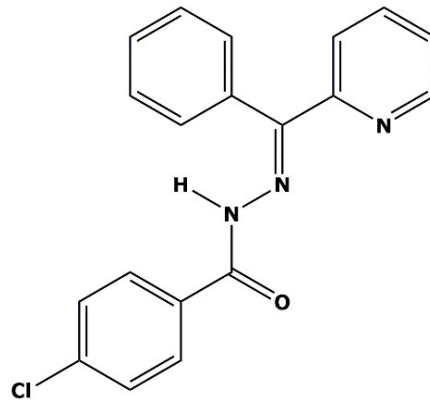


Figura 3 - Representação da fórmula estrutural da E6. A substância E6 pertence à classe das hidrazonas, que são substâncias sintetizadas por uma reação, em meio ácido, entre um aldeído/cetona e uma hidrazina.

Fonte: DESPAIGNE et al. (2009)

2. JUSTIFICATIVA

A descoberta de novos fármacos antitumorais é uma necessidade devido à baixa efetividade e seletividade dos tratamentos quimioterápicos atuais, visto as altas taxas de óbito em pacientes diagnosticados com câncer e o aparecimento de vários efeitos adversos, como imunossupressão, queda de cabelo e outros. Além disso, já é sabido que alguns tipos de câncer já têm demonstrado resistência e não respondem à quimioterapia utilizada na clínica. Dentro deste contexto, nosso grupo tem realizado a prospecção de substâncias sintéticas de várias classes, extratos naturais e peptídeos derivados de venenos com objetivo de identificar novos potenciais compostos bioativos para o tratamento do câncer. Como modelo preditivo são utilizadas seis linhagens de células tumorais e como modelo de células não tumorais, é utilizada uma linhagem de células de rim de macaco – Vero.

Desta prospecção algumas substâncias inéditas promissoras foram identificadas e selecionadas para caracterização de seu mecanismo de citotoxicidade. Duas destas incluem uma substância da classe das hidrazonas, denominada E6, que foi sintetizada pelo grupo da Prof^a. Dr^a Heloísa Beraldo (Departamento de Química da UFMG) (FERREIRA et al., 2016) e um nitrocomposto EBAC, sintetizada pelo grupo da Prof^a. Dra^a Renata Barbosa (Faculdade de Farmácia da UFMG) (LOPES et al., 2015).

Na presente dissertação, foi realizada a caracterização inicial de citotoxicidade dessas duas substâncias em linhagem de células tumorais leucêmicas por meio da avaliação dos mecanismos de morte celular por apoptose e autofagia. Esta investigação permitirá, portanto, a identificação de substâncias bioativas com potencial citotóxico que poderão ser utilizadas para a descoberta e desenvolvimento de agentes farmacológicos contra o câncer.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Caracterizar a atividade citotóxica, por avaliação do mecanismo de ação, de um nitrocomposto (EBAC) e hidrazona (E6) em células tumorais humanas com vistas à descoberta e desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento do câncer.

3.2 Específicos

1. Avaliar o efeito de EBAC e E6 na capacidade clonogênica de linhagens celulares de tumor sólido (MCF-7 e HCT-116) em modelos bidimensional (2D) e tridimensional (3D).
2. Avaliar a seletividade de EBAC e E6 por meio da determinação de sua concentração inibidora de 50% da viabilidade celular (IC_{50}) em células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC)
3. Investigar o tipo de morte celular desencadeada por EBAC e E6 em células HL60 por fotografias em microscopia de campo claro e da liberação de LDH.
4. Avaliar a ativação de apoptose em células HL60 tratadas com EBAC e E6 por meio da avaliação de fragmentação de DNA, exposição de fosfatidilserina e a ativação de caspase -3
5. Investigar a ativação da via clássica da apoptose através do efeito no ciclo celular das células HL60 após pré-tratamento com o inibidor geral de caspases Z-VAD-fmk.
6. Caracterizar a ativação da via intrínseca e/ou extrínseca por meio da ativação de caspase -8 e -9; perda de potencial de membrana mitocondrial e formação de espécies reativas de oxigênio.
7. Investigar o envolvimento de autofagia em células HL60 tratadas com EBAC através da detecção de compartimentos acídicos marcados com o corante alaranjado de acridina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Substâncias sintéticas

A substância EBAC foi sintetizada e fornecida pela Prof^a. Dr^a. Renata Barbosa. As amostras foram mantidas à temperatura de 2 a 8 °C e solubilizadas na concentração final de 20 mM em DMSO imediatamente antes dos experimentos. A síntese da EBAC e outros nitrocompostos análogos foi descrita por LOPES et. al. (2015).

A substância E6 foi sintetizada e fornecida pela Prof.^a Dr.^a Heloisa de Oliveira Beraldo. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente e preparadas a 20 mM em DMSO imediatamente antes dos experimentos. A síntese de diversas hidrazonas, incluindo E6, foi descrita por DESPAIGNE et al. (2009).

4.1.2 Linhagens celulares

As linhagens celulares HL60 (leucemia promielocítica humana) foram doadas pelo Dr. Gustavo Amarante-Mendes (Universidade de São Paulo). A linhagem MCF-7 (carcinoma de mama humano) foi gentilmente doada pelo Prof. Dr. Alfredo Goes (Departamento de Bioquímica - UFMG) e as células Vero (células de rim de macaco verde africano) foram doadas pela Prof.^a Dr.^a Erna Kroon (UFMG). Células HCT-116 (carcinoma coloretal humano) foram adquiridas do ATCC.

As células HL60 foram mantidas em meio RPMI (Sigma Aldrich, USA), enriquecido com 10% de soro fetal bovino (GIBCO BRL, Grand Island, NY) e 2mM de L-Glutamina (GIBCO UK, Grand Island, NY); contendo 1% de solução antibiótica (100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (GIBCO BRL, Grand Island, NY) e 60 µg/mL de gentamicina (Garamicina®, Schering-Plough). Células MCF-7, HCT-116 e VERO foram mantidas em meio DMEM (Sigma Aldrich, USA),

enriquecido com 5% de soro fetal bovino (GIBCO BRL, Grand Island, NY), contendo 1% de solução antibiótica (100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina - GIBCO BRL, Grand Island, NY) e 60 µg/mL de gentamicina (Garamicina®, Schering-Plough). Todas as linhagens foram mantidas em garrafas de cultivo em estufa a 37°C com atmosfera saturada de CO₂ a 5% (v/v).

As células HL60 é uma linhagem promielocítica de sangue periférico e foi selecionada a partir de leucócitos do sangue periférico obtidos de uma mulher caucasiana, de 36 anos, com leucemia mielóide aguda (GALLAGHER et al., 1979). Essa linhagem faz parte de um subtipo que corresponde a 10% de todos os casos de leucemias mielóides agudas (AML), sendo ideal para investigação de potenciais fármacos contra AML (SALEH et al., 2015).

4.1.3 Células de Sangue Periférico Humano

As células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) foram obtidas a partir de doadores saudáveis. Foi coletado em tubos heparinizados cerca de 30 mL de sangue de cada indivíduo. Este projeto foi aprovado pelo CEP, parecer número 666.658.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Ensaio de clonogenicidade em células MCF-7 e HCT-116 tratadas com EBAC e E6.

O ensaio clonogênico foi avaliado com modificações conforme descrito previamente por MORDANT et al. (2010). Células MCF-7 e HCT-116 foram plaqueadas na densidade de 400 células por poço em 2 mL de meio DMEM suplementado em placas de 6 poços. Após 6 horas de incubação em estufa contendo 5% de CO₂ à 37°C, as células foram tratadas com DMSO 0,5% V/V ou com as substâncias durante 24 horas. A substância EBAC foi testada nas concentrações correspondentes a IC50 e IC90 em células MCF-7. A substância E6

foi testada em células MCF-7 e HCT-116, nas respectivas IC50. Não foi realizada avaliação em concentração maior (IC90) devido à insolubilidade da substância. Depois de 24h, o meio foi substituído (a fim de parar o estímulo do tratamento) por 4 ml/poço de meio DMEM suplementado. A placa voltou a ser incubada em estufa contendo 5% de CO₂ à 37°C por 14 dias. Ao final desses dias, o meio de cultura foi cuidadosamente removido e os poços foram lavados com tampão salina fosfato (PBS). As colônias foram, então, fixadas adicionando a cada poço 2 mL de solução de álcool 70% (v/v) e posteriormente coradas com solução a 0,5% (p/v) de cristal violeta em água por 30 min. A solução de cristal violeta foi então removida e as placas foram lavadas cuidadosamente com água corrente e mantidas à temperatura ambiente até secagem completa. Neste ensaio, somente foram contadas as colônias com mais de 50 células após avaliação em microscópio de luz invertida.

O número de colônias formadas no poço controle foi usado para o cálculo de eficiência de plaqueamento (PE) de acordo com a equação abaixo:

$$PE = \frac{\text{número de colônias formadas} \times 100\%}{\text{número de células plaqueadas}}$$

O valor de PE e o número de colônias formadas nos poços tratados com as substâncias em teste foram usados para o cálculo da fração de sobrevivência (FS) de acordo com a equação abaixo. O valor de FS corresponde diretamente a quantidade de colônias contadas.

$$FS = \frac{\text{Número de colônias formadas após o tratamento}}{\text{Número de células plaqueadas} \times PE}$$

4.2.2 Determinação da concentração inibitória de 50% do crescimento celular em linhagem HCT-116 e MCF-7 cultivadas em soft-ágar, um modelo de cultura 3D *in vitro*.

O cultivo das células tumorais em um modelo tridimensional foi realizado de acordo com ANDERSON et al. (2007) com modificações. Foi realizado um

plaqueamento das células HCT-116 ou MCF-7 em duas camadas. A camada inferior foi preparada com 70 μ L de uma mistura de ágar a 0,6% em meio de cultura DMEM suplementado em cada poço com a finalidade de formar a camada base que irá impedir a aderência e formação da monocamada celular de placas de 96 poços. A camada superior foi preparada com uma suspensão de células na densidade de 5000 células por poço em 80 μ L de uma mistura de ágar a 0,4% com meio DMEM suplementado. As placas foram então incubadas por 24 horas para estabilização. Após este período, as substâncias foram adicionadas empregando-se sete diluições decimais (100 – 0,0001 μ M) para determinação da IC50 e as placas incubadas durante 7 dias em estufa com saturação de 5% de CO₂. A substância EBAC foi testada somente em células MCF-7 enquanto E6 foi testada nas duas linhagens celulares, HCT-116 e MCF-7. A avaliação da viabilidade celular foi realizada pelo método de resazurina conforme item 4.2.2. O valor da IC50 foi determinado através de uma regressão não linear utilizando *software* GraphPadPrism® Version 5.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA).

4.2.3 Avaliação da atividade citotóxica em células mononucleares do sangue periférico humano tratadas com EBAC e E6.

Leucócitos do sangue periférico foram isolados de acordo com protocolo descrito por GAZZINELLI et al., (1990) com modificações. As células de sangue foram transferidas delicadamente por pipeta em tubo graduado contendo Histopaque® 1077 (Sigma Aldrich, USA), na proporção 2 mL de Histopaque: 1 mL de sangue. Posteriormente foram centrifugadas durante 40 min, 500 x G a 20°C.

Após centrifugação, a camada de células mononucleadas foi retirada com auxílio de pipetas de Pasteur e transferida para tubos falcon. Em seguida as células foram lavadas em meio RPMI 1640, para a retirada de resíduos do Ficoll. A viabilidade celular foi avaliada pelo corante azul de tripan e o número de células contado em câmara de Neubauer. As células foram adicionadas em placas de cultura celular de 96 poços na proporção 200.000 células viáveis/poço/180 μ L de meio e incubadas em estufa de CO₂ a 37°C por 24 horas para estabilização. As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 contendo 10% de soro fetal bovino (GIBCO BRL, Grand Island, NY), 2 mM de L-Glutamina (GIBCO UK, Grand Island,

NY) e 3% de solução antibiótica/antimicótica (100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (GIBCO BRL, Grand Island, NY).

Após 24 horas, as substâncias EBAC e E6 foram submetidas a diluições decimais em PBS de forma que as concentrações finais na placa variaram entre 100 e 0,0064 µM. As substâncias em sete concentrações diferentes foram adicionadas nos poços contendo previamente as células mononucleares do sangue humano. As placas foram, então, mantidas em estufa durante 72 horas. Para determinação da IC50, a viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de resazurina, conforme descrito abaixo. As curvas concentração-resposta foram obtidas através de uma regressão não linear utilizando *software* GraphPadPrism® Version 5.01.

4.2.4 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de resazurina.

O ensaio de viabilidade celular foi realizado de acordo com O'BRIEN et al., (2000) com modificações. A resazurina possui cor azul e quando adicionada a cultura de células é reduzida pelas mitocôndrias a resorufina, composto de cor rosa e fluorescente, que pode ser medida por calorimetria ou fluorimetria. A reação de resazurina a resorufina é proporcional à respiração aeróbica (BUNEL et al., 2014) Na realização do experimento, foi adicionado em cada poço, após tempo de tratamento com as drogas, 20 µL da solução de resazurina a 0,6 mM. As placas ficaram incubadas em estufa de CO₂ a 37°C durante 24 horas. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em dois comprimentos de onda - 570 e 600 nm - em leitor de placas (Spectramax –Molecular Devices®). O número de células viáveis e que são capazes de reduzir a resazurina, correlaciona-se com o aumento da absorbância em 570 nm (cor rosa). O número de células viáveis foi expresso como % de inibição segundo o seguinte cálculo:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{100 - (\text{Abs amostra } 570 \text{ nm} - \text{Abs amostra } 600 \text{ nm})}{(\text{Abs DMSO } 570 \text{ nm} - \text{Abs DMSO } 600 \text{ nm})}$$

Nesta fórmula, os valores de absorbâncias das amostras e do DMSO devem ser diminuídos do valor da absorbância do branco correspondente.

4.2.5 Análise de alterações morfológicas em células HL60 tratadas com EBAC e E6 por meio de microscopia de contraste de fase.

A análise das alterações morfológicas foi realizada conforme descrito por CHENG et al., (2012), em microscópio de contraste de fase. Células HL60 foram plaqueadas na densidade de 200.000 células por poço em placas de 24 poços e incubadas *overnight* em estufa de CO₂ a 37°C. Após esse período as células foram tratadas com as substâncias EBAC e E6 ou veículo (DMSO, 0,5%) durante 6, 24 e 48 horas. Após este período, as células foram fotografadas em microscópio EVOS® FL *Color Cell Imaging System* (Thermo Fisher) sem filtro para fluorescência em aumento de 40X a fim de se observar alteração no volume celular e presença de fragmentos celulares. As fotografias apresentadas são representativas de três experimentos independentes.

4.2.6 Avaliação da liberação da enzima lactato desidrogenase em células HL60 tratadas com EBAC e E6.

O ensaio de atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) foi feito conforme descrito por RACHER; LOOBY; GRIFFITHS, (1990) com algumas modificações. Para esse ensaio, as células HL60 foram plaqueadas conforme já descrito em item 4.2.5 e avaliado o efeito das substâncias EBAC e E6 na liberação da enzima LDH por 3, 6 e 24 horas após o tratamento. A produção de lactato foi determinada utilizando a formação de NADH e piruvato, a partir do lactato na presença de excesso de NAD⁺. A reação é catalisada pela lactato desidrogenase, sendo a concentração de lactato calculada a partir do coeficiente de extinção do NADH a 340nm (MEIRA et al., 2005).

Foi preparado um tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,4) com piruvato de sódio a 0,6 mM. A solução de NADH 6,3 mM foi preparada na hora do uso e protegida de luz e adicionada imediatamente antes da leitura. A reação da LDH foi acompanhada após 30 minutos da adição de NADH com leitura das absorbâncias a 340 nm em espectrofotômetro *Varioskan™ Flash* (Thermo Scientific). Como controle positivo foi utilizado Triton X-100 (0,4%) e como controle negativo, DMSO (0,5%). Para o cálculo de porcentagem de lise, foi considerado como 100% de lise as

células tratadas com Triton X-100 e 0% para DMSO (CHAN; MORIWAKI; DE ROSA, 2013).

4.2.7 Avaliação do efeito de EBAC e E6 no ciclo celular e no conteúdo de DNA fragmentado em células HL60 por citometria de fluxo

O efeito das substâncias no ciclo celular foi avaliado pela fluorescência emitida pelo iodeto de propídeo e quantificação do conteúdo de DNA subdiplóide (DNA fragmentado) foi realizada em citometria de fluxo de acordo com o método descrito por NICOLETTI et al. (1991). As células HL60 foram cultivadas, em placas de 24 poços, na densidade de 200.000 células/poço, e incubadas *overnight* estufa de CO₂ a 37°C. Após estabilização, células HL60 foram incubadas com as substâncias a serem testadas (EBAC e E6), Etoposídeo (controle positivo) e DMSO (controle negativo) por 24 e 48 horas. Após o período de tratamento, as células foram transferidas para tubos de 1 mL e centrifugadas a 400xG durante 3 minutos em micro centrífuga (Denver Instrument Company, USA). O sobrenadante foi desprezado e nos tubos contendo o precipitado de células foi adicionado 300 µL de uma Solução Fluorocrômica Hipotônica (HFS), contendo 50 µg/ml de Iodeto de Propídeo - PI (Sigma, Saint Louis, Missouri USA), 0,1% de triton X-100 (Sigma, Saint Louis, Missouri USA) e citrato de sódio a 0,1% (Sigma, Saint Louis, Missouri USA).

As placas foram incubadas por período entre 1 e 4 horas em geladeira de 2°C a 8°C. Após este período, os núcleos foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCan (Becton Dickinson, USA), com registro de 10.000 eventos para cada amostra. As aquisições foram realizadas conforme KANG et al. (2010). A tensão FL2 foi ajustada de modo que as fases G0/G1 e G2/M formaram picos de valores, respectivamente, de 200 e 400 em FL2-A. Os valores de FSC-H, SSC-H, FL2-A e FL2-W foram adquiridos para análises de histogramas e estatísticas no programa FlowJo 7.6.4® (Tree Star, Inc®). Foram realizados, no mínimo, quatro experimentos independentes em triplicata.

4.2.8 Perfil da fragmentação nuclear através de eletroforese em gel de agarose em células HL60 após tratamento com EBAC e E6.

O perfil de fragmentação do DNA foi verificado por eletroforese em gel de agarose 1,5% para observar o perfil típico de apoptose com a formação de bandas contendo múltiplos de 180-200 ("padrão em escada" ou *ladder*) (WLODKOWIC et al., 2011). Células HL60 foram cultivadas em placa de 24 poços com concentração de 200.000 células/poço durante 24 horas. Posteriormente, adicionaram-se as substâncias EBAC (40µM) e E6 (10µM) e incubou-se a placa novamente por 24 horas em estufa de CO₂ a 37°C. A extração do DNA foi realizada, após este período de tratamento, conforme descrito no protocolo já bem estabelecido (GRIMBERG et al., 1989) e a concentração de DNA foi determinada por leitura da absorbância a 260 nm em aparelho NanoDrop (ThermoScientific). Foi utilizado 2 µg de DNA por canaleta. A eletroforese foi conduzida em tampão TAE-1X a 100V e 500 mA e posteriormente o gel foi corado com solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) e fotografado em transiluminador.

4.2.9 Análise de alterações nucleares por microscopia de fluorescência após marcação com Hoechst 33342 em células HL60 tratadas com EBAC e E6.

Para alterações morfológicas nucleares se observar, realizou-se procedimento conforme descrito por CABRERA et al. (2015), por meio de microscopia de fluorescência. Células HL60 foram plaqueadas na densidade de 200.000 células por poço em placas de 24 poços e incubadas *overnight* em estufa de CO₂ a 37°C. Após esse período as células foram tratadas com EBAC (40 µM) e E6 (10 µM) ou veículo (DMSO a 0,5%) durante 6, 24 e 48 horas. Após este período as células foram marcadas com Hoechst 33342 (Sigma) na concentração final de 1,0 mg/mL, durante 15 minutos ao abrigo de luz. Após marcação, as células foram analisadas no microscópio de fluorescência (EVOS® FL Color, Life technologies) com filtro DAPI. As imagens apresentadas são representativas de três experimentos independentes. Os dados foram interpretados conforme LEE et al. (2014): núcleos das células foram classificados como normais ou condensados e/ou fragmentados.

4.2.10 Avaliação da exposição de fosfatidilserina por Anexina-V e marcação de DNA com iodeto de propídeo por citometria de fluxo em células HL60 tratadas com EBAC e E6

A externalização de fosfatidilserina e a marcação de DNA foi avaliada em citometria de fluxo de acordo com VERMES et al. (1995) na linhagem mais susceptível – HL60. Para esta avaliação foi utilizado o kit de detecção FITC Annexin V (BD USA).

Células HL60 foram cultivadas na densidade de 200.000 células por poço em placas de 24 poços e incubadas *overnight* em estufa de CO₂ a 37°C. As células foram tratadas com as substâncias EBAC (40µM) e E6 (10µM) por 3 e 24 horas. Após esse período, as células foram transferidas para tubos FACS e centrifugadas a 200xG durante 5 min a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado de células foi lavado duas vezes com 500 µL de PBS e ressuspenso em 100 µL na solução de tampão de ligação contida no kit (0,1 M HEPES/NaOH (pH 7.4), 1,4 M NaCl, 25 mM CaCl₂). Adicionou-se 3 µL de Anexina V FITC (BD Biosciences) em cada tubo e incubou-se à temperatura ambiente durante 15 minutos ao abrigo de luz. Posteriormente, foi adicionado mais 200 µL da solução de tampão de ligação e 2 µL de solução iodeto de propídeo (BD Biosciences) imediatamente antes da leitura, conforme instruções do fabricante. As células marcadas foram, então, analisadas em citômetro de fluxo FACSCan (Becton Dickinson, USA), registrando-se 30.000 eventos para cada amostra.

Os resultados foram apresentados em gráficos “*dot-plot*”. As marcações foram analisadas com base na intensidade de FL1-H (Anexina V) e FL2-H (PI). Os dados obtidos foram analisados em *software* FlowJo 7.6.4® (Tree Star, Inc) e as porcentagens de células agrupadas em cada quadrante foram calculadas, onde Q1= Anexina V-, PI+; Q2 = Anexina V+, PI+; Q3 = Anexina V-, PI-; Q4 = Anexina V+, PI-. Foram realizados, no mínimo, dois experimentos independentes em duplicata.

4.2.11 Bloqueio da ativação de caspases por Z-VAD-FMK em células HL60.

Para se verificar a participação das caspases no processo de morte provocado pelas amostras EBAC (40 µM) e E6 (10 µM), realizou-se o experimento

de progressão de ciclo celular após bloqueio inespecífico de caspases com Z-VAD-FMK. Células HL60 foram cultivadas na densidade de 100.000 células/poço em placas de 96 poços e incubadas *overnight* em estufa de CO₂ a 37°C. Após esse período as células foram pré-incubadas com 40 µM de Z-VAD-FMK (Biomol International LP, UK) durante 40 minutos (SOUZA-FAGUNDES et al., 2003). As substâncias foram adicionadas em poços já tratados ou não com o bloqueador. Posteriormente, as placas foram incubadas durante 24 horas e então processadas e os conteúdos de DNA foram mensurados conforme item **4.2.7**.

4.2.12 Detecção de caspase -3 ativa por citometria de fluxo em células HL60 após tratamento com EBAC e E6.

A quantificação de caspase-3 foi feita com o kit FITC Active Caspase-3 Apoptosis Kit (BD Pharmigen) que contém um anticorpo para reconhecer especificamente a forma ativa da caspase -3. O procedimento experimental está descrito resumidamente a seguir e foi feito conforme instruções do fabricante.

Células HL60 foram plaqueadas na densidade de 200.000 células por poço em placas de 24 poços e incubadas *overnight* em estufa de CO₂ a 37°C. Após esse período, as células foram tratadas com as substâncias EBAC e E6 durante 3 horas. O meio com células foi centrifugado a 200xG a 4°C durante 5 min. O precipitado de células foi lavado duas vezes com PBS-W e ressuspendido em 500 µL de paraformaldeído 2% gelado. As células foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente e lavadas por mais duas vezes com PBS-W e por fim, ressuspendidas em 100 µL de PBS-P. Adicionou-se 10 µL de anti-caspase -3 ativa FITC (BD Pharmingen, No 51-68654X) por poço e então a placa foi incubada por 40 minutos em estufa de CO₂. As células foram lavadas mais duas vezes e ressuspendidas em 300 µL de PBS-W. A leitura foi realizada em citometria de fluxo (FASCan, BectonDickson). A porcentagem de células com caspase -3 ativa foi determinada por meio do programa FlowJo 7.6.4® (Tree Star, Inc) e representadas em histogramas que apresentam o número de eventos em função da fluorescência ou em gráficos *dot-plot* de SSC-H (granulosidade) em função de FL1-H-FITC (fluorescência).

4.2.13 Detecção de caspases -8 e -9 ativa por leitura espectrofotométrica em células HL60 após tratamento com EBAC e E6.

A quantificação das caspases -8 e -9 foram feitas com os kits específicos da Invitrogen. Para detecção de caspase -9, utilizou-se o kit Caspase9/Mch6/Apaf-3 Colorimetric protease assay (Invitrogen) e para detecção de caspase -8 foi utilizado o kit Caspase-8 Protease Assay (Invitrogen). Os kits contêm um substrato IETD-pNA (para caspase -8) e substrato LEHD-pNA (para caspase -9). Esses substratos são compostos por um grupo cromóforo, p-nitroanilida (pNA) e um tetrapeptídeo sintético (IETD ou LEHD). Quando há clivagem do substrato pela caspase correspondente, pNA livre é quantificado em espectrofotômetro a 400 ou 405 nm.

O kit foi utilizado conforme instruções do fabricante. As células HL60 foram plaqueadas a 200.000 células/poço em placa de 24 poços e posteriormente incubadas *overnight* em estufa de 37°C. As células foram tratadas por 3 horas com as substâncias em estudo ou controles positivo (Etoposídeo) e negativo (DMSO). Centrifugou-se as células a 200xG por 5 minutos em microcentrífuga (Denver Instrument Company, USA) e foi descartado o sobrenadante. As células foram lisadas com 50 µL de *Cell lysis Buffer* (solução do kit) e incubadas por 10 minutos em banho de gelo. O sobrenadante foi recolhido em outro tubo de plástico e mantido em banho de gelo enquanto se mensurava a concentração proteica. A medida da quantidade de proteína foi feita pelo método de Bradford. Diluiu-se o extrato citosólico a uma concentração de proteína de 100 µg por 25 µL de tampão. Posteriormente adicionou-se 25 µL do extrato com DTT 10mM e o substrato LEHD-pNA a 4mM (quando foi detectada caspase -9) e IETD-pNA (quando detectado caspase -8), diluídos conforme recomendação do fabricante. Incubou-se a placa em estufa de CO₂ a 37°C por duas horas e posteriormente fez-se a leitura em espectrofotômetro (Spectramax –Molecular Devices®) em comprimento de onda 405 nm. A quantidade de caspase -9 ou -8 ativa foi determinada comparando-se a absorbância do controle com a absorbância dos tratados.

4.2.14 Determinação de variações no potencial de membrana mitocondrial em células HL60 após tratamento com EBAC e E6

A avaliação de mudanças no potencial de membrana mitocondrial foi realizada com o kit *MitoProbe™ DiIC1(5) Assay Kit* (Invitrogen), que contém o corante DiIC1(5) (1,1',3,3,3',3'-hexamethylindodicarbo - cyanineiodide) e CCCP (carbonylcyanide 3- chlorophenylhydrazone). Células HL60 foram plaqueadas na densidade de 200.000 células por poço em placas de 24 poços e incubadas *overnight*. Após esse período as células foram tratadas com as substâncias durante 3 horas. As células também foram incubadas com um agente despolarizante como controle positivo CCCP. Ao final do tratamento, as células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas por 30 minutos em estufa de CO₂ a 37°C com meio RPMI 1640 contendo 25 nM DiIC1(5). Posteriormente, as células foram novamente lavadas em PBS gelado e após serem ressuspensas em PBS foram analisadas em citometria de fluxo (BD LSRFortessa utilizando o filtro APC).

4.2.15 Detecção da produção de espécies reativas de oxigênio em células HL60 tratadas com EBAC e E6.

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelular foi mensurada em citometria de fluxo conforme descrito por ERUSLANOV e KUSMARTSEV (2010) com modificações. Células HL60 foram plaqueadas na densidade de 200.000 células por poço em placas de 24 poços e incubadas *overnight*. Após esse período as células foram tratadas com as substâncias em estudo durante 1, 3 e 6 horas. As células foram centrifugadas a 200xG a 4°C durante 5 minutos em microcentrifuga (Denver Instrument Company, USA), ressuspensas em 300 µL de solução de PBS contendo 1 µM de DCFH-DA e incubadas durante 1 hora em estufa de CO₂ a 37°C ao abrigo de luz. Após esse período, a suspensão de células foi lavada mais três vezes com PBS e então fixadas em 300 µL de paraformaldeído 2% gelado. A intensidade média de fluorescência em FL1 (DCF) corresponde ao total de EROS. Para a determinação desses valores, a leitura foi feita em citômetro de fluxo (FASCan, BectonDickson).

4.2.16 Avaliação da indução de autofagia em células HL60 tratadas com EBAC

Para avaliação da indução de autofagia foi utilizada a marcação das células HL60 com o corante alaranjado de acridina conforme protocolo descrito por

YOKOYAMA et al. (2008). Células HL60 foram plaqueadas na densidade de 200.000 células/poço em placas de 24 poços e incubadas em estufa de CO₂ a 37°C *overnight*. Após este período, foi realizado o tratamento com EBAC ou veículo por 24 h. As células foram lavadas com PBS gelado, em seguida, foram marcadas com solução de alaranjado de acridina (Sigma Aldrich) a 10 µg/mL preparada em água miliQ. Após 10 minutos de incubação, à temperatura ambiente, as células foram levadas para leitura em citômetro de fluxo (FASCan, BectonDickson). A análise dos resultados foi realizada pelo programa FlowJo 7.6.4® (Tree Star, Inc) e as células foram classificadas em de acordo com a quantidade de vacúolos ácidos detectados. Células autofágicas emitem as fluorescências verde e vermelho (FL1+ FL3+) e células não-autofágicas emitem somente fluorescência verde (FL1+FL3-) (KANEMATSU et al., 2010).

4.2.17 Bloqueio de autofagia em células HL60 por Bafilomicina A1

Células HL60 foram cultivadas na densidade de 100.000 células/poço em placas de 96 poços e incubadas em estufa de CO₂ a 37°C *overnight*. Após esse período, adicionou-se 10 nM de Bafilomicina A1 (Sigma aldrich, USA), inibidor específico das fases tardias da autofagia (KANEMATSU et al., 2010). A substância EBAC 40 µM foi adicionada em poços imediatamente após a adição da Bafilomicina A1. Realizou-se esse experimento somente com EBAC, pois foi somente com esta substância que foi observado aumento de vacúolos ácidos no ensaio com alaranjado de acridina. Procedemos às etapas referentes ao item **4.4.16** para avaliar alteração na quantidade dos vacúolos autofágicos e ao item **4.2.7** para avaliação do conteúdo de DNA subdiplóide.

4.2.18 Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos foram realizados em duplicata ou triplicata, sendo os resultados expressos como a média ± desvio-padrão. As diferenças estatisticamente significativas ou não dos tratamentos em relação aos controles, foram avaliadas através de teste T de *student* ou análise de variância (ANOVA) e pós-teste Turkey, utilizando o programa GraphPadPrism®. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do efeito de EBAC e E6 no ensaio de clonogenicidade em monocamada e em modelo de cultura 3D (Soft-Ágar) em células MCF-7 e HCT-116

A avaliação da capacidade de EBAC e E6 em inibir a formação de colônias foi realizada em monocamada (2D) e em microambiente tridimensional (3D). As substâncias foram avaliadas contra linhagens tumorais sensíveis. O nitrocomposto EBAC foi testado em células MCF-7 e a hidrazona E6 foi testada em células MCF-7 e HCT-116.

A **Figura 4** representa a curva para determinação de IC₅₀ da EBAC em células MCF-7 cultivadas em soft-ágar. A IC₅₀ calculada nesse modelo foi igual a 16,34 μ M (intervalo de confiança 95%: 14,03 μ M - 19,03 μ M). Esse valor é aproximadamente metade (1,8 x) do encontrado para IC₅₀ em modelo 2D (29,6 \pm 2,9 μ M). Portanto, em um ambiente tridimensional, EBAC apresentou aproximadamente o dobro da atividade.

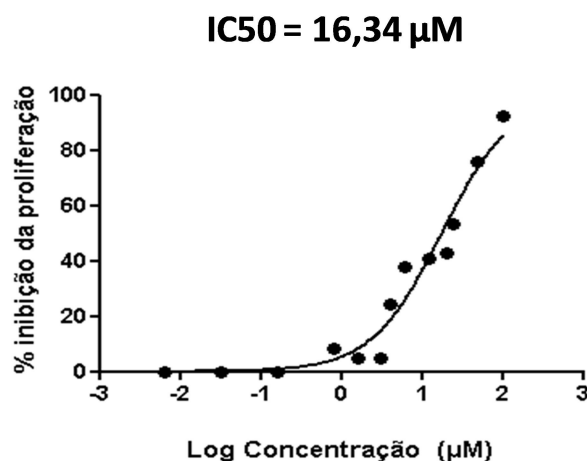


Figura 4 - Curva dose-resposta de células MCF-7 cultivadas em soft-ágar e tratadas com EBAC. Células MCF-7 foram cultivadas em soft-ágar e tratadas com sete concentrações diferentes de EBAC por sete dias. Gráfico representativo da determinação de IC₅₀ de EBAC em células MCF-7 cultivadas em soft-ágar. Resultado referente a cinco experimentos independentes realizados em duplicata.

A substância E6 também apresentou aumento da atividade citotóxica no modelo 3D. Houve aumento de 15 e 68x em relação aos valores de IC50 em monocamada (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Valores de IC50 e índice de seletividade (IS) da amostra E6 em diferentes linhagens celulares cultivadas em modelo bidimensional e em soft-ágar.

E6	MCF-7	HCT-116
IC50 (µM) (2D)	6,84 (5,28 - 8,40)*	2,17 (1,35 - 2,99)*
IC50 (µM) (3D)	0,4507 (0,1869 to 1,087)	0,03916 (0,02519 to 0,06087)
Aumento de atividade	15X	68X

*Dados da IC50 em 2D foram publicados por FERREIRA et al. (2016).

Em relação ao ensaio de clonogenicidade em monocamada, o resultado para as substâncias EBAC e E6 está representado na **Figura 5**. O tratamento com EBAC 30 µM (valor aproximado da IC50 em MCF-7) foi capaz de reduzir significativamente a fração de sobrevivência das células tumorais. A fração de sobrevivência se relaciona diretamente com a quantidade de colônias contadas após 24 horas de tratamento com a substância. A substância E6 no valor aproximado de sua IC50 para MCF-7 (7 µM) e HCT-116 (2 µM) também foi capaz de inibir praticamente 100% do crescimento de colônias.

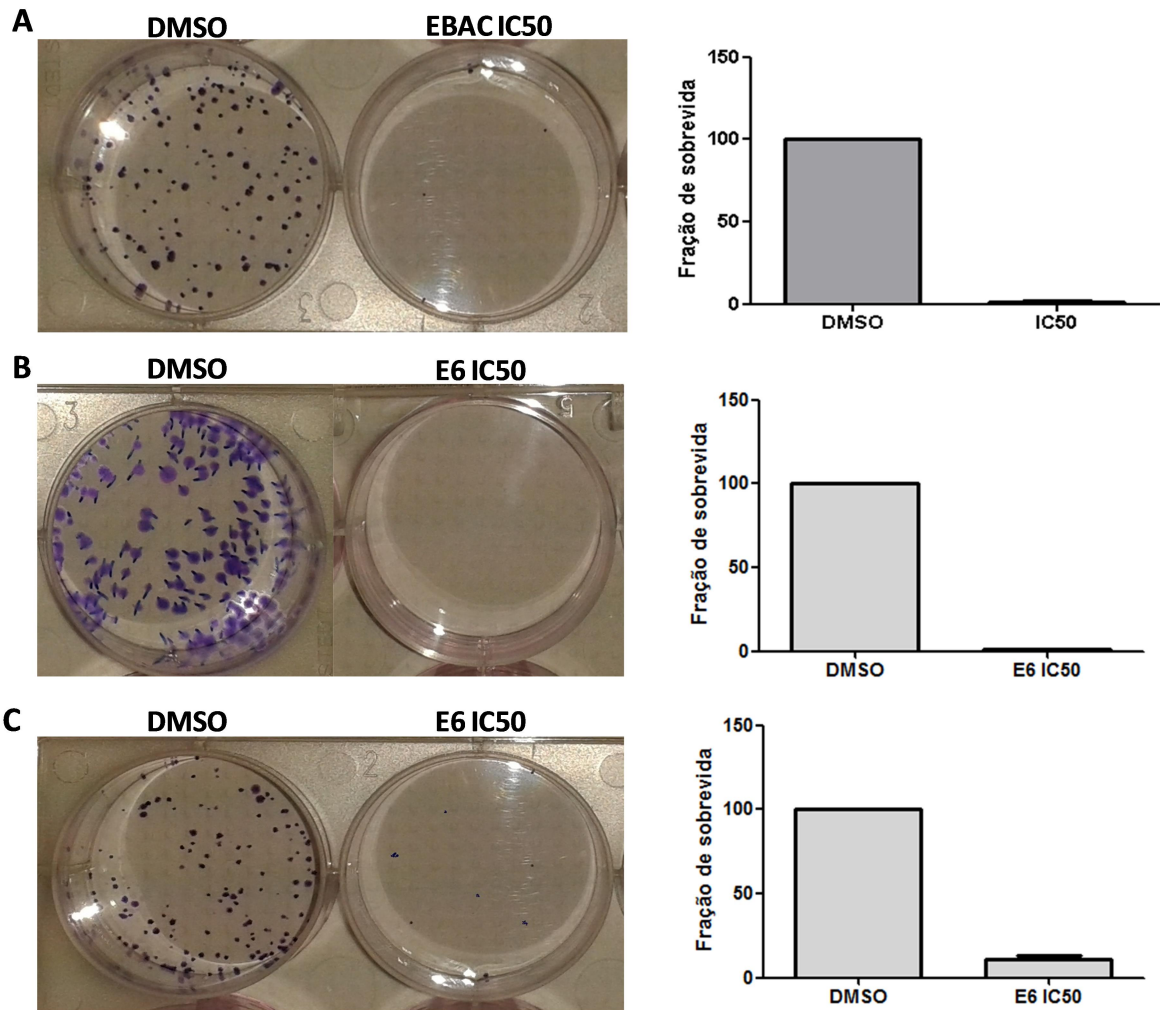


Figura 5 - Inibição da formação de colônias de células MCF-7 e HCT-116 tratadas com EBAC e E6. Tratamento com EBAC e E6 durante 24 horas foi capaz de diminuir significativamente a formação das colônias nessas linhagens tumorais celulares após 14 dias. **A)** Imagem e gráfico representativos da determinação de IC50 de EBAC em células MCF-7 cultivadas em soft-ágar. **B)** Imagens representativas e gráfico de barras dos resultados encontrados em células MCF-7. **C)** Imagens representativas juntamente com gráfico de barras em células HCT-116. Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata.

5.2 Avaliações da atividade citotóxica e seletividade em células mononucleares do sangue periférico humano

A seletividade das substâncias foi avaliada após determinação da IC50 em células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC), que foi usada para o cálculo de índice de seletividade (IS), que é um indicador que permite avaliar a toxicidade do composto e pode ser usado como padrão de comparação entre duas substâncias (MULLER; MILTON, 2012). O IS foi calculado da seguinte forma:

$$IS = IC50 \text{ em células normais (PBMC)} / IC50 \text{ Células tumorais}$$

Em trabalho prévio, EBAC foi avaliada contra sete linhagens tumorais e em células Vero e os valores de IC50 já haviam sido determinados (LOPES et al., 2015). O valor de IC50 para a linhagem HL60 é igual a $16,6 \pm 7,6 \mu\text{M}$ (**Tabela 2**). No presente trabalho, foi avaliado o efeito de EBAC em células PBMC, sendo que na concentração de $100 \mu\text{M}$ houve inibição $42,3 \pm 16,7\%$ da viabilidade celular. Portanto, o valor de IC50 determinado foi maior que $100 \mu\text{M}$ (concentração máxima testada). O valor de IS calculado para EBAC utilizando-se a IC50 em HL60 e PBMC foi aproximadamente igual a 6.

A substância E6 também apresentou citotoxicidade para as células HL60 com IC50 igual a 2.56 ± 1.55 , conforme publicado por Ferreira e colaboradores (2016) (**Tabela 2**). Não foi possível determinar com exatidão o valor da IC50 em PBMC devido à insolubilidade da E6 nas concentrações maiores que $10 \mu\text{M}$. Portanto, a concentração utilizada para o cálculo de IS foi $10 \mu\text{M}$. No ensaio usando as células PBMC, a substância E6 provocou $9,55 \pm 7,41\%$ de redução da viabilidade celular. O valor de IS para E6 foi aproximadamente igual a 4.

Tabela 2 - Valores de IC50 e índice de seletividade (IS) das substâncias EBAC e E6 em células HL60 e PBMC

	EBAC	E6
HL60 - IC50 (μM)	16.6 ± 7.6^1	2.56 ± 1.55^2
PBMC - IC50 (μM)	>100	>10
IS	6	4

¹ Dados publicados por LOPES et al (2015)

² Dados publicados por FERREIRA et al. (2016).

Os ensaios para avaliação de mecanismo de ação foram realizados em duas concentrações de EBAC: a IC50 (valor aproximado igual a $20 \mu\text{M}$) e uma concentração mais alta, sendo escolhida a IC90 (concentração que inibe 90% do crescimento celular). O cálculo da IC90 foi feito no programa GraphPadPrism 5 utilizando os valores de IC50 e de inclinação da curva. O valor calculado pelo

programa foi igual a 39,5 μM , sendo que o valor utilizado nos experimentos foi o valor aproximado igual a 40 μM .

Para a substância E6 também se utilizou duas concentrações, entretanto, o valor IC90 não foi utilizado devido à insolubilidade da substância em meio aquoso. A maioria dos ensaios foi realizada utilizando-se o valor de 10 μM (concentração máxima solúvel) e alguns experimentos foram realizados na concentração de 5 μM (1/2 do valor da concentração máxima solúvel - 10 μM).

5.3 Alterações morfológicas em células HL60 provocadas após tratamento com EBAC e E6

As alterações morfológicas induzidas pelo tratamento com EBAC foram analisadas por microscopia em campo claro. Após o estímulo por diferentes intervalos de tempo, foram detectadas alterações morfológicas em todas as situações experimentais quando comparadas ao grupo controle (**Figura 6**). O efeito da substância é tempo-dependente e em todos os tempos de tratamento é possível notar alteração do formato das células, diminuição do volume celular e a presença de fragmentos celulares.

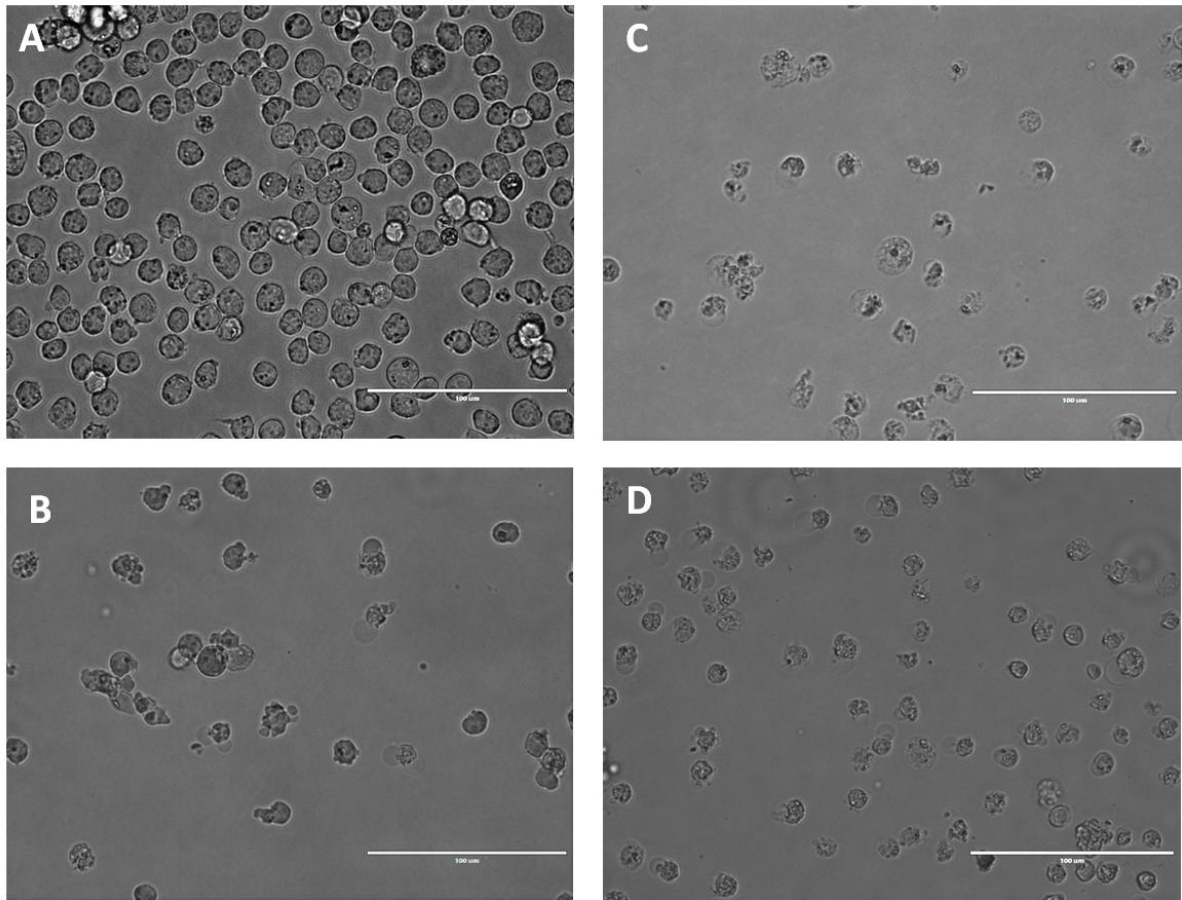


Figura 6 - Alterações morfológicas em células HL60 induzidas pelo tratamento com EBAC. Microscopia em campo claro de células HL60 após tratamento com EBAC a 40 µM. **A:** controle, células tratadas somente com DMSO a 0,05%, **B:** células fotografadas após 6h de tratamento com EBAC, **C:** células após 24h de tratamento, **D:** células após 48h de tratamento. Todas as imagens foram registradas em aumento de 40 vezes e escala de 100 µm.

Assim como para EBAC, o estímulo com a hidrazona E6 por 6h induziu poucas alterações na morfologia das células. Entretanto, após 24 e 48 horas é possível observar tais como diminuição do volume celular, perda da morfologia tradicional das células e formação de debris celulares (**Figura 7**).

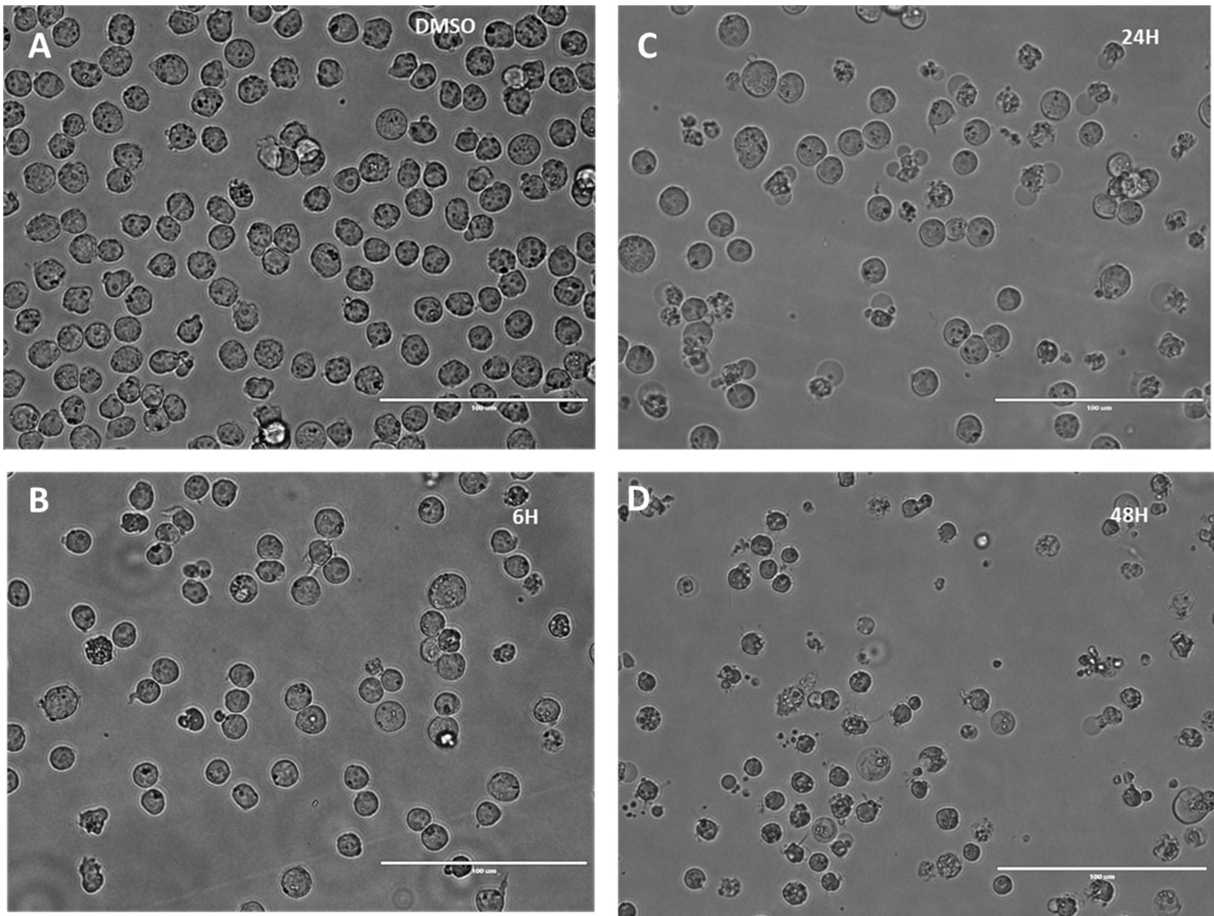


Figura 7 – Tratamento com E6 provoca mudanças morfológicas em células HL60. Microscopia óptica de células HL60 após tratamento com E6 a 10 μM . **A:** controle, células tratadas somente com DMSO a 0,05%, **B:** células fotografadas após 6h de tratamento, **C:** células após 24h de tratamento, **D:** células após 48h de tratamento. Todas as imagens foram registradas em aumento de 40 vezes e escala de 100 μm .

Para avaliação das alterações morfométricas foi realizada uma análise por citometria de fluxo nos parâmetros FSC e SSC *light scatter*, que permitem avaliação das células por tamanho e complexidade intracelular, respectivamente (**Figura 8**). Após 6h de tratamento com EBAC, pode-se observar um deslocamento de uma população celular condizente com a redução do tamanho (eixo FSC) bem como um aumento da granulosidade (SSC) quando comparada a cultura controle (DMSO 0,05%). Esse efeito observado foi dependente do tempo de tratamento.

A avaliação dos parâmetros morfométricos após tratamento com a substância E6 foi realizado e o resultado foi bastante parecido com o provocado por EBAC (**Figura 8**).

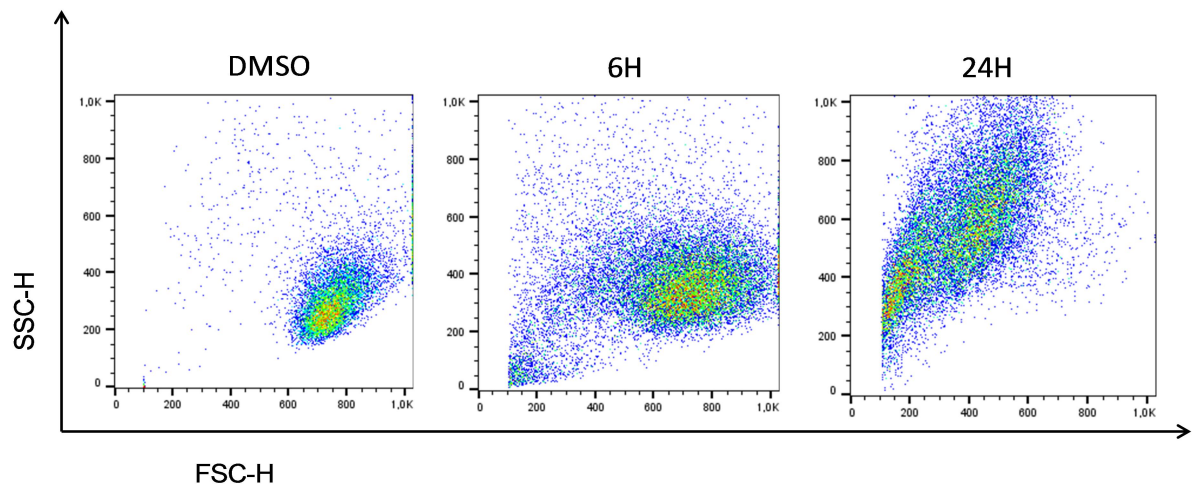


Figura 8 - Alterações nos parâmetros morfométricos FSC e SSC de células HL60 após tratamento com EBAC. Células HL60 após tratamento com EBAC 40 μ M foram analisados por citometria de fluxo e foi construído gráficos *dot-plot* FSC (tamanho) por SSC (granulosidade). Na ordem: controle (células tratadas somente com DMSO a 0,05%), após 6h de tratamento e após 24h de tratamento com EBAC. Imagens representativas de três experimentos independentes realizados em triplicata.

5.4 Avaliação da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) após tratamento com EBAC e E6 em células HL60.

O ensaio de atividade da enzima lactato desidrogenase foi utilizado para quantificar as células com perda de integridade de membrana, característica comum de células em processo de morte por apoptose tardia ou necrose. O tratamento com EBAC (40 μ M) em todos os tempos de tratamento provocou aumento na porcentagem de liberação de LDH em relação ao controle de DMSO (**Figura 9**). Após 3 horas de tratamento, $36,97 \pm 8,5\%$ das células tratadas com EBAC apresentavam perda de viabilidade da membrana. Em nenhum dos tempos avaliados observou-se percentual de lise celular maior que 60%. Células tratadas com DMSO, que apresentam baixa liberação de LDH, foram consideradas como controle negativo. O tratamento com Triton X-100 foi realizado durante 3 horas como controle positivo e foi considerado como 100% de liberação de LDH.

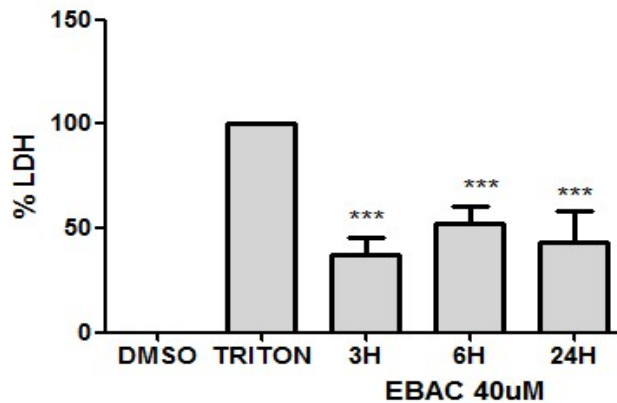


Figura 9 – Efeito da liberação de LDH após tratamento com EBAC 40 μ M em células HL60. Quantificação da liberação da enzima lactato desidrogenase por células HL60 após tratamentos de 3, 6 e 24 horas com EBAC. Dados representativos de dois experimentos independentes realizados em triplicata, apresentados como média \pm desvio padrão (**p<0,001 indicam resultados significativamente diferentes).

Tratamento com E6 provocou um aumento gradativo na porcentagem de lise com a passar do tempo de tratamento (**Figura 10**). Após 3 horas de tratamento, é possível observar que $17,69 \pm 11,91\%$ das células não apresentavam integridade de membrana. Tratamento após 6 e 24 horas provocou $80,53 \pm 5,66\%$ e $84,99 \pm 13,0\%$ das células apresentando atividade de lactato desidrogenase (LDH), respectivamente. Não houve diferença estatística entre os valores encontrados para 6 e 24 horas de tratamento.

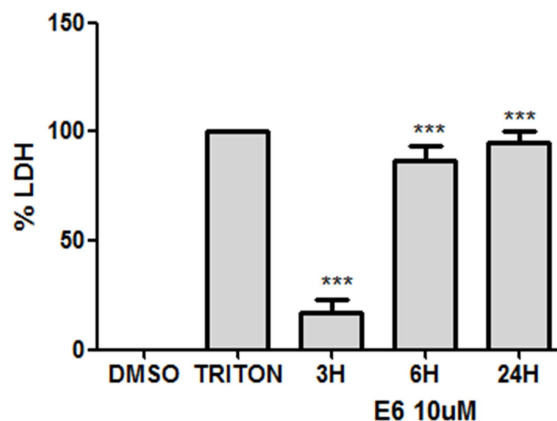


Figura 10 - Efeito da liberação de LDH após tratamento com E6 10 μ M em células HL60. Quantificação da liberação da enzima lactato desidrogenase após tratamentos de 3, 6 e 24 horas com E6. Dados representativos de dois experimentos independentes realizados em triplicata, apresentados como média \pm desvio padrão. Resultados significativamente diferentes em relação ao controle de DMSO (**p<0,001).

5.5 Análise do ciclo celular e determinação do conteúdo subdiplóide de DNA após tratamento com EBAC e E6 em células HL60.

Investigaram-se os efeitos da substância EBAC na distribuição das fases do ciclo celular e no aparecimento de população na região sub-G1 durante 24 e 48 horas. Após o período de tratamento, as células HL60 foram marcadas com uma solução hipotônica fluorocrômica (HFS) contendo iodeto de propídeo (PI), já que este composto se intercala entre os pares de bases da dupla fita de DNA resultando em uma intensidade de fluorescência diretamente proporcional ao conteúdo de DNA celular. A análise realizada por citometria de fluxo gera histogramas de intensidade de fluorescência (FL2) por número de eventos adquiridos. O histograma clássico, (pode ser observado no histograma do controle de DMSO) apresenta o primeiro pico referente ao número de células na fase G1 (conteúdo de DNA = 2N) e o segundo nas fases G2/M (conteúdo de DNA = 4N), enquanto que o intervalo entre os dois picos representa a fase de síntese de DNA (S). O conteúdo de DNA na região sub-G1 foi considerado como fragmentação do DNA e foi avaliado como um indicativo de morte por apoptose (GONG; TRAGANOS; DARZYNKIEWICZ, 1994).

Nos histogramas referentes aos tratamentos com EBAC nas duas concentrações testadas, observam-se alterações dos perfis dos histogramas, em relação ao controle. Após 24 horas de tratamento com EBAC 20 μM (**Figura 11**), observou-se um aumento significativo do número de células na fase G2/M e uma diminuição de células em G0/G1 e S. Estes resultados sugerem que a substância induz parada no ciclo celular na fase G2/M. Houve também aumento significativo na população em sub-G1.

O aumento da concentração (40 μM) provocou aumento no conteúdo de DNA fragmentado ($70,12 \pm 7,26 \%$) com valores próximos aos provocados por etoposídeo a 40 μM ($87,48 \pm 12,58 \%$). Houve também diminuição da população de células em todas as fases do ciclo celular e não houve parada em G2/M. O perfil provocado por EBAC 40 μM ficou bem parecido com o perfil provocado pelo controle positivo de etoposídeo.

Após 48 horas de tratamento com EBAC, os perfis de ciclo celular nas duas concentrações são praticamente iguais e há diminuição do número de células nas fases G0/G1, S e G2/M, mas houve aumento significativo das células em sub-G1. EBAC a 20 μ M e a 40 μ M provocaram fragmentação de DNA de $73,25 \pm 16,133\%$ e $81,71 \pm 12,135\%$ das células, respectivamente.

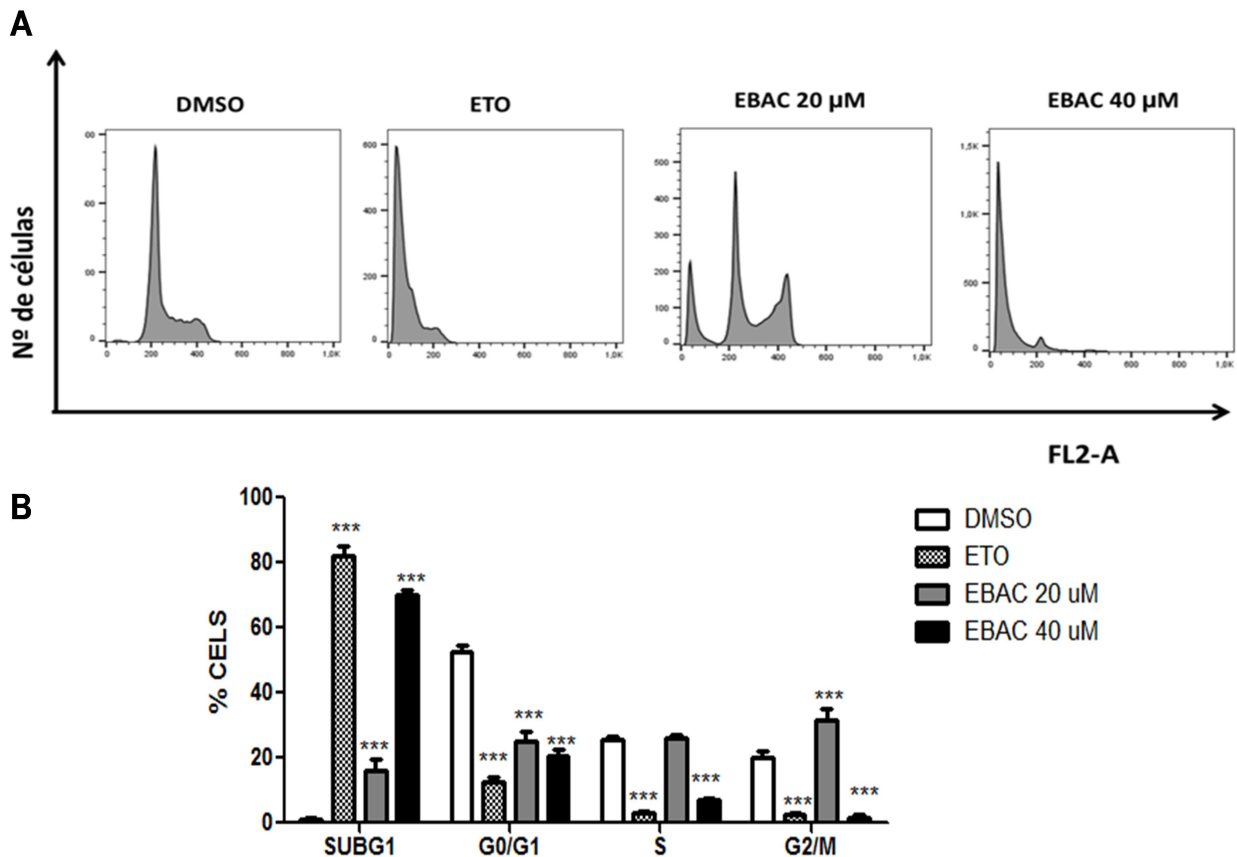


Figura 11 - Efeito da substância EBAC sobre o ciclo celular das células HL60. Células HL60 foram tratadas por 24 horas com DMSO (controle negativo), etoposídeo (40 μ M) ou tratadas com a substância EBAC nas concentrações de 20 e 40 μ M. Posteriormente foram marcadas com solução de HFS contendo PI e então analisadas por citometria de fluxo. **A)** Histogramas representativos do perfil de ciclo celular provocado pelas substâncias. **B)** Representação gráfica da quantificação da população de células em cada fase do ciclo celular. Dados referentes a quatro experimentos independentes realizados em triplicata apresentados como média \pm desvio padrão e *** $p < 0,001$ em relação ao controle (DMSO).

Células HL60 também foram tratadas durante 24 e 48 horas com a substância E6 nas concentrações de 5 e 10 μ M e posteriormente marcadas com PI. Após as primeiras 24 horas, o tratamento com 5 μ M induziu um aumento na população em

G0/G1 e pouco acúmulo na região sub-G1. Controle positivo de etoposídeo provocou população equivalente a $87,48 \pm 12,58$ % das células na região sub-G1. Com o aumento da concentração o perfil se modificou e houve aumento na região de sub-G1 devido à diminuição de G2/M, já que não houve modificação na quantidade de células que se encontrava na fase G0/G1 (**Figura 12**). Portanto, o tratamento com a concentração de $10 \mu\text{M}$ foi capaz de induzir fragmentação de DNA e o tratamento com as duas concentrações testadas provocaram um acúmulo na região G0/G1, sendo este mais proeminente com o tratamento a $5 \mu\text{M}$.

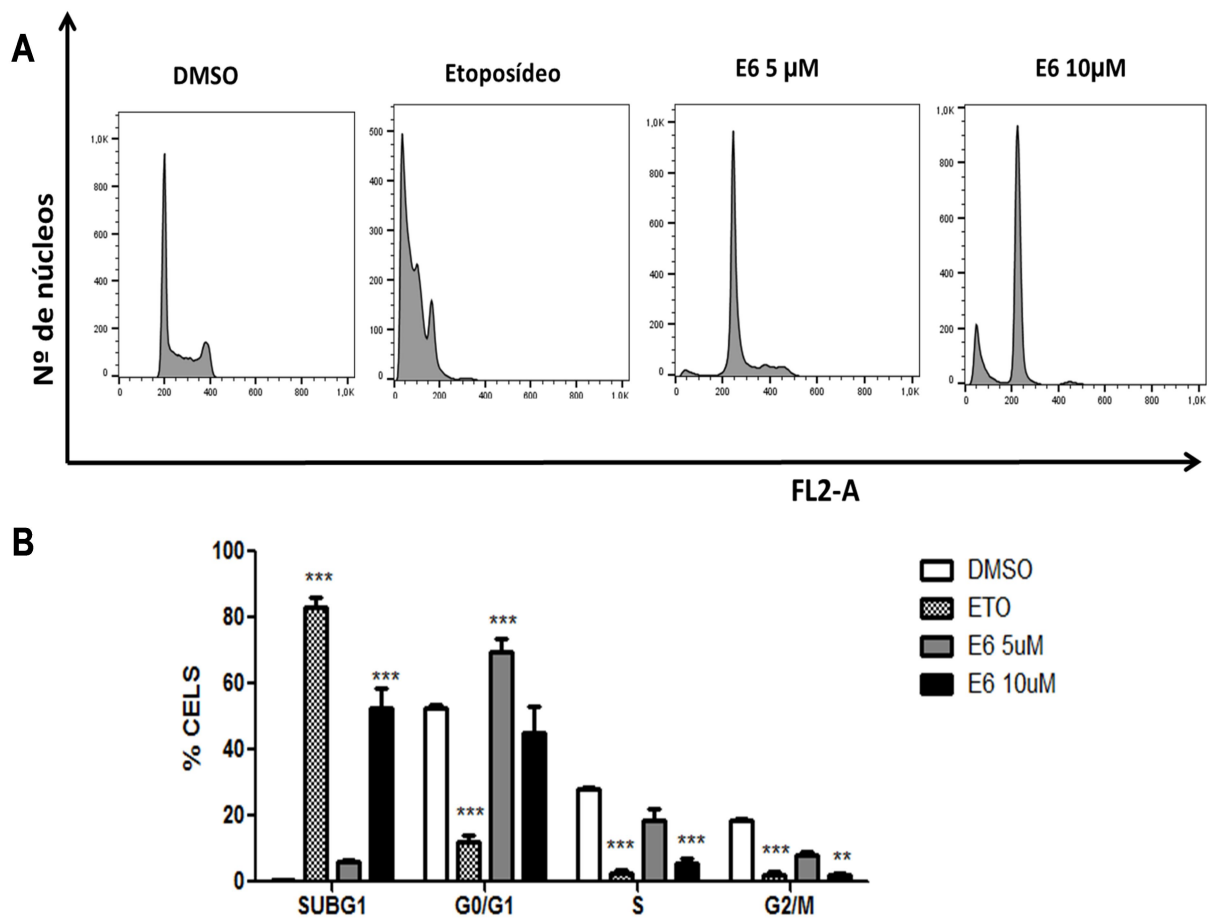


Figura 12 - Efeitos da substância E6 sobre o ciclo celular de células HL60 após 24 horas de tratamento. As células foram incubadas por 24 horas sem tratamento (controle negativo) ou tratadas com o E6, nas concentrações de 5 e $10 \mu\text{M}$. Posteriormente, as células foram coletadas e marcadas com iodeto de propídeo e analisadas por citometria de fluxo. **A)** Histogramas representativos de ciclo celular da linhagem celular HI60 após tratamentos com DMSO ou E6. **B)** Representação gráfica da quantificação de células distribuídas em cada fase do ciclo celular. Dados representativos de quatro experimentos independentes realizados em triplicata, apresentados como média \pm desvio padrão (** $p < 0,001$ em relação ao controle - DMSO).

Após 48 horas, o perfil foi praticamente idêntico nas duas concentrações testadas. Houve aumento significativo da região sub-G1 e redução na população de células em todas as outras fases do ciclo celular (**Figura 13**).

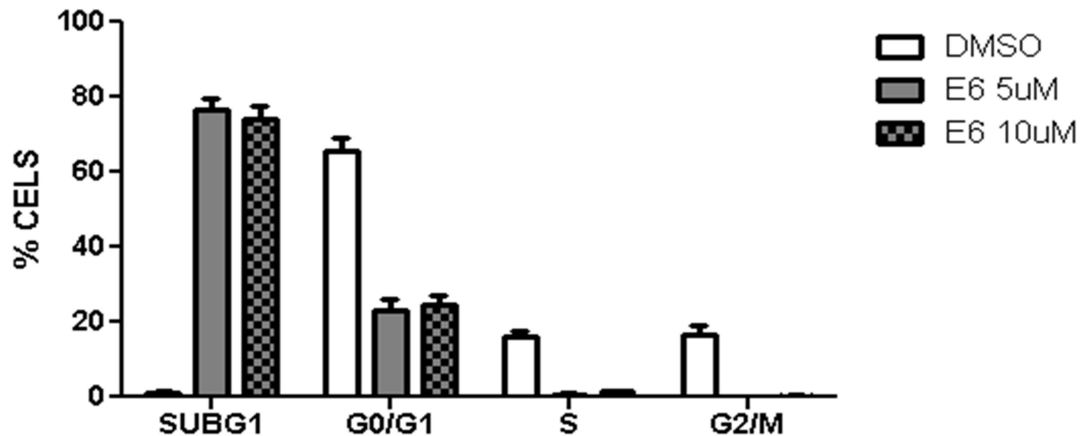


Figura 13 - Efeitos da substância E6 sobre o ciclo celular da linhagem HL60 após 48 horas de tratamento. As células HL60 foram incubadas por 48 horas sem tratamento (controle negativo) ou com o E6 5 e 10 µM, posteriormente as células foram coletadas e marcadas com PI e analisadas por citometria de fluxo. Representação gráfica da quantificação de células distribuídas em cada fase do ciclo celular. Dados representativos de quatro experimentos independentes realizados em triplicata, apresentados como média ± desvio padrão.

5.6 Eletroforese e marcação com Hoechst 33342 do DNA celular de células HL60 após tratamento com EBAC e E6.

Os resultados da análise de ciclo celular por citometria de fluxo demonstraram que EBAC e E6 induziram aumento da população de células em sub-G1. O núcleo de uma célula apoptótica é marcado por intensa condensação da cromatina e fragmentação de DNA em padrão de escada ou em 200 bp (BUNEL et al., 2014). Para se avaliar essas características típicas, foi feita a marcação dos núcleos com Hoechst 33342 e visualização por microscopia de fluorescência e eletroforese de DNA em gel de agarose.

As imagens dos núcleos das células HL60 após tratamento com EBAC 40 µM por 6, 24 e 48 horas (**Figura 14**) são representativas de três experimentos independentes realizados em triplicata. É possível observar que o aumento do tempo de tratamento provocou aumento da quantidade de núcleos com cromatina

condensada e/ou núcleo com partículas (fragmentado). Na mesma figura, também foi possível observar que no campo do controle (DMSO, 0.05%) há predominância de células com poucas alterações nucleares (núcleos corados em azul e aspecto homogêneo).

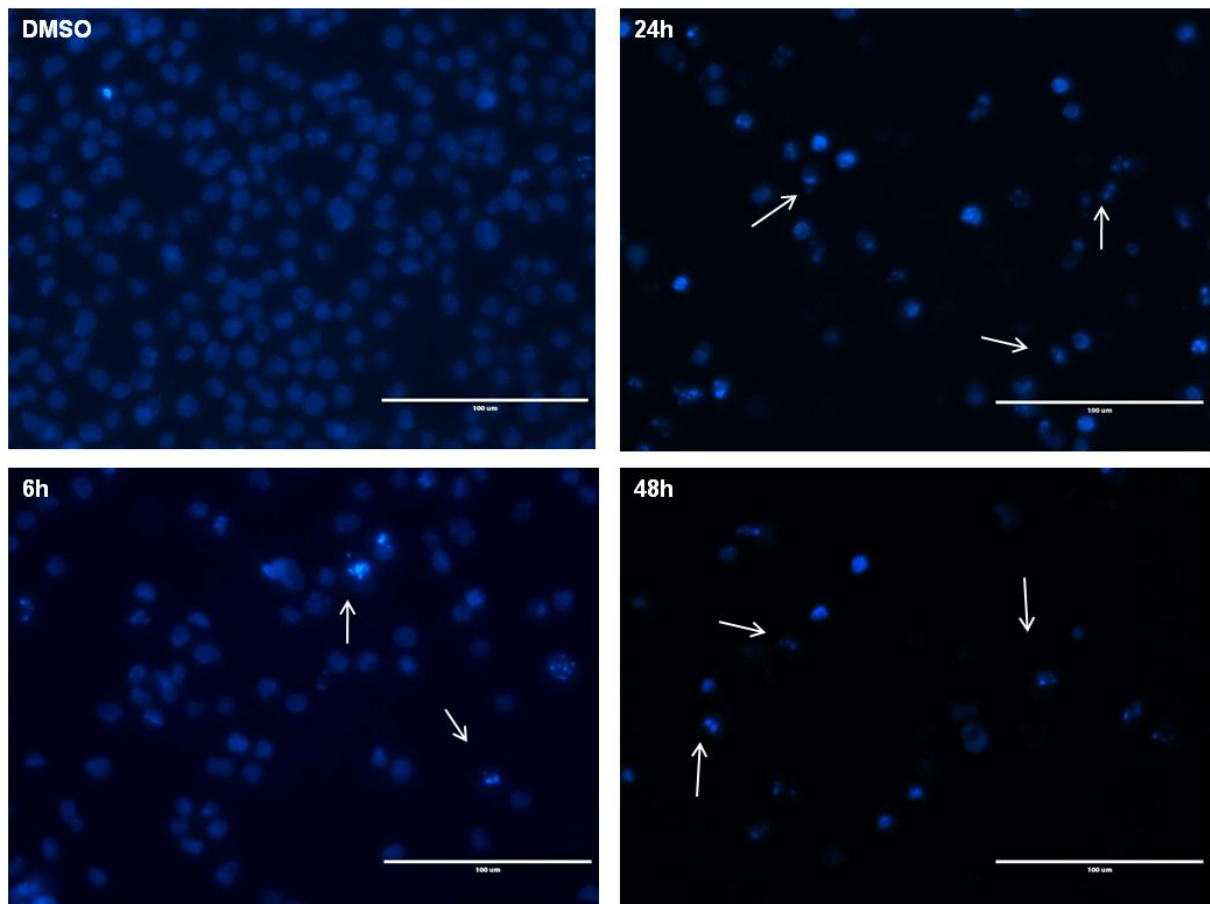


Figura 14 - Análise da morfologia nuclear das células HL60 tratadas com o nitrocomposto EBAC. Células HL60 foram tratadas com EBAC 40µM por 6, 24 e 48 horas e posteriormente marcadas com Hoechst 33342. Setas indicam núcleos condensados ou fragmentados. Imagens representativas de três experimentos realizados independentemente. Todas as imagens estão em aumento de 400 vezes.

Células HL60 também foram tratadas durante 6, 24 e 48 horas com E6 10 µM e coradas com Hoechst 33342. As análises qualitativas das imagens de três experimentos independentes mostram o aparecimento de núcleos condensados após 6 horas de tratamento. Após 24 e 48 horas, é possível observar pelas setas a condensação e os núcleos em partículas ou fragmentados (**Figura 15**).

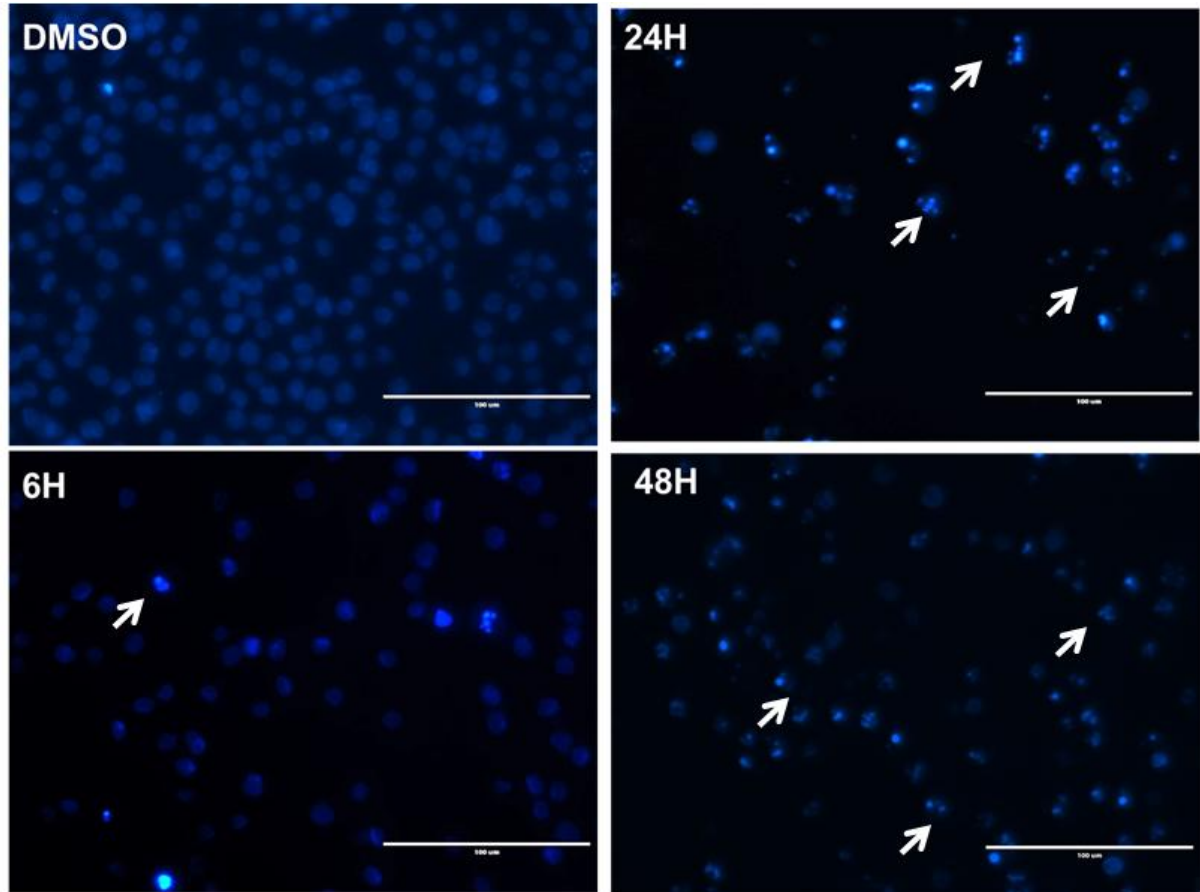


Figura 15 - Análise da morfologia nuclear das células HL60 tratadas com a hidrazona E6. Células HL60 foram tratadas com E6 10µM por 6, 24 e 48 horas e posteriormente marcadas com Hoechst 33342. Setas indicam núcleos condensados ou fragmentados. Imagens representativas de três experimentos realizados independentemente. Aumento de 400 vezes.

A **Figura 16** apresenta o resultado da eletroforese em gel de agarose após extração do DNA das células tratadas por 24 horas com as substâncias a serem testadas. É possível observar que o perfil provocado por EBAC e E6 é parecido com o perfil do padrão com repetições de 200 pb do controle positivo de Etoposídeo 40 µM. Esse perfil é conhecido como “padrão em escada” ou *ladder*. É importante frisar que o controle de DMSO não apresenta nenhum traço de fragmentação.

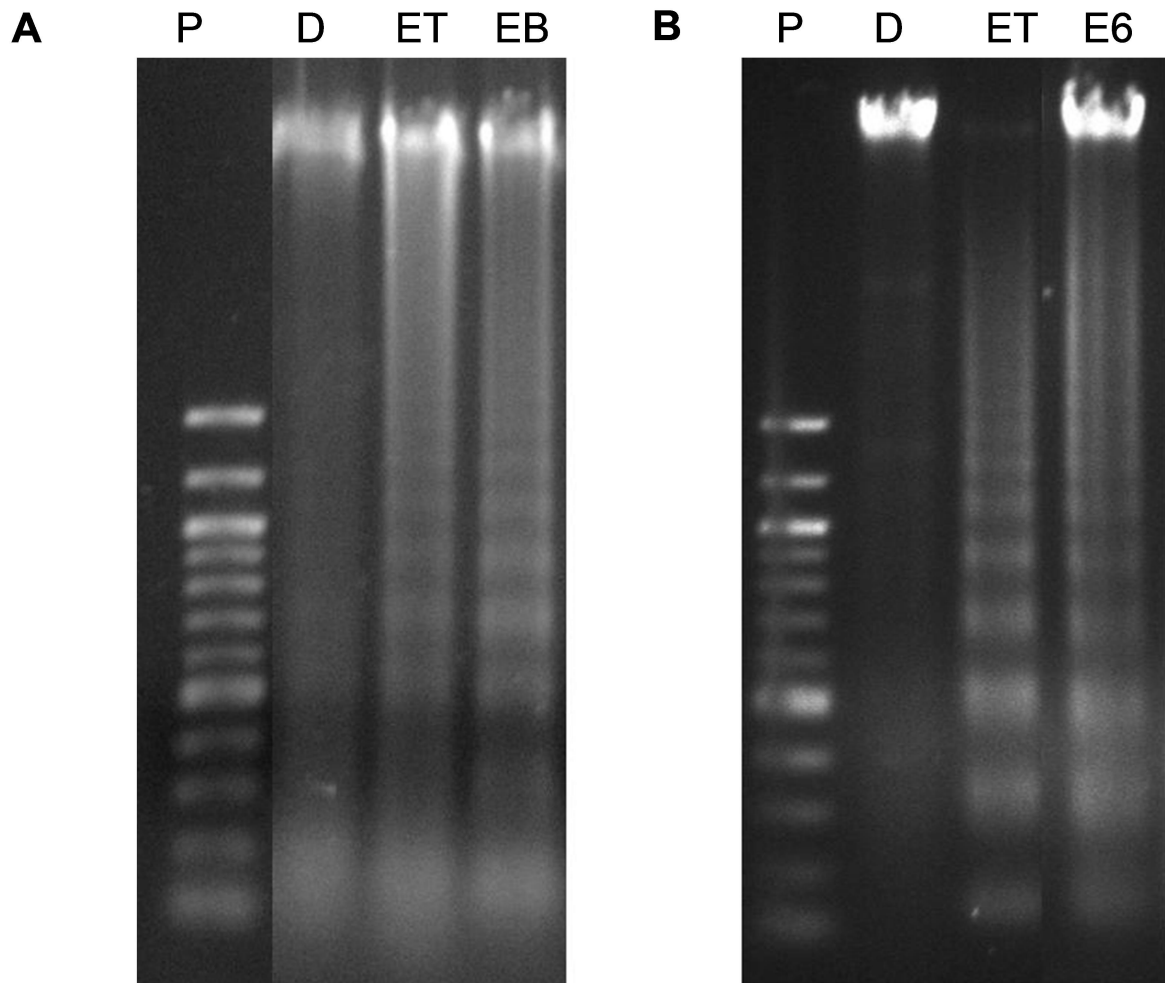


Figura 16 – Eletroforese de DNA das células HL60 tratadas com EBAC e E6. Células HL60 foram tratadas com as substâncias EBAC e E6 por 24 horas. Após extração do DNA, cerca de 2 µg de DNA foram colocados por canaleta e então submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%. **A)** Perfil de fragmentação do P - padrão de 200bp, D - DMSO, ET - etoposídeo e EB - EBAC (40 µM) respectivamente. **B)** Perfil de fragmentação do P - padrão de 200bp, D - DMSO, ET - etoposídeo e E6 (10 µM) respectivamente.

5.7 Avaliação da exposição de fosfatidilserina e marcação de DNA com iodeto de propídeo em células HL60 por citometria de fluxo

Uma vez que a citotoxicidade induzida pelas substâncias em células HL60 está associada à fragmentação de DNA, foi realizado um ensaio de marcação com Anexina-V conjugada ao fluorocromo FITC que tem uma forte afinidade e seletividade pela fosfatidilserina, que é um fosfolípídeo presente na face interior da membrana plasmática em células normais e quando entram em apoptose passam a expor a fosfatidilserina (PS) (GALLUZZI et al., 2009). Simultaneamente foi realizada

a marcação com PI que cora o DNA de células que perderam a integridade da membrana.

Os resultados foram interpretados em quatro quadrantes: células no quadrante inferior esquerdo (Anexina V-/PI-) foram consideradas como células viáveis; células no quadrante inferior direito (Anexina V+/PI-) foram consideradas em apoptose precoce; células no quadrante superior direito (Anexina V+/PI+) foram consideradas células em apoptose tardia e células no quadrante superior esquerdo (Anexina V -/PI+) foram consideradas células necróticas ou apoptose muito tardia.

O ensaio foi realizado após 3 e 24 horas de tratamento com EBAC (40 μ M) e E6 (10 μ M). Os dados apresentados na **Figura 17** mostram que houve um significativo da quantidade de células marcadas Anexina V+/ PI- após 3 horas de tratamento com EBAC e E6. A população em apoptose precoce após tratamento com EBAC foi igual a $5,657 \pm 2,449\%$ e a porcentagem das células após tratamento com E6 foi igual a $3,243 \pm 1,146 \%$. O tratamento com EBAC, ao contrário de E6, também provocou aumento das células duplamente marcadas ($6,245 \pm 1,989\%$) indicando que em três horas já haviam células em apoptose tardia/necrose. Estes resultados indicam que as células HL60 tratadas com EBAC entram em processo de apoptose após três horas, uma vez que elas já apresentam exposição de fosfatidilserina (PS).

Após 24 horas de tratamento, houve aumento significativo nas porcentagens de células duplamente marcadas (Anexina V+/ PI+), marcadas com PI (Anexina-/PI+) e com anexina V (Anexina V+/ PI-) após tratamento com etoposídeo, EBAC e E6.

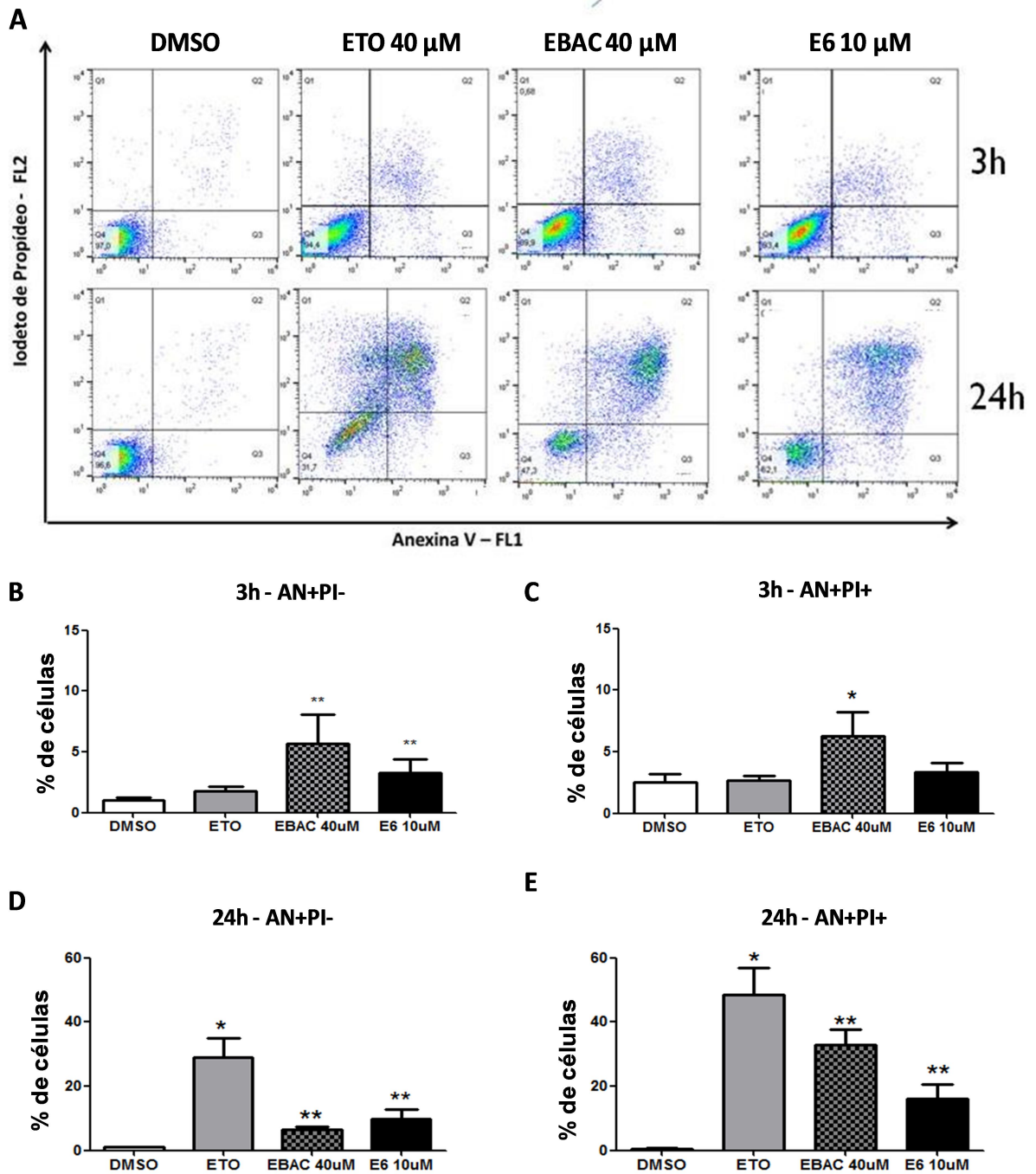


Figura 17 - Avaliação da morte celular, através da marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de propideo (PI) por citometria de fluxo. Células HL60 tratadas por 3 e 24 horas com DMSO, etoposídeo 40 μ M, EBAC 40 μ M e E6 10 μ M foram marcadas com anexina V e PI e analisadas por citometria de fluxo. **A)** Gráficos *dot-plots* representativos gerados em citômetro FACSCan. **B)** Representação gráfica da população das células marcadas somente com Anexina V após 3 horas de tratamento. **C)** Representação gráfica da quantificação das células duplamente marcadas após 3 horas de tratamento. **D)** Representação gráfica da população das células marcadas somente com Anexina V após 24 horas de tratamento. **E)** Representação gráfica da quantificação das células duplamente marcadas após 24 horas de tratamento. Todos os gráficos são representativos com média \pm desvio padrão de, no mínimo, dois experimentos independentes realizados em duplicata. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ versus o grupo controle - DMSO).

5.8 Avaliação da associação da ativação de caspases na fragmentação de DNA induzida pelo tratamento com EBAC e E6 em células HL60.

Além da exposição de fosfatidilserina, outra característica importante da apoptose é a ativação de caspases. Por isso, avaliou-se o efeito do bloqueio geral das caspases na fragmentação de DNA. Células HL60 foram pré-incubadas com um inibidor geral de caspases Z-VAD-FMK e posteriormente tratadas por 24 horas com EBAC 40 μ Me o conteúdo de DNA mensurado por citometria de fluxo.

Como demonstrado na **Figura 18**, o tratamento com o inibidor reduziu significativamente a quantidade de células em sub-G1 após tratamento com etoposídeo (controle positivo para apoptose), indicando que Z-VAD-FMK foi capaz de inibir as caspases e conseqüentemente a fragmentação de DNA induzida por esa substância. Da mesma forma, o pré-tratamento com Z-VAD-FMK provocou diminuição na quantidade de DNA fragmentado após tratamento com EBAC e E6. Esse resultado indica que a fragmentação de DNA está diretamente relacionada com a participação e ativação de caspases.

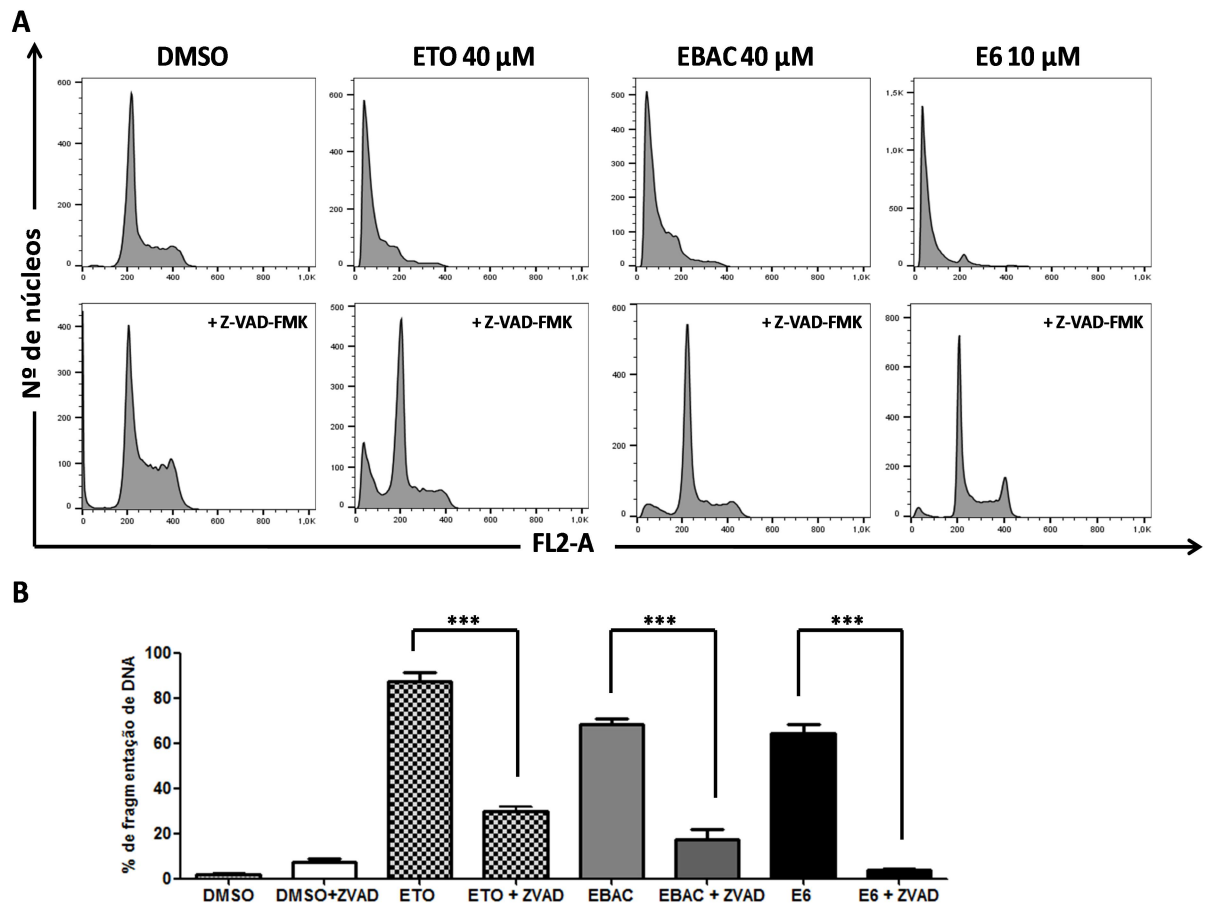


Figura 18 - Inibição da fragmentação de DNA induzida por EBAC por Z-VAD-FMK em células HL60. Células HL60 foram pré-incubadas com Z-VAD-FMK e posteriormente tratadas com etoposídeo (40 µM), EBAC (40 µM) e E6 (10 µM) por 24h e avaliadas por citometria de fluxo. **A)** Imagens representativas das análises do ciclo celular realizado no *software* Flowjo 7.6.5. **B)** Análise das porcentagens do conteúdo de DNA subdiploide representados como média ± desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata (**p < 0,001 versus o grupo sem a presença de Z-VAD-FMK).

5.9 Avaliação da ativação de caspase-3 em células HL60 induzida pela substância EBAC e E6.

Como a fragmentação de DNA foi inibida com o bloqueador Z-VAD-FMK, investigou-se a ativação de caspase - 3 (caspase efetora de morte por apoptose). Caspase -3. é frequentemente ativada após sinalização das caspases iniciadoras, sendo essencial no processo de formação de corpos apoptóticos e de outras características morfológicas típicas associadas à apoptose (TAYLOR; CULLEN; MARTIN, 2008). A quantificação da ativação de caspase -3 foi feita após marcação das células com anti-caspase-3 conjugado ao fluorocromo FITC e mensuradas em

citometria de fluxo. Os resultados apresentados na **figura 19** mostram que o tratamento com EBAC e E6 por 3 horas aumentou significativamente a ativação de caspase -3 em células HL60 quando comparadas ao controle DMSO. O perfil provocado pelo controle positivo de etoposídeo foi parecido com o perfil provocado por EBAC.

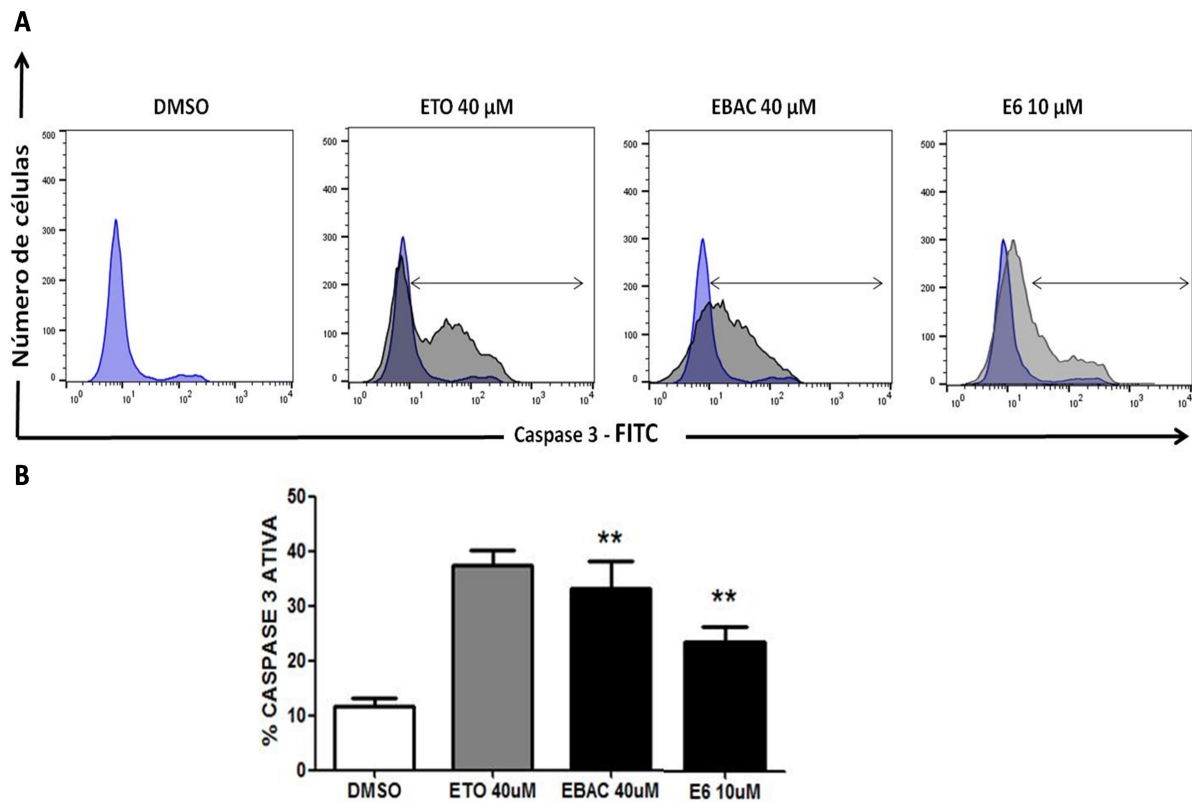


Figura 19 - Efeito de EBAC e E6 na ativação de caspase -3 em células HL60. Células HL60 foram tratadas durante 3 horas com DMSO, etoposídeo (40 μ M), EBAC (40 μ M) ou E6 (10 μ M) e então marcadas com anti-caspase-3 ativa-FITC e analisadas por citometria de fluxo. **A)** Histogramas representativos do aumento da intensidade de fluorescência para FITC por número de células. **B)** Representação gráfica da quantidade de células que apresentam caspase -3 ativa. Dados representativos da média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata (** $p < 0,001$).

5.10 Avaliação da ativação das caspases -8 e -9 em células HL60 após tratamento com EBAC e E6.

Este ensaio foi realizado com o intuito de verificar o efeito das substâncias na clivagem de substratos da caspase -8 e -9, evento que distingue a morte celular apoptótica associada às caspases em via intrínseca e via extrínseca. A clivagem do

substrato específico associado ao cromóforo (LEHD-pNA pela caspase -9 e IETD-pNA pela caspase -8) ocasiona a liberação do cromóforo, produzindo coloração passível de quantificação por espectrofotometria, uma vez que as absorvâncias medidas são diretamente proporcionais à atividade enzimática.

Conforme representado na **Figura 20**, o tratamento das células HL60 com EBAC e E6 provocou ativação de caspase -9. Em relação à caspase -8, não houve aumento significativo dos valores de absorvância comparado ao controle de DMSO.

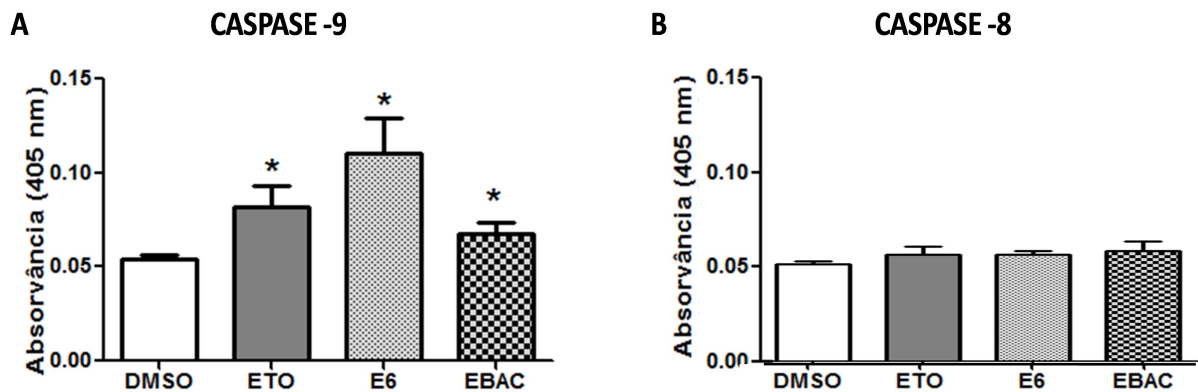


Figura 20 - Avaliação da ativação da caspase -8 e -9 por clivagem do substrato específico. As células HL60 foram incubadas por 3 h sem tratamento (controle negativo), etoposídeo (50 μ M), E6 (10 μ M) ou EBAC (40 μ M). **A)** Resultados referentes à ativação de caspase -9. **B)** Resultados referentes à ativação de caspase -8. A análise espectrofotométrica foi realizada a 405 nm. As barras representam a média+desvio padrão de, no mínimo, três experimentos independentes realizados em duplicata (* $p < 0,05$ em relação ao controle).

5.11 Alterações no potencial de membrana mitocondrial após tratamento com EBAC em células HL60.

Perda de potencial de membrana mitocondrial (PMM) é outra característica importante para se avaliar via intrínseca da apoptose e está relacionada à ativação de caspase -9. Para avaliar alterações no PMM, foi utilizado a sonda DiIC1 (5), que penetra no citoplasma de células eucarióticas e se acumula primariamente em mitocôndrias com potenciais de membrana ativos. A intensidade de fluorescência emitida pelo DiIC1(5) diminui quando as células são tratadas com reagentes que rompem o potencial de membrana mitocondrial, como o CCCP (controle positivo).

A curva que representa o tratamento com EBAC e E6 está colorida de preto na **Figura 21**; as curvas de DMSO e CCCP estão representadas pelas cores azul e vermelha, respectivamente. A porcentagem de células com perda de PMM foi calculada com base na quantidade de células que emitiram fluorescência menor que a do controle DMSO. O tratamento com EBAC provocou $43,70 \pm 2,911 \%$ e o tratamento com E6 provocou $38,28 \pm 3,537\%$ das células com perda de PMM.

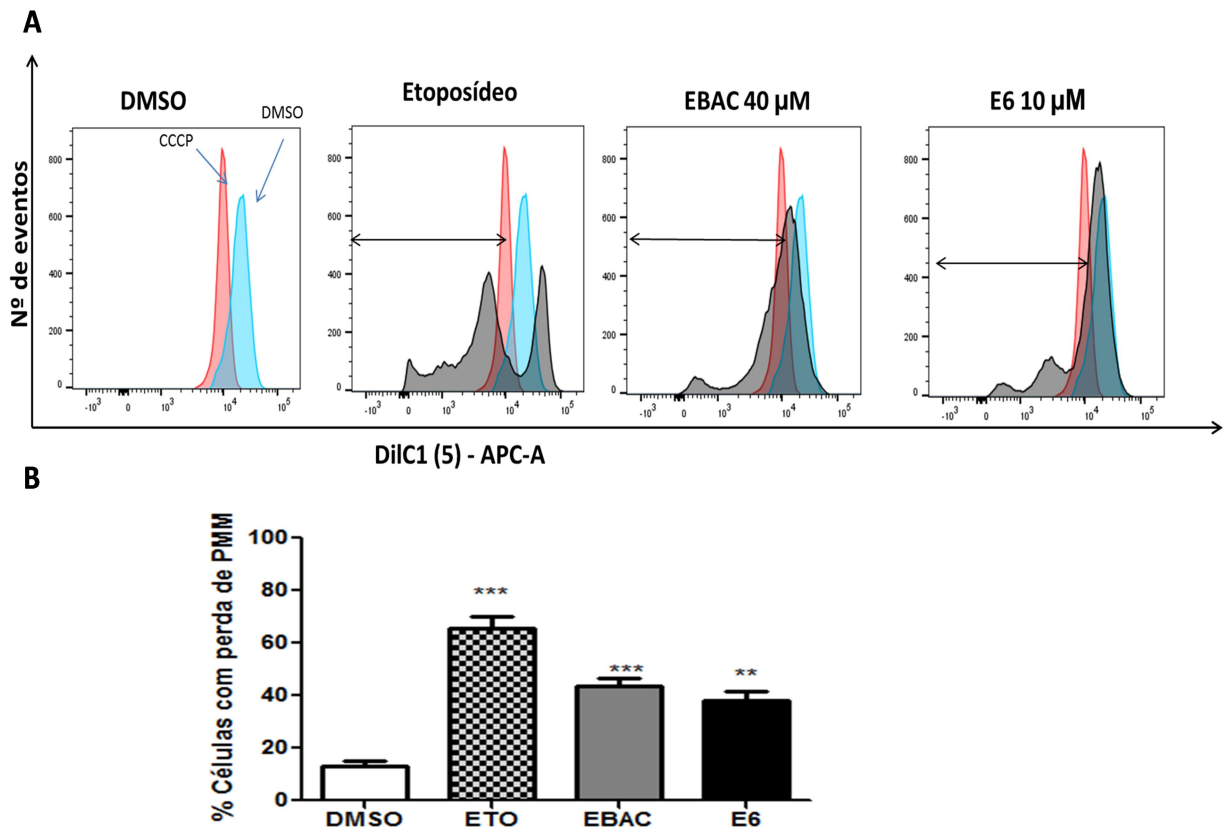


Figura 21 - Diminuição do potencial de membrana mitocondrial de células HL60 tratadas com EBAC e E6. Células HL60 foram tratadas por 3 horas com DMSO, etoposídeo, EBAC ou E6, posteriormente marcadas com DiIC1(5) e então analisadas por citometria de fluxo. **A)** Histogramas representativos da intensidade de fluorescência após tratamento com CCCP (vermelho), DMSO (azul), etoposídeo (50 µM), EBAC 40 µM e E6 10 µM (preto). **B)** Representação gráfica das células HL60 que apresentam diminuição de PMM. Resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Valores significativamente diferentes do controle de DMSO (** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$).

5.12 Avaliação da geração de espécies reativas de oxigênio após tratamento com EBAC e E6 em células HL60.

Espécies reativas de oxigênio (EROS) são importantes moléculas sinalizadoras, e tem sido reportado como tendo um importante papel nos

mecanismos de morte em células tumorais, incluindo morte por apoptose com ativação de caspases (SANCHEZ et al., 2010). Para a quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), utilizou-se por citometria de fluxo a sonda DCFH-DA em células HL60 tratadas com EBAC 40 μ M durante 1, 3 e 6 horas. A atividade de esterases celulares clivam DCFH-DA em DCFH2 (2V-7V-Dichlorodihydrofluorescein diacetate). Peroxidases, citocromo C e Fe²⁺ na presença de peróxido de hidrogênio oxidam DCFH2 a DCF (2V-7V-dichlorodihydrofluorescein) que é um composto fluorescente.

Os resultados apresentados na **Figura 22** mostram que o tratamento de células HL60 com EBAC (40 μ M) aumentou significativamente a geração de espécies reativas de oxigênio após 3 e 6 horas de tratamento. O aumento produzido após 1 hora de tratamento não foi significativo estatisticamente. Etoposídeo não induziu aumento de EROs significativamente maior que DMSO em nenhum dos intervalos de tempo avaliados (dados não mostrados).

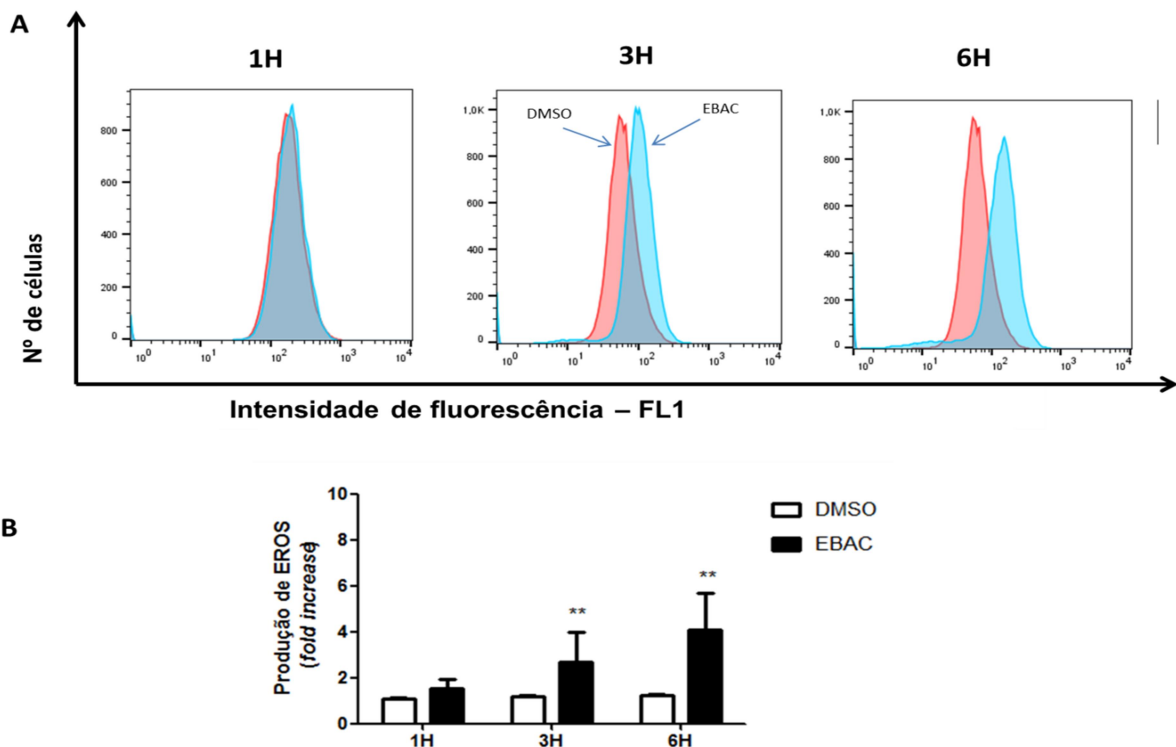


Figura 22 - Alteração nos níveis de espécies reativas de oxigênio em células HL60 tratadas com EBAC. Células HL60 foram tratadas com DMSO e EBAC (40 μ M) por 1, 3 e 6 horas e marcadas com DCFH-DA. A quantidade de fluorescência foi analisada em citômetro de fluxo FACSCAn. **A)** Histogramas representativos do aumento da intensidade de fluorescência FL1 após 1, 3 e 6 horas de tratamento. **B)** Representação gráfica do aumento da produção da EROS. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão (**p < 0,01 em relação ao controle de DMSO).

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) foi avaliada após o tratamento de células HL60 com E6 (10 μ M) por 1, 3 e 6 horas (**Figura 23**). O tratamento com E6 induziu formação de EROS após 1 hora de tratamento. Após 3 e 6 horas não houve aumento significativo da formação dessas espécies.

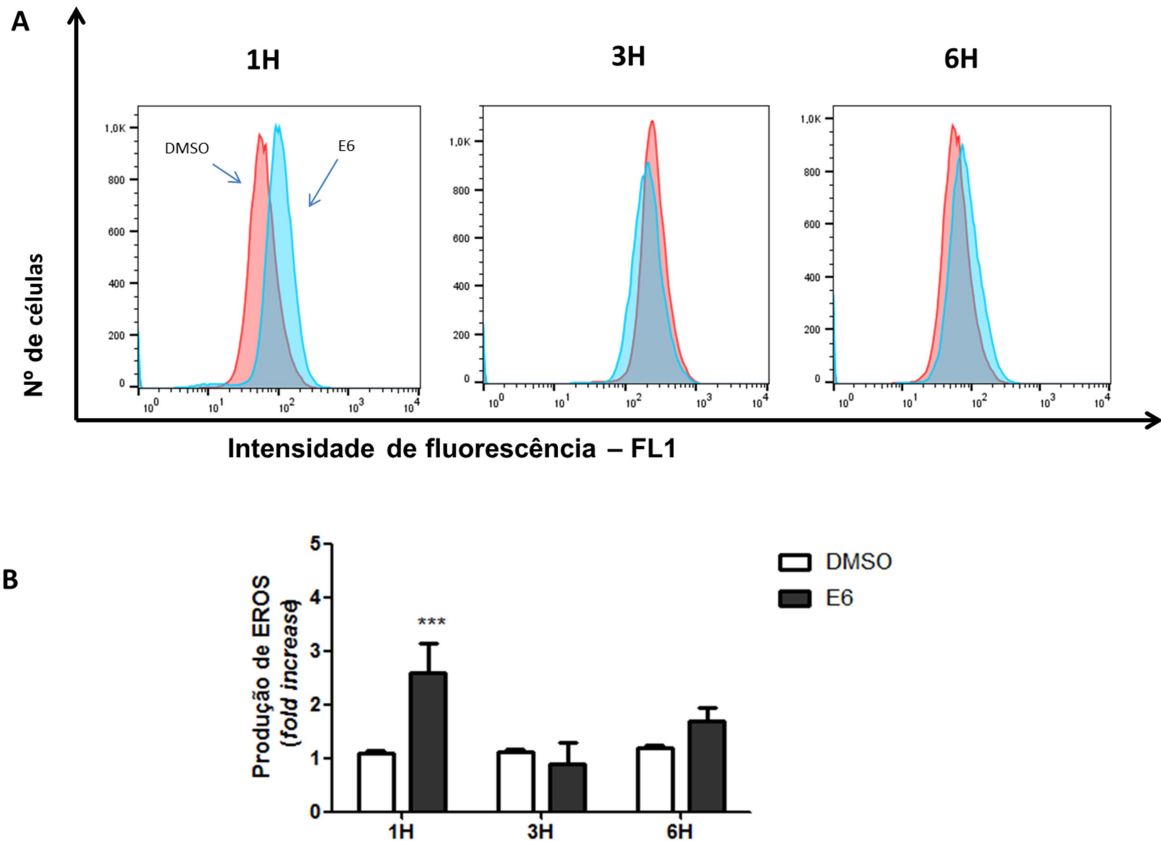


Figura 23 - Alteração nos níveis de espécies reativas de oxigênio em células HL60 tratadas com E6 em células HL60. Células HL60 foram tratadas com E6 10 μ M e etoposídeo por 1, 3 e 6 horas e marcadas com DCFH-DA. A quantidade de fluorescência foi analisada em citômetro de fluxo FACSCan. **A)** Histogramas representativos do aumento da intensidade de fluorescência. **B)** Quantificação do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio está representada como média \pm desvio padrão. (***) $p < 0,001$ em relação ao controle de DMSO)

5.13 Avaliação da indução de autofagia por EBAC em células HL60.

O potencial de induzir autofagia foi avaliado após o tratamento com EBAC 40 μ M em células HL60 tratadas durante 24 horas. O corante alaranjado de acridina é capaz de atravessar a membrana da célula e quando presente no citoplasma emite luz verde, mas em regiões de pH ácido é reduzido e emite luz alaranjada. A emissão

de luz laranja indica a presença de vesículas autofágicas ácidas (AVOs), que estão relacionadas ao processo de autofagia (YOKOYAMA et al., 2008).

As células controle (DMSO) apresentaram $3,758 \pm 0,7546\%$ de vesículas autofágicas ácidas enquanto que as células HL60 tratadas com EBAC $40 \mu\text{M}$ apresentaram $15,91 \pm 4,919 \%$. O aumento da quantidade de AVOs se relaciona de forma diretamente proporcional ao aumento de emissão de fluorescência FL3. Houve, portanto, aumento significativo de vesículas autofágicas (**Figura 24**). Para confirmação desses resultados, foi realizado o mesmo experimento utilizando previamente o inibidor de autofagia Bafilomicina A1 (10nM). A utilização deste inibidor praticamente aboliu a formação de AVOs.

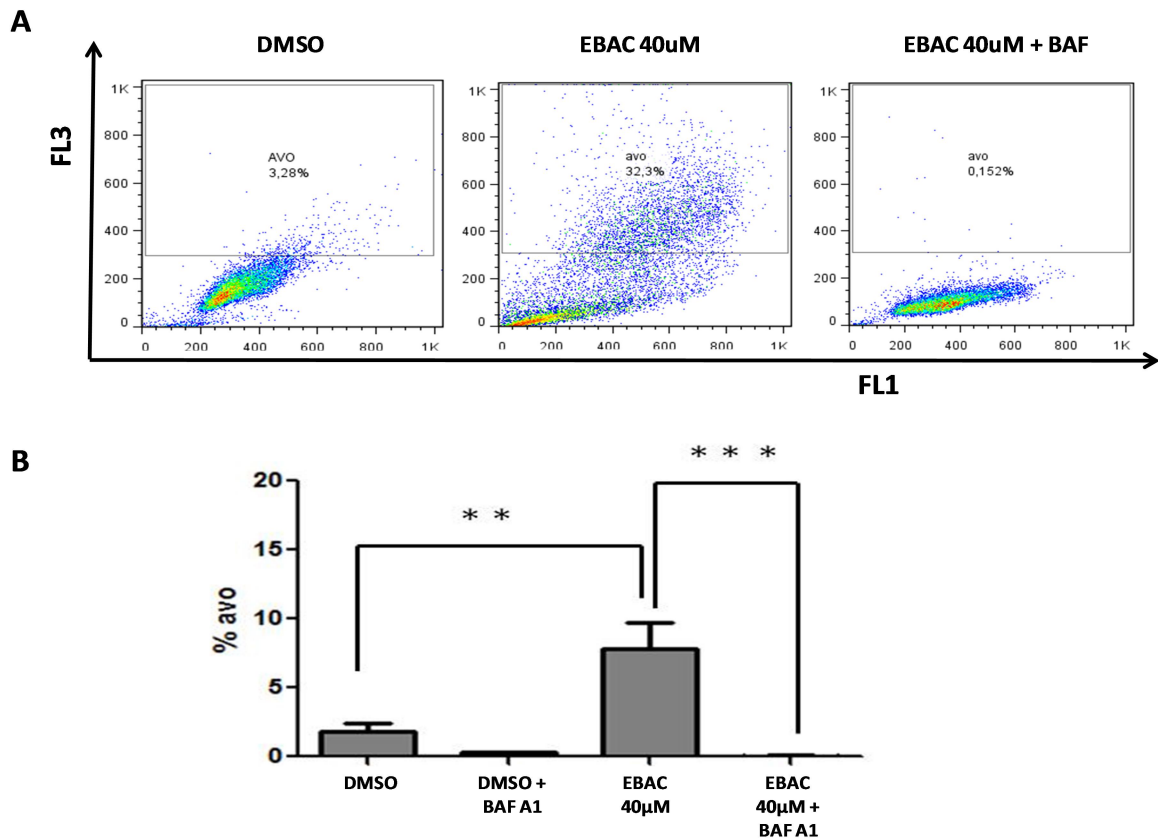


Figura 24 - Marcação dos agregados ácidos com alaranjado de acridina em células autofágicas. Células HL60 foram tratadas com EBAC ($40 \mu\text{M}$) por 24 h e as vesículas autofágicas ácidas após marcação com alaranjado de acridina foram analisadas por citometria de fluxo. **A**) Histogramas representativos do efeito dos tratamentos na intensidade de fluorescência (FL1). **B**) Gráficos representativos da quantidade de células emitindo fluorescência FL3 (produção de AVOs). Resultados referentes a quatro experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como média \pm desvio padrão (** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$).

5.14 Avaliação da utilização do bloqueador de autofagia Bafilomicina A1 na progressão do ciclo celular após tratamento por EBAC em células HL60.

Foi demonstrado no experimento utilizando alaranjado de acridina, que o tratamento com EBAC é capaz de aumentar a formação de vesículas autofágicas. Para entender o papel que a autofagia tem no mecanismo de morte, utilizou-se o mesmo inibidor Bafilomicina A1 juntamente com EBAC (40 μM) na avaliação da população na região sub-G1. Os resultados apresentados na **Figura 25** demonstram que a utilização do inibidor de autofagia foi capaz de reduzir a população em sub-G1 e aumentar a população em G0/G1 quando comparado com o tratamento somente com EBAC.

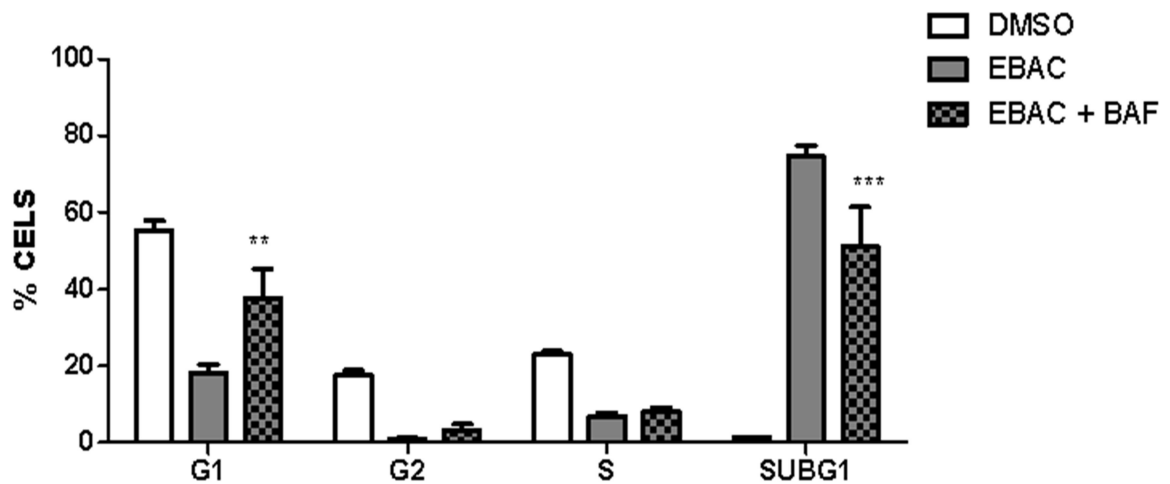


Figura 25 - Inibição da fragmentação de DNA induzida por EBAC após utilização de Bafilomicina A1 em células HL60. As células foram tratadas com Bafilomicina A1 (10 nM) juntamente com EBAC (40 μM) por 24h. Gráfico representativo das porcentagens de células em diferentes fases do ciclo celular e no conteúdo de DNA subdiploide. Os resultados foram representados como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus o grupo EBAC).

5.15 Resumo esquemático dos resultados obtidos em células HL60 após tratamento com EBAC e E6

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-CLONOGÊNICO

- ✓ Ensaio de formação de colônias.
- ✓ Determinação de IC50 em soft-ágar (3D).

AVALIAÇÃO DE SELETIVIDADE

- ✓ Determinação da IC50 em células PBMC.

IDENTIFICAÇÃO DO TIPO DE MORTE CELULAR

- ✓ Alterações morfológicas em células HL60 fotografadas em microscopia de campo claro.
- ✓ Liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH).

AVALIAÇÃO DE APOPTOSE

- ✓ Fragmentação de DNA – ciclo celular, eletroforese de DNA e marcação dos núcleos com Hoechst 33342.
- ✓ Exposição de fosfatidilserina por meio da marcação com Anexina V e PI.
- ✓ Ativação de caspases -3, -8 e -9
- ✓ Perda de potencial de membrana mitocondrial
- ✓ Formação de espécies reativas de oxigênio

AVALIAÇÃO DE AUTOFAGIA

- ✓ Marcação de vacúolos acídicos com alaranjado de acridina.
- ✓ Uso de Bafilomicina A1 no ciclo celular.

6 DISCUSSÃO

Nosso estudo investigou os efeitos *in vitro* de duas substâncias, EBAC (nitrocomposto) e E6 (hidrazona) no crescimento celular, toxicidade, morfologia e ciclo celular em células de leucemia promielocítica de sangue periférico (HL60), bem como ensaios para determinação do mecanismo de morte induzido por estas duas moléculas, principalmente avaliação de apoptose. Nas últimas décadas tem sido grande o investimento e busca por novos fármacos antitumorais, principalmente objetivando terapias mais eficazes para os diferentes tipos de câncer. Uma estratégia bastante conhecida e eficiente é a indução de apoptose (FESIK, 2005). Entretanto, nas últimas décadas, estudos têm mostrado a indução e inibição de autofagia como uma nova oportunidade na busca por novos fármacos antitumorais (LIU et al., 2013a).

Um candidato à fármaco antitumoral deve apresentar efeitos interessantes em células tumorais, dentre eles a indução da perda de potencial clonogênico dessas células. Para tanto, foi realizado a determinação da IC50 em soft-ágar e o ensaio de contagem de colônias. Células cultivadas em soft-ágar criam uma colônia tridimensional que é mais similar ao microambiente tumoral *in vivo* e mimetiza condições ambientais relevantes (ANDERSON et al., 2007). Esse modelo também permite avaliar a habilidade das células tumorais continuarem vivas independentemente de ancoragem e ajuda a prever a formação de metástase *in vivo* (NAGASHIMA et al., 2011). O ensaio de contagem de colônias permite avaliar a habilidade de cada célula se dividir ilimitadamente após exposição ao tratamento, pois nesse ensaio cada colônia veio virtualmente de uma única célula (BUNEL et al., 2014). Portanto, no processo de descoberta de fármacos, estes modelos favorecem a identificação de drogas antitumorais mais promissoras e com capacidade curativa.

No ensaio 3D, EBAC e E6 promoveram redução dos valores de IC50 em soft-ágar em relação ao modelo 2D. Como o crescimento de células tumorais em soft-ágar é um sinal de agressividade do tipo de tumor, o aumento da atividade nesse modelo pode indicar uma atividade curativa em potencial dessas substâncias.

A substância EBAC, que age como uma pró-droga do ácido butírico, provocou uma diminuição de 2 x do valor de IC50 em soft-ágar. Esse resultado corrobora com o trabalho de NUDELMAN e colaboradores (1992), que descreveram os efeitos antitumorais de outras pró-drogas em diversas linhagens tumorais com redução da atividade clonogênica e dos valores de IC50 em soft-ágar. A hidrazona E6 quando testada em células MCF-7 e HCT-116 cultivadas em soft-ágar apresentou ganho de atividade de 15 e 68 vezes, respectivamente (**Tabela 1**). Outra hidrazona (H2AcpNO2Ph - 2-acetylpyridine phenylhydrazone-para-nitro-phenyl) de estrutura química bastante parecida com a E6 (H2BzpCLPh) apresentou valor de IC50 próximo ao encontrado neste trabalho, entretanto o aumento de atividade em relação ao ambiente 3D foi de somente 3,2x (FERREIRA et al., 2016).

Já no ensaio de contagem de colônias, diferentemente dos resultados apresentados pelo ensaio de viabilidade celular usando MTT, EBAC na respectiva IC50 reduziu mais de 50% a sobrevivência clonogênica e E6 reduziu mais de 80% a sobrevivência clonogênica das células MCF-7 e HCT-116 (**Figura 5**). A aparente diferença na potência da droga pode ser explicada devido à perda de aderência de algumas células ou devido ao fato que o ensaio com MTT tende a superestimar a quantidade de células viáveis (BUNEL et al., 2014). Os ensaios de viabilidade, como o MTT, não conseguem prever a sobrevivência das células tumorais após tratamentos com fármacos antitumorais, por isso, resultados entre ensaios clonogênicos e não-clonogênicos não podem ser substituídos. Esse ensaio também é importante porque para que haja cura do tumor, é necessário inativar as células clonogênicas através da indução de um estado de dormência ou matando efetivamente essas células (ZIPS; THAMES; BAUMANN, 2005).

Além do efeito anti-clonogênico, é essencial para uma substância com atividade antitumoral demonstrar seletividade em relação às células tumorais. Os dados de IC50 em linhagens tumorais e Vero das substâncias EBAC e E6 já haviam sido determinados em trabalhos anteriores (LOPES et al., 2015 e FERREIRA et al., 2016). No presente trabalho, foram realizados os experimentos para determinação de IC50 em células mononucleares de sangue periférico (PBMC). Em testes *in vitro*, a seletividade das substâncias é avaliada em testes preditivos utilizando-se linhagens celulares normais, como PBMC (DORATO; BUCKLEY, 2007). A baixa

seletividade é uma das causas dos efeitos tóxicos dos atuais fármacos antitumorais. Dessa forma, substâncias que possam ser citotóxicas diretamente para as células tumorais e apresentem menor efeito para as normais são boas candidatas para a continuidade da investigação do potencial antitumoral. A seletividade das substâncias foi comparada usando o cálculo de índice de seletividade (IS). O IS é utilizado como uma estratégia inicial e simples para determinar a utilidade de compostos e tem o propósito de reduzir os gastos com moléculas com características não desejáveis (MULLER; MILTON, 2012).

O índice de seletividade de EBAC em relação às células HL60 e PBMC foi igual a 6 (**Tabela 2**). EBAC pode ser considerada uma substância promissora, pois compostos que apresentam IS maior que 3 são considerados seletivos para as células tumorais (BADISA et al., 2009). Além disso, como a substância é seletiva, pode-se inferir que ela apresenta poucos efeitos tóxicos no sistema sanguíneo no ambiente *in vivo*. De fato, a substância EBAC vem sendo testada em animais na Faculdade de Farmácia (UFMG) pelo grupo da Prof^a Renata Barbosa que tem obtido dados promissores (LOPES et al., 2015). Atualmente têm-se estudado o uso de diferentes formulações para esta molécula.

Para a substância E6 os valores de IS em relação às células HL60 foi igual a 4 quando comparada com a IC50 em PBMC. DESPAIGNE e colaboradores (2012), que descreveram a síntese da E6 e outras hidrazonas, também encontrou valores altos (IS=28) quando essa substância foi testada em células U87 (linhagem de glioblastoma humano) e MRC5 (linhagem de fibroblastos pulmonares humano). Além disso, como ambas substâncias são sintéticas, pode-se trabalhar a estrutura-atividade com o propósito de aumentar a seletividade e/ou atividade.

O efeito citotóxico de EBAC e E6 também foi avaliado pelas alterações morfológicas por fotografia em campo claro e liberação de LDH. Os resultados apresentados (**Figuras 6 e 7**) mostram que após 6 horas de tratamento com EBAC e E6, uma parte das células HL60 apresenta características de apoptose, tais como alteração do formato das células, presença de fragmentos celulares e diminuição do tamanho e número das células (WLODKOWIC et al., 2011). Resultados semelhantes a esses foram observados em células U87 tratadas com E6 1 mM por 48 horas,

quando também se observou diminuição do volume celular, perda da morfologia tradicional das células e formação de debris celulares (DESPAIGNE et al., 2012).

Com o objetivo de analisar as mudanças morfométricas provocadas pelo tratamento com EBAC e E6, utilizaram-se os parâmetros FSH (tamanho) e SSC (granulosidade) da citometria de fluxo, que são utilizados de forma auxiliar na determinação do tipo de morte celular (WLODKOWIC et al., 2011). Segundo Carvalho e colaboradores (2015), a necrose celular é marcada por rápida perda de integridade de membrana com drástica redução tanto em FSC quanto em SSC; na apoptose, ao contrário, observa-se aumento da granulosidade e diminuição de tamanho, principalmente devido à formação de corpos apoptóticos. Tratamento com EBAC 40 μM (**Figura 8**) e E6 10 μM (dados não mostrados) apresentou características consistentes com a morte celular por apoptose. Apesar de já ser conhecido o efeito de diferenciação celular provocada pelo ácido butírico, Zimra et al. (1997) demonstraram que mudanças morfológicas parecidas com as encontradas neste trabalho em células HL60 estavam associadas à morte celular por apoptose.

A necrose é o mecanismo de morte que pode ser considerada "acidental", uma vez que a célula é impedida de manter seus processos vitais por lesões causadas por fatores externos, como agentes quimioterápicos. A necrose é marcada morfologicamente por um ganho de volume celular, inchaço das organelas, rompimento da membrana celular e consequente vazamento do conteúdo intracelular (KROEMER et al., 2009). Esta ruptura libera, no próprio tecido, o conteúdo celular que é rico em proteases e outras substâncias tóxicas, que atraem células do sistema imune causando intensa reação inflamatória (NIKOLETOPOULOU ET AL, 2013).

Outra avaliação do processo de necrose realizada foi o ensaio de quantificação da enzima LDH. Esse método se baseia no fato que as células com danos na membrana plasmática liberam para o meio extracelular a enzima LDH, que reduz o NAD a NADH e esse último converte um substrato colorimétrico que tem sua intensidade de cor mensurada por espectrofotômetro (RACHER; LOOBY; GRIFFITHS, 1990). Triton X-100 é um conhecido controle positivo para necrose por provocar lise celular e liberação de altos níveis de LDH após pouco tempo de

exposição (KEPP et al., 2011). Nesse ensaio, a liberação de LDH provocada pelo tratamento com Triton X-100 após três horas foi considerada como 100% de necrose primária (CHAN; MORIWAKI; DE ROSA, 2013). Após o mesmo o período de tratamento (3 horas), EBAC provocou $36,97 \pm 8,5\%$ e E6 $17,69 \pm 11,91\%$ das células com liberação de LDH, respectivamente (**Figura 9 e 10**). Como esses valores são bem menores que os provocados pelo Triton X-100, esse resultado podem ser considerado como consequência da citotoxicidade provocada por essas drogas e não devido à necrose primária (YANG et al., 2008 e HAJREZAIE et al., 2015). Essa análise permite a diferenciação somente nas fases iniciais do mecanismo de morte celular, pois em um ambiente *in vitro*, devido à falta de um sistema fagocitário, as células em apoptose tardia sucumbem à necrose secundária (KEPP et al., 2011).

Uma das características clássicas do câncer é a proliferação celular descontrolada (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Desta maneira, a capacidade de atuar no ciclo celular de tais células (efeito citostático ou citotóxico) é uma característica desejável para um potencial fármaco anticâncer. Para avaliação desse efeito foi realizado experimento em citometria de fluxo com marcação com iodeto de propídeo. As células HL60 foram tratadas por 24 e 48 horas com EBAC a 20 e 40 μM e E6 a 5 e 10 μM . Neste experimento, fragmentos de DNA emitem menos fluorescência que o DNA íntegro e ocupam a região de Sub-G1 no histograma populacional (GONG; TRAGANOS; DARZYNKIEWICZ, 1994). Portanto, a população em sub-G1 é indicativa de células com DNA com danos ou fragmentado. Nicoletti (1991) e Cheng (2012) e colaboradores admitem que a quantificação de DNA fragmentado pode ser interpretada como resultado da indução de morte celular devido à necrose ou apoptose.

Tratamento com EBAC nas duas concentrações testadas provocaram aumento significativo no percentual de células na região sub-G1 quando comparados com o controle, sendo esse perfil tempo e dose dependente (**Figura 11**). EBAC também interferiu de forma moderada no ciclo celular das células HL60. Observamos ainda, que EBAC a 20 μM aumentou a subpopulação de G2/M. Mecanismos moleculares de vários agentes anticâncer envolvem parada em alguma fase do ciclo celular (SALEH et al., 2015 e LIU et al., 2013b). Embora a maioria dos

compostos apresente este efeito seguido pela indução de morte celular por apoptose, o trabalho de Newman e colaboradores (2007) mostrou o efeito de uma substância que desencadeou morte celular por autofagia, acompanhada pelo bloqueio da fase G2/M do ciclo celular em células tumorais de pâncreas PANC-1. Apigenina também induziu parada no ciclo celular com posterior indução de autofagia em células TF-1 (RUELA-DE-SOUSA et al., 2010). Além disso, estudos já mostraram que autofagia é um processo de morte ativado em resposta a vários quimioterápicos (KROEMER et al., 2009).

Da mesma forma, a hidrazona E6 induziu significativamente a fragmentação de DNA de maneira concentração dependente em células HL60, já que a fragmentação de DNA foi significativamente maior na maior concentração (10 μ M) (**Figura 12**). Pelo histograma do ciclo celular, pode-se observar redução significativa do número de células nas fases S e G2/M e parada em G0/G1, principalmente na concentração de 5 μ M. A proporção de células em G0/G1 apesar de não ter aumentado em relação ao controle, se manteve alta mesmo quando utilizado a concentração de 10 μ M. Moléculas que bloqueiam o ciclo celular têm mostrado efeito citostático, o que é um efeito anticâncer interessante (MORLEY et al., 2007). A interrupção do ciclo celular com parada em G0/G1 é um dos principais objetivos de muitos fármacos anticancerígenos, tais como camptotecina, doxorubicina, cisplatina, 5-fluorouracilo (ALMEIDA et al., 2005).

A fragmentação de DNA provocada por EBAC e E6 foi confirmada pelas observações do perfil da eletroforese e a marcação com Hoechst 33342. DNA nuclear ao ser analisado por eletroforese indicou a formação de bandas em *ladder*, sugerindo a ativação de endonucleases que clivam o DNA em fragmentos de 200 pb após o tratamento com as duas substâncias (WLODKOWIC et al., 2011). Corroborando com esses resultados, ácido butírico a 1500 μ M após 48h de tratamento também induz fragmentação em *ladder* em células HL60 (ZIMRA et al. 1997).

A marcação com Hoechst 33342 permite avaliação da morfologia nuclear, como condensação de cromatina acompanhada de fragmentação nuclear e aparecimento de corpos apoptóticos através da microscopia de fluorescência. No

entanto, essa metodologia tende a ser muito subjetiva, pois para que a análise seja feita de maneira correta, o avaliador deve ser imparcial e possuir um conhecimento suficiente para diferenciar as morfologias celulares (LEITE et al., 1999), por isso esse resultado é complementar aos outros ensaios de fragmentação de DNA. Nas **Figuras 14 e 15**, é possível verificar que células após 6 horas de tratamento apresentavam condensação da cromatina e alguns núcleos já entrando em fragmentação. Após 24 e 48 horas de tratamento, a maioria dos núcleos das células HL60 se encontrava fragmentado. O perfil de fragmentação de DNA em “escada” e a visualização da maioria dos núcleos fragmentados após 24 horas de tratamento se correlacionam diretamente com o pico formado na região sub-G1.

A fragmentação de DNA é indicativa de apoptose, entretanto para que se comprove morte celular por esta via é necessário que não somente uma, mas várias características bioquímicas e morfológicas sejam encontradas (WLODKOWIC et al., 2011). Dentre elas estão: exposição de fosfatidilserina e ativação de caspases. Para avaliação de exposição de fosfatidilserina e integridade da membrana plasmática foi realizada marcação com Anexina V e PI. A exposição de PS é um evento precoce e a permeabilidade ao PI acontece mais tardiamente (BUNEL et al., 2014), por isso é importante o monitoramento precoce desses eventos. Células sem marcação foram consideradas vivas; células marcadas exclusivamente com anexina V foram consideradas em apoptose precoce e células duplamente marcadas foram consideradas em apoptose tardias ou necrose. Células somente coradas com PI apresentam membranas severamente danificadas e estão em estágios de necrose ou apoptose muito tardia (WLODKOWIC et al., 2011).

Neste estudo, foi observado que a partir de 3 horas de tratamento com EBAC parte significativa da população de células HL60 estava marcada com somente com anexina V, revelando células nas fases iniciais da apoptose (**Figura 17**). Percebe-se também que houve um aumento discreto em dupla marcada células (Anexina V + / PI +), revelando a presença de células que já estavam em apoptose tardia, mesmo após 24 horas de tratamento o resultado dessas populações é bastante parecido. Após 24 horas, houve também aumento da população marcada exclusivamente com PI, porém essa população provavelmente não é indicativa de necrose primária, pois não foi observado aumento após 3 horas tratamento. Células necróticas não se

tornam positivas com Anexina V antes de se tornarem positivas com PI (corante de exclusão) (KEPP et al., 2011).

A marcação com Anexina V e PI também foi feita depois de 3 e 24 horas de tratamento com a hidrazona E6. Após 3 horas, nenhuma das populações presentes em nenhum dos quadrantes estava diferente do controle. Após 24 horas, houve aumento no número de células marcadas exclusivamente com Anexina V e duplamente marcadas (Anexina V + / PI +), revelando a presença de células nas fases iniciais e tardias da apoptose (**Figura 17**).

Esses resultados mostram que o tratamento com EBAC (40 μ M) e E6 (10 μ M) em células HL60 induziu mudanças morfológicas e bioquímicas sugestivas de apoptose, entretanto existem dois mecanismos de indução deste tipo de morte celular e são denominados como apoptose clássica (dependente de ativação de caspases) e não-clássica (independente de caspases) (OKADA; MAK, 2004). As caspases são enzimas aspartato-específicas, que se encontram na forma de zimogênios inativos e são ativadas na ocorrência de apoptose. Para diferenciação das vias, utilizou-se o inibidor geral de caspases Z-VAD-FMK (SOUZA-FAGUNDES et al., 2003). A fragmentação de DNA das células HL60 induzida por EBAC e E6 envolve a ativação da via clássica ou dependente de caspase (NICHOLSON, 1996), já que houve diminuição da população em sub-G1 após o pré-tratamento com o inibidor Z-VAD-FMK (**Figura 18**).

Por conta da diminuição da fragmentação de DNA após inibição de caspases, foi avaliado também a ativação de caspase -3, -8 e -9. Caspase -3 é uma protease chave que é ativada durante as fases iniciais da apoptose por auto-proteólise e/ou clivagem por outras proteases (HENGARTNER, 2000). A **Figura 19** demonstra o aumento significativo da atividade de caspase -3 após tratamento com EBAC e E6 por três horas.

Entretanto a ativação de caspase -3 não faz distinção entre a via intrínseca e extrínseca da apoptose, já que caspase -3 pode ser ativada por ambas vias (TAYLOR; CULLEN; MARTIN, 2008). A via extrínseca ativa diretamente caspase -8 através de receptores de morte na superfície celular. A via intrínseca regula

cascatas apoptóticas pela sinalização da mitocôndria, o que resulta em liberação de citocromo C no citosol e a ativação de caspase-9. Pelo método de espectrofotometria, foi observado que os tratamentos com EBAC (40 μ M) e E6 (10 μ M) aumentaram a atividade da caspase -9, mas não de caspase -8 (**Figura 20**). Esse resultado nos fornece um indicativo de ativação da via intrínseca. O aumento da atividade de caspase -9 provocado pelo etoposídeo é compatível com o mecanismo de ação já descrito para esta droga (MONTECUCCO; ZANETTA; BIAMONTI, 2015).

Um evento que comumente está relacionado à ativação de caspase -9 é a perda do potencial da membrana mitocondrial (PMM), que é um evento precoce, transiente e tem papel-chave na decisão se a célula morre ou vive (BANJERDPONGCHAI; KHAW-ON, 2013). Células HL60 tratadas por três horas com EBAC 40 μ M e E6 10 μ M apresentaram diminuição do PMM em relação ao controle DMSO (**Figura 21**). A diminuição de PMM causa um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial e promove a liberação de substâncias pró-apoptóticas como citocromo C para o citoplasma (KEPP et al., 2011). A presença dessas substâncias liberadas leva principalmente à ativação das caspases como, por exemplo, caspase -9 e iniciação da via intrínseca (GALLUZZI et al., 2012 e KEPP et al., 2011).

Além da variação do PMM, foi realizada a avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Compostos citotóxicos geralmente interferem na homeostase celular e produzem EROs, que estão envolvidas em vários processos celulares como apoptose, necrose, proliferação celular e carcinogênese. A quantificação da produção de EROs após diferentes tempos de tratamento com EBAC e E6 foi realizada com utilização da sonda DCFH-DA, que é usada para mensurar a concentração de peróxido de hidrogênio e superóxido, subprodutos tóxicos do metabolismo celular (ERUSLANOV; KUSMARTSEV, 2010).

Os resultados mostraram que células HL60 tratadas com EBAC apresentaram aumento significativo da produção de espécies reativas de oxigênio após 3 e 6 horas (**Figura 22**). No caso da EBAC, a perda de PMM pode ter levado ao aumento da geração EROs. Além disso, o aumento da fluorescência do DCF encontrado pode

ser reflexo do aumento da quantidade de citocromo C no citoplasma (BURKITT; WARDMAN, 2001). O citocromo C forma no citoplasma um complexo com a APAF-1 e caspase-9 (apoptossomo), que promove a clivagem da pró-caspase-9, liberando a caspase-9 ativa (HENGARTNER, 2000).

Ao contrário da EBAC, o tratamento com E6 provocou um aumento de EROs após 1 hora de tratamento (**Figura 23**). Como em três horas há perda de PMM e não há aumento de EROs, é possível que o aumento de EROs seja o responsável pelo colapso do PMM. A produção de EROs pode ter induzido a diminuição do PMM ao ativar as enzimas lisossomais que translocam moléculas pró-apoptóticas (LAURENT et al., 2005). EROS também pode reagir diretamente com DNA e proteínas e causar danos que aumentam o colapso do PMM, sendo que a resposta da mitocôndria ao dano oxidativo é uma via importante no início da apoptose.(BANJERDPONGCHAI; KHAW-ON, 2013).

Durante muitos anos, acreditou-se que a morte celular por apoptose correspondia ao mecanismo de ação da maioria dos fármacos usados na quimioterapia do câncer. Contudo, mais recentemente, passou-se a investigar também outras formas de morte celular, tal como a autofagia (GALLUZZI et al., 2012). Um composto pode induzir mais de um mecanismo de morte em células HL60, como já relatado diversos compostos que induzem apoptose e autofagia concomitantemente ((BANJERDPONGCHAI; KHAW-ON, 2013; YOKOYAMA et al., 2008 e SIEDLECKA-KROPLEWSKA et al., 2013). As mitocôndrias têm papel fundamental na autofagia e a produção de EROs pode modular tanto apoptose quanto autofagia (KIM, 2005). A ativação de autofagia também pode inibir ou contribuir para indução de apoptose (LI et al., 2013). Devido à isso, foi investigado a ativação de autofagia no tratamento com EBAC (40 μ M).

Autofagia tem um papel ambíguo podendo tanto ser protetora e aumentar a sobrevivência do tumor quanto contribuir para morte aumentando a suscetibilidade à apoptose (KANEMATSU et al., 2010). Autofagia pode ser ativada em células HL60 como resposta adaptativa a condições de estresse contribuindo para manter as células em sobrevivência. Esse mecanismo de proteção contra morte pode ser devido ao sequestro da mitocôndria pelos lisossomos durante o processo de

autofagia, levando à diminuição da liberação de citocromo C e conseqüentemente diminuição da ocorrência de apoptose (KIM, 2005). Apigenina em células HCT-116, por exemplo, induz autofagia e apoptose, entretanto, o uso de um inibidor específico da autofagia (3-MA) aumentou a apoptose induzida por essa substância (LEE et al., 2014). Em outros casos, a autofagia contribui para a indução de apoptose, como é o caso de alguns agentes quimioterápicos que o mecanismo de citotoxicidade é pela via intrínseca da apoptose induzida por autofagia (BAREFORD et al., 2011). Outro exemplo é o trióxido de arsênio (As_2O_3) que induz autofagia e apoptose em células HL60. As_2O_3 primeiramente induz autofagia como resposta protetiva contra o tratamento, mas em estágios mais tardios promove amplificação dos efeitos da apoptose (YANG et al., 2008).

Para avaliação de autofagia, foi utilizado o corante alaranjado de acridina (AO) em citometria de fluxo e também um inibidor de autofagia – Bafilomicina A1. A **Figura 24** mostra o aumento da quantidade de células emitindo fluorescência vermelha (FL3), o que corresponde à quantidade de vacúolos autofágicos (AVOs) e a reversão após utilização da Bafilomina A1. Corantes acidófilos, como o AO, não são recomendados para monitoramento da autofagia, pois não coram células nos estágios iniciais da autofagia, quando não há presença de compartimentos ácidos. Por isso, o uso do inibidor de autofagia é um dado adicional importante para a confirmação da ativação de autofagia (KLIONSKY et al., 2008). Experimentos com marcadores mais específicos para autofagia como, por exemplo, a conversão de LC3 I em LC3 II por *western-blot*, pode ser útil para concluir o processo de morte induzido por este nitrocomposto.

A atuação da autofagia diante de um determinado tratamento pode ser averiguada com o uso de um inibidor e sua influência na viabilidade celular. Se autofagia é protetiva, o uso de supressores, tais como Bafilomicina A1, diminuiria a viabilidade celular por acelerar outras formas de morte (SHRIVASTAVA et al., 2011). Se autofagia contribui para a morte da célula, sua supressão irá prevenir a morte celular. Existe também o relato de casos em que a autofagia é ativada frente a um tratamento, mas não é protetiva e nem faz parte do mecanismo de ação (SHINGU et al., 2010). Pensando nisso, utilizou-se Bafilomicina A1 juntamente com EBAC 40 μ M por 24 horas e depois determinou-se a quantidade de células com DNA fragmentado

após marcação com PI. Pela **Figura 25**, pode-se observar que a utilização do inibidor de autofagia diminuiu significativamente a quantidade de células com DNA fragmentado, ou seja, aumentou a viabilidade celular. Dessa forma, a ativação da autofagia em células HL60 pode contribuir com o mecanismo de apoptose na morte celular induzida por EBAC. Vitamina K em células HL60 provocou efeitos semelhantes ao induzir simultaneamente apoptose e autofagia, sendo que o bloqueio com 3-MA (inibidor de autofagia) provocou aumento do número de células viáveis (YOKOYAMA et al., 2008). Portanto, EBAC possui atividade citotóxica em células HL60 e induz apoptose pela modulação da via intrínseca, com alteração do potencial de membrana mitocondrial e ativação de caspases -3 e -9. A substância EBAC também induz parada na fase G2/M do ciclo celular e formação de vacúolos autofágicos. A inibição da fragmentação após uso de Bafilomicina A1 sugere também a ativação de autofagia, sendo que esses dois mecanismos de morte contribuem para a citotoxicidade geral.

7. CONCLUSÃO

O mecanismo de indução de morte celular provocado por EBAC em células HL60 ocorre através da ativação da via intrínseca da apoptose e autofagia, sendo que ambos os mecanismos de morte colaboram para a citotoxicidade geral provocada pela substância.

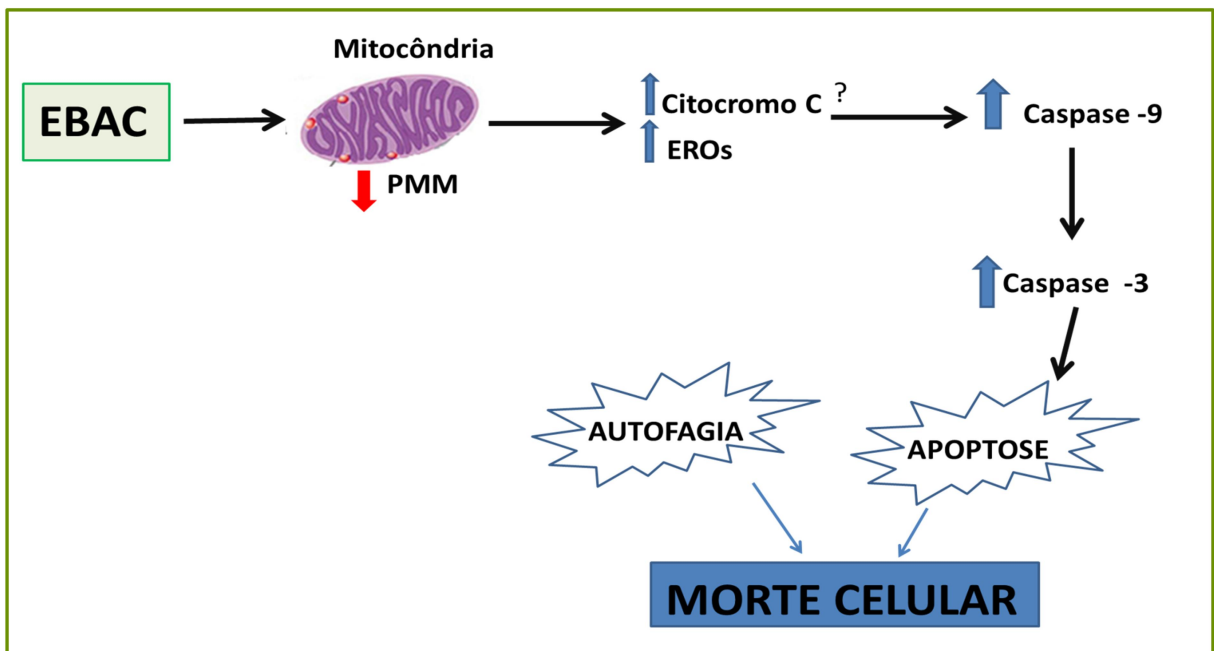


Figura 26 - Esquema representativo do mecanismo de indução de morte da substância EBAC em células HL60. A substância EBAC em células HL60 induz apoptose e autofagia simultaneamente e ambos os mecanismos de morte colaboram para a morte celular.

As investigações realizadas com o composto E6 mostraram que o efeito citotóxico observado em células HL60 se deu em razão da parada em G0/G1 no ciclo celular e aumento de EROs como mecanismo desencadeador da diminuição do potencial de membrana mitocondrial levando à ativação de caspase -9 e da via intrínseca da apoptose.

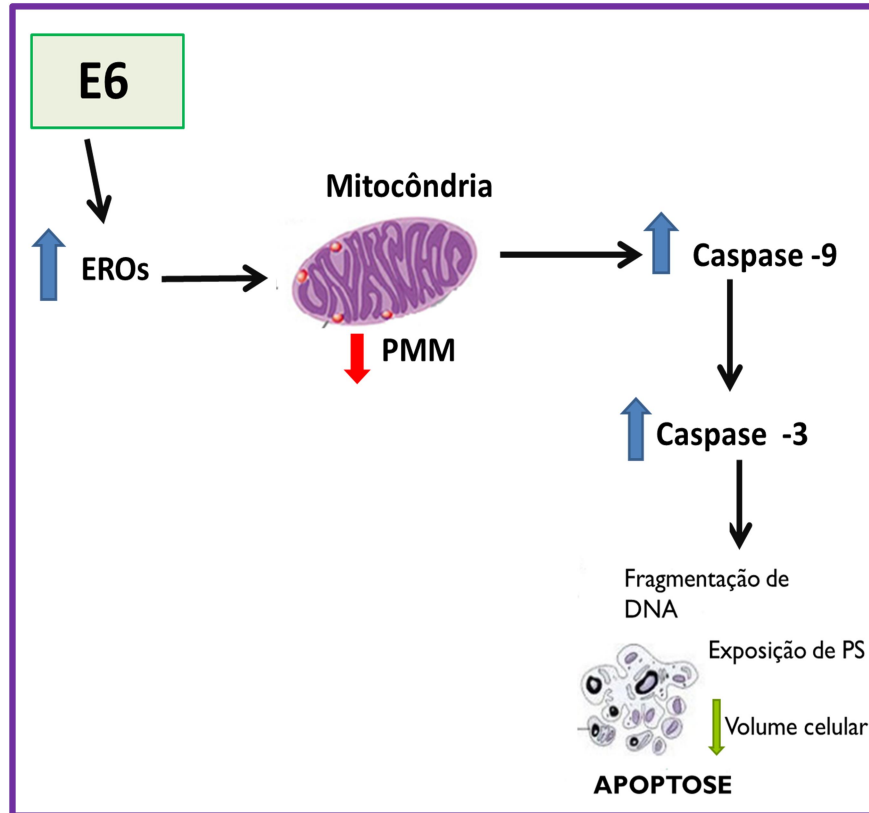


Figura 27 - Esquema representativo do mecanismo de indução de morte da substância E6 em células HL60. A hidrazona E6 provoca indução de apoptose através da via intrínseca após parada em G0/G1 e formação de EROS.

8. PERSPECTIVAS

- Otimização da parte química das duas substâncias, por estudos relação estrutura e atividade a fim de se obter substâncias análogas com maior seletividade e potência.
- Avaliar alterações nas características morfológicas celulares induzidas pelas substâncias por microscopia eletrônica de transmissão;
- Investigar *in vitro* as outras vias moleculares envolvidas na atividade citotóxica das substâncias E6 e EBAC, tais como proteínas da família BCL₂, em células HL60, utilizando ensaios como, por exemplo, Western Blotting;
- Avaliar marcadores específicos da autofagia induzida por EBAC em células HL60, tais como a conversão de LC3-I a LC3-II, por microscopia de fluorescência;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, V. L. DE 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, fev. 2005.

ANDERSON, S. N. et al. A high-throughput soft agar assay for identification of anticancer compound. **Journal of biomolecular screening**, v. 12, n. 7, p. 938–45, out. 2007.

APICELA SOARES, G. et al. Synthesis and in vitro cytotoxic activity of compounds with pro-apoptotic potential. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 15, n. 1, p. 12–26, jan. 2010.

AVIRAM, A. et al. Comparison between the effect of butyric acid and its prodrug pivaloyloxymethylbutyrate on histones hyperacetylation in an HL-60 leukemic cell line. **International Journal of Cancer**, v. 56, n. 6, p. 906–909, 15 mar. 1994.

BADISA, R. B. et al. Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells. **Anticancer research**, v. 29, n. 8, p. 2993–6, ago. 2009.

BANJERDPONGCHAI, R.; KHAW-ON, P. Terpinen-4-ol induces autophagic and apoptotic cell death in human leukemic HL-60 cells. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 14, n. 12, p. 7537–7542, 2013.

BAREFORD, M. D. et al. Sorafenib enhances pemetrexed cytotoxicity through an autophagy-dependent mechanism in cancer cells. **Cancer research**, v. 71, n. 14, p. 4955–67, 15 jul. 2011.

BERNARDI, A.; CAROLINE JACQUES-SILVA, M.; LENZ, G. Abordagem molecular no desenvolvimento de fármacos anti-tumorais BIOLOGIA DAS CÉLULAS CANCEROSAS. v. 15, n. 910, 2003.

BORUTAITE, V. Mitochondria as decision-makers in cell death. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 51, n. 5, p. 406–16, jun. 2010.

BRUCE, W. R.; LIN, H. An empirical cellular approach to the improvement of cancer chemotherapy. **Cancer research**, v. 29, n. 12, p. 2308–13, dez. 1969.

BUNEL, V. et al. Methods applied to the in vitro primary toxicology testing of natural products: state of the art, strengths, and limits. **Planta medica**, v. 80, n. 14, p. 1210–26, set. 2014.

BURKITT, M. J.; WARDMAN, P. Cytochrome C is a potent catalyst of dichlorofluorescein oxidation: implications for the role of reactive oxygen species in apoptosis. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 282, n. 1, p. 329–33, 23 mar. 2001.

CABRERA, M. et al. G2/M Cell Cycle Arrest and Tumor Selective Apoptosis of Acute Leukemia Cells by a Promising Benzophenone Thiosemicarbazone Compound. **PLoS**

one, v. 10, n. 9, p. e0136878, 2015.

CAO, Y.; KLIONSKY, D. J. Physiological functions of Atg6/Beclin 1: a unique autophagy-related protein. **Cell research**, v. 17, n. 10, p. 839–49, out. 2007.

CHAN, F. K.-M.; MORIWAKI, K.; DE ROSA, M. J. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 979, p. 65–70, 2013.

CHENG, Y.-Y. et al. The newly synthesized 2-(3-hydroxy-5-methoxyphenyl)-6,7-methylenedioxyquinolin-4-one triggers cell apoptosis through induction of oxidative stress and upregulation of the p38 MAPK signaling pathway in HL-60 human leukemia cells. **Oncology reports**, v. 28, n. 4, p. 1482–90, 2012.

DE ATENÇÃO À SAÚDE, S. Protocolos clínicos e Diretrizes terapêuticas em oncologia. [s.d.].

DESPAIGNE, A. A. R. et al. Structural studies on zinc(II) complexes with 2-benzoylpyridine-derived hydrazones. **Inorganica Chimica Acta**, v. 362, n. 7, p. 2117–2122, 2009.

DESPAIGNE, A. A. R. et al. 2-Acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived hydrazones and their gallium(III) complexes are highly cytotoxic to glioma cells. **European journal of medicinal chemistry**, v. 50, p. 163–72, abr. 2012.

DORATO, M. A.; BUCKLEY, L. A. Toxicology testing in drug discovery and development. **Current protocols in toxicology / editorial board, Mahin D. Maines (editor-in-chief) ... [et al.]**, v. Chapter 19, p. Unit19.1, fev. 2007.

E CARVALHO, A. C. et al. Cytotoxic activity and antiproliferative effects of crude skin secretion from *Physalaemus nattereri* (Anura: Leptodactylidae) on in vitro melanoma cells. **Toxins**, v. 7, n. 10, p. 3989–4005, 2015.

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

ERUSLANOV, E.; KUSMARTSEV, S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 594, p. 57–72, 2010.

ABC DO CÂNCER: Abordagens Básicas para o Controle do Câncer. Ministério da Saúde [2011].

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International journal of cancer**, v. 136, n. 5, p. 'E359–86, 1 mar. 2015.

FERREIRA, I. P. et al. Bismuth(III) complexes with 2-acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived hydrazones: Antimicrobial and cytotoxic activities and effects on the clonogenic survival of human solid tumor cells. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 24, n. 13, p. 2988–98, 1 jul. 2016.

FESIK, S. W. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. **Nature reviews. Cancer**, v. 5, n. 11, p. 876–85, nov. 2005.

GALLAGHER, R. et al. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. **Blood**, v. 54, n. 3, p. 713–33, set. 1979.

GALLUZZI, L. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. **Cell death and differentiation**, v. 16, n. 8, p. 1093–107, ago. 2009.

GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell death and differentiation**, v. 19, n. 1, p. 107–20, jan. 2012.

GAZZINELLI, R. T. et al. Identification and partial characterization of *Trypanosoma cruzi* antigens recognized by T cells and immune sera from patients with Chagas' disease. **Infection and immunity**, v. 58, n. 5, p. 1437–44, maio 1990.

GONG, J.; TRAGANOS, F.; DARZYNKIEWICZ, Z. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. **Analytical biochemistry**, v. 218, n. 2, p. 314–9, 1 maio 1994.

GONZÁLEZ-POLO, R.-A. et al. The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. **Journal of cell science**, v. 118, n. Pt 14, p. 3091–102, 15 jul. 2005.

GRIMBERG, J. et al. A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. **Nucleic acids research**, v. 17, n. 20, p. 8390, 25 out. 1989.

HAJREZAIE, M. et al. Apoptotic effect of novel Schiff based CdCl₂(C(1)(4)H(2)(1)N(3)O(2)) complex is mediated via activation of the mitochondrial pathway in colon cancer cells. **Scientific reports**, v. 5, p. 9097, 2015.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, 4 mar. 2011.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770–6, 12 out. 2000.

HICKMAN, J. A. Apoptosis induced by anticancer drugs. **Cancer metastasis reviews**, v. 11, n. 2, p. 121–39, set. 1992.

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, abr. 2012.

HUANG, P. S.; OLIFF, A. Drug-targeting strategies in cancer therapy. **Current opinion in genetics & development**, v. 11, n. 1, p. 104–10, fev. 2001.

INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2016. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>>.

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 61, n. 2, p. 69–90, [s.d.].

KANEMATSU, S. et al. Autophagy inhibition enhances sulforaphane-induced apoptosis in human breast cancer cells. **Anticancer research**, v. 30, n. 9, p. 3381–90, set. 2010.

KANG, K. et al. Flow cytometric fluorescence pulse width analysis of etoposide-induced nuclear enlargement in HCT116 cells. **Biotechnology letters**, v. 32, n. 8, p. 1045–52, ago. 2010.

KANG, R. et al. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. **Cell death and differentiation**, v. 18, n. 4, p. 571–80, abr. 2011.

KEPP, O. et al. Cell death assays for drug discovery. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 10, n. 3, p. 221–37, mar. 2011.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British journal of cancer**, v. 26, n. 4, p. 239–57, ago. 1972.

KIM, R. Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy. **Cancer**, v. 103, n. 8, p. 1551–1560, 2005.

KLIONSKY, D. J. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. **Autophagy**, v. 4, n. 2, p. 151–75, fev. 2008.

KOSTOVA, I. Gold coordination complexes as anticancer agents. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 6, n. 1, p. 19–32, jan. 2006.

KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death Differ**, v. 16, n. 1, p. 3–11, 2009.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. **Physiological reviews**, v. 87, n. 1, p. 99–163, jan. 2007.

KROEMER, G.; LEVINE, B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 9, n. 12, p. 1004–10, dez. 2008.

LAURENT, A. et al. Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species. **Cancer research**, v. 65, n. 3, p. 948–56, 1 fev. 2005.

LEE, Y. et al. Apigenin-induced apoptosis is enhanced by inhibition of autophagy formation in HCT116 human colon cancer cells. **International journal of oncology**, v. 44, n. 5, p. 1599–606, maio 2014.

LEITE, M. et al. Critical evaluation of techniques to detect and measure cell death--study in a model of UV radiation of the leukaemic cell line HL60. **Analytical cellular pathology: the journal of the European Society for Analytical Cellular Pathology**, v. 19, n. 3-4, p. 139–51, 1999.

LI, X. et al. Autophagy modulation as a target for anticancer drug discovery. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 34, n. 5, p. 612–24, maio 2013.

LIU, B. et al. Targeting autophagic pathways for cancer drug discovery. **Chinese journal of cancer**, v. 32, n. 3, p. 113–20, mar. 2013a.

LIU, Y.-J. et al. Chlorogenic acid induced apoptosis and inhibition of proliferation in human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells. **Molecular medicine reports**, v. 8, n. 4, p. 1106–10, 2013b.

LOPES, M. S. et al. Synthesis of nitroaromatic compounds as potential anticancer agents. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 15, n. 2, p. 206–16, 2015.

LOWE, S. W.; LIN, A. W. Apoptosis in cancer. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 485–95, mar. 2000.

MCKIM, J. M. Building a tiered approach to in vitro predictive toxicity screening: a focus on assays with in vivo relevance. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, v. 13, n. 2, p. 188–206, fev. 2010.

MEIRA, D. D. et al. Clotrimazole decreases human breast cancer cells viability through alterations in cytoskeleton-associated glycolytic enzymes. **Molecular genetics and metabolism**, v. 84, n. 4, p. 354–62, abr. 2005.

MONTECUCCO, A.; ZANETTA, F.; BIAMONTI, G. Molecular mechanisms of etoposide. **EXCLI journal**, v. 14, p. 95–108, 2015.

MORDANT, P. et al. Dependence on phosphoinositide 3-kinase and RAS-RAF pathways drive the activity of RAF265, a novel RAF/VEGFR2 inhibitor, and RAD001 (Everolimus) in combination. **Molecular cancer therapeutics**, v. 9, n. 2, p. 358–68, fev. 2010.

MORLEY, K. L. et al. Tangeretin and nobiletin induce G1 cell cycle arrest but not apoptosis in human breast and colon cancer cells. **Cancer Letters**, v. 251, n. 1, p. 168–178, jun. 2007.

MULLER, P. Y.; MILTON, M. N. The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 11, n. 10, p. 751–61, out. 2012.

NAGASHIMA, K. et al. Genetic and Pharmacological Inhibition of PDK1 in Cancer Cells: CHARACTERIZATION OF A SELECTIVE ALLOSTERIC KINASE INHIBITOR. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 8, p. 6433–6448, 25 fev. 2011.

NASR, T.; BONDOCK, S.; YOUNS, M. Anticancer activity of new coumarin substituted hydrazide-hydrazone derivatives. **European journal of medicinal chemistry**, v. 76, p. 539–48, 9 abr. 2014.

NEWMAN, R. A. et al. Autophagic cell death of human pancreatic tumor cells mediated by oleandrin, a lipid-soluble cardiac glycoside. **Integrative cancer therapies**, v. 6, n. 4, p. 354–64, dez. 2007.

NICHOLSON, D. W. ICE/CED3-like proteases as therapeutic targets for the control of inappropriate apoptosis. **Nature biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 297–301, mar. 1996.

NICOLETTI, I. et al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Journal of immunological**

methods, v. 139, n. 2, p. 271–9, 3 jun. 1991.

NUDELMAN, A. et al. Novel anticancer prodrugs of butyric acid. 2. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 4, p. 687–694, fev. 1992.

O'BRIEN, J. et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 267, n. 17, p. 5421–6, set. 2000.

OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nature reviews. Cancer**, v. 4, n. 8, p. 592–603, ago. 2004.

PILÓ, E. D. L. et al. Effect of coordination to antimony(III) on the antifungal activity of 2-acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived hydrazones. **Polyhedron**, v. 97, p. 30–38, 2015.

RACHER, A. J.; LOOBY, D.; GRIFFITHS, J. B. Use of lactate dehydrogenase release to assess changes in culture viability. **Cytotechnology**, v. 3, n. 3, p. 301–7, maio 1990.

REPHAELI, A. et al. Derivatives of butyric acid as potential anti-neoplastic agents. **International Journal of Cancer**, v. 49, n. 1, p. 66–72, 19 ago. 1991.

ROLLAS, S.; KÜÇÜKGÜZEL, S. G. Biological Activities of Hydrazone Derivatives. **Molecules**, v. 12, n. 8, p. 1910–1939, 17 ago. 2007.

RUELA-DE-SOUSA, R. R. et al. Cytotoxicity of apigenin on leukemia cell lines: implications for prevention and therapy. **Cell death & disease**, v. 1, p. e19, 2010.

SALEH, A. M. et al. Antiproliferative activity of the isoindigo 5'-Br in HL-60 cells is mediated by apoptosis, dysregulation of mitochondrial functions and arresting cell cycle at G0/G1 phase. **Cancer Letters**, v. 361, n. 2, p. 251–261, 2015.

SANCHEZ, Y. et al. Curcumin Stimulates Reactive Oxygen Species Production and Potentiates Apoptosis Induction by the Antitumor Drugs Arsenic Trioxide and Lonidamine in Human Myeloid Leukemia Cell Lines □. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 335, n. 1, p. 114–123, 2010.

SHINGU, T. et al. The polynuclear platinum BBR3610 induces G2/M arrest and autophagy early and apoptosis late in glioma cells. **Neuro-oncology**, v. 12, n. 12, p. 1269–77, dez. 2010.

SHRIVASTAVA, A. et al. Cannabidiol induces programmed cell death in breast cancer cells by coordinating the cross-talk between apoptosis and autophagy. **Molecular cancer therapeutics**, v. 10, n. 7, p. 1161–72, jul. 2011.

SIEDLECKA-KROPLEWSKA, K. et al. Pterostilbene induces accumulation of autophagic vacuoles followed by cell death in HL60 human leukemia cells. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 64, n. 5, p. 545–56, out. 2013.

SOUZA-FAGUNDES, E. M. et al. Myriadenolide, a labdane diterpene isolated from *Alomia myriadenia* (asteraceae) induces depolarization of mitochondrial membranes and apoptosis associated with activation of caspases-8, -9, and -3 in Jurkat and

THP-1 cells. **Experimental Cell Research**, v. 290, n. 2, p. 420–426, 2003.

TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 9, n. 3, p. 231–41, mar. 2008.

TSUJIMOTO, Y.; SHIMIZU, S. Another way to die: autophagic programmed cell death. **Cell Death and Differentiation**, v. 12, p. 1528–1534, nov. 2005.

Types of Cancer Treatment: Chemotherapy - National Cancer Institute.
Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/chemotherapy>>.

VERMES, I. et al. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **Journal of immunological methods**, v. 184, n. 1, p. 39–51, 17 jul. 1995.

WANG, Y. et al. Pterostilbene simultaneously induces apoptosis, cell cycle arrest and cyto-protective autophagy in breast cancer cells. v. 4, n. 1, p. 44–51, 2012.

WHO | 2016. **WHO**, 2016.

WILSON, E. N. et al. A switch between cytoprotective and cytotoxic autophagy in the radiosensitization of breast tumor cells by chloroquine and vitamin D. **Hormones & cancer**, v. 2, n. 5, p. 272–85, out. 2011.

WLODKOWIC, D. et al. Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death. **Methods in cell biology**, v. 103, p. 55–98, 2011.

WONG, R. S. Y. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **Journal of experimental & clinical cancer research: CR**, v. 30, n. 1, p. 87, 2011.

YANG, Y. P. et al. Dynamic effects of autophagy on arsenic trioxide-induced death of human leukemia cell line HL60 cells. **Acta Pharmacol Sin**, v. 29, n. 1, p. 123–134, 2008.

YOKOYAMA, T. et al. Vitamin K2 induces autophagy and apoptosis simultaneously in leukemia cells. **Autophagy**, v. 4, n. 5, p. 629–640, 2008.

YUAN, C.-H.; FILIPPOVA, M.; DUERKSEN-HUGHES, P. Modulation of apoptotic pathways by human papillomaviruses (HPV): mechanisms and implications for therapy. **Viruses**, v. 4, n. 12, p. 3831–50, 2012.

ZIMRA, Y. et al. Butyric acid and pivaloyloxymethyl butyrate, AN-9, a novel butyric acid derivative, induce apoptosis in HL-60 cells. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 123, n. 3, p. 152–160, mar. 1997.

ZIPS, D.; THAMES, H. D.; BAUMANN, M. New anticancer agents: in vitro and in vivo evaluation. **In vivo (Athens, Greece)**, v. 19, n. 1, p. 1–7, [s.d.].