



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

PAULO BRUNO NORBERTO DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTICÂNCER DE NOVOS
COMPOSTOS TIOSSEMICARBAZÍDICOS**

RECIFE
2022

PAULO BRUNO NORBERTO DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTICÂNCER DE NOVOS
COMPOSTOS TIOSSEMICARBAZÍDICOS**

Dissertação de Mestrado apresentado como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gardenia Carmen Gadelha Militão

Coorientador: Prof. Dr. José Maurício Dos Santos Filho

**RECIFE
2022**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Silva, Paulo Bruno Norberto da

Investigação do potencial anticâncer de novos compostos tiossemicarbazídicos / Paulo Bruno Norberto da Silva. – 2022.

73 f. : il., fig., tab.

Orientadora: Gardênia Carmem Gadelha Militão.

Coorientador: José Maurício dos Santos Filho.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Recife, 2022.

Inclui referências e anexo.

1. Câncer 2. Toxicidade- testes 3. Apoptose I. Militão, Gardênia Carmem Gadelha (orient.) II. Santos Filho, José Maurício dos (coorient.) III. Título.

616.99

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022 -160

Elaborado por Elaine C Barroso - CRB-4/1728

PAULO BRUNO NORBERTO DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTICÂNCER DE NOVOS
COMPOSTOS TIOSSEMICARBAZÍDICOS**

Dissertação de mestrado apresentado como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Banca Examinadora

Dra. Gardenia Carmen Gadelha Militão
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Eduardo Carvalho Lira
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Sávio Moita Pinheiro
Universidade Federal da Paraíba

Dr. Thiago David dos Santos Silva
Centro Universitário Facol

Data: 26/01/2022

Dedico este trabalho àquele que fez com que minha infância fosse a melhor possível, em que pude aproveitar o máximo dela ao seu lado, meu pai Oséas Norberto (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Existem situações na vida em que é fundamental poder contar com o apoio e ajuda de algumas pessoas. Para a realização dessa Dissertação, pude contar com várias. E a essas pessoas prestarei, através de poucas palavras, os mais sinceros agradecimentos

Ao Deus de infinito amor e sua mãe, nossa senhora, àqueles que me deram a dádiva da vida e com ela todas as realizações que até aqui alcancei. Todas as graças sejam dadas a Eles.

À minha família, quero agradecer por todo o carinho, dedicação, amor, cuidado e apoio. Em especial, a minha mãe Edileusa, pela educação conferida e pelo incentivo para a realização dos meus objetivos, obrigado mãe por tudo!

A minha esposa Andréa Norberto, que tem me acompanhado nessa jornada, dando força para enfrentar as barreiras mais difíceis e por sonhar comigo.

Aos amigos de laboratório, Sílvia, Júlia e Thiago, que foram importantes nesses anos de pesquisa, desde a iniciação científica até o momento atual.

A minha orientadora Gardenia Militão, agradeço pela paciência que vem dedicando a mim durante essa jornada científica. Obrigado por toda confiança transmitida e depositada em mim. Pela disposição em orientar esse trabalho, por responder prontamente a todos os questionamentos e por ser tão presente, obrigado.

Ao meu coorientador José Maurício, que se dispôs a fazer todas as correções e contribuições a este trabalho mesmo com essa pandemia. Obrigado por ter me fornecido os compostos para esse trabalho.

Ao professor Leucio Duarte, por ter cedido seu laboratório para o cultivo das minhas células e pelas aulas diferenciadas na Pós-Graduação, muito obrigado.

Agradeço também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de Pós-Graduação e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pelo apoio financeiro para realização do projeto.

Por fim quero agradecer a minha querida UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), por fazer parte dessa minha trajetória e por fazer parte da minha história.

“Ontem eu era inteligente, então queria mudar o mundo. Hoje eu sou sábio, então estou mudando a mim mesmo”.

Maulana Jalaladim Maomé (RUMI)

RESUMO

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo. Portanto, é necessário continuar a busca por novos compostos capazes de induzir a morte de células tumorais e reduzir os efeitos colaterais. Os compostos que possuem a porção tiossemicarbazida na estrutura apresentam diferentes atividades, incluindo ação anticonvulsivante, antiviral, antibacteriana e antitumoral, esta última por induzir a apoptose. Avaliamos a atividade antiproliferativa *in vitro* de novos compostos que apresentam a porção tiossemicarbazida e os aminoácidos glicina, fenilalanina e triptofano em suas estruturas, contra as linhagens de células tumorais humanas HL-60 (leucemia promielocítica), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), HEP-2 e NCI-H292 (carcinoma de laringe e pulmão) e células não tumorais (células mononucleares do sangue periférico humano - CMSP). Os ensaios utilizados foram citotoxicidade pelo sal MTT, análise morfológica pela coloração de May-Grunwald-Giemsa e citometria de fluxo para determinar apoptose e ciclo celular. Onze moléculas apresentaram atividade citotóxica em pelo menos uma linhagem tumoral. AT39, um derivado da fenilalanina, apresentou, entre as moléculas testadas, a menor concentração inibitória (CI_{50}) em quatro linhagens tumorais. Os valores obtidos de CI_{50} e intervalo de confiança (IC) em $\mu\text{g/mL}$ após 72h de tratamento são 1,5 (1,2 - 1,7) em (HL-60); 5,5 (3,2 - 9,4) em (MCF-7); 5,1 (4,0 - 6,5) em (NCI-H292) e 7,4 (5,3 - 10,5) em (HEP-2). Após 24, 48 e 72h de tratamento em HL-60 o composto AT39 apresentou IC_{50} de 4,7 (3,9 - 5,7), 3,3 (2,6 - 4,2) e 1,5 (1,2 - 1,7) $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. AT39 não foi citotóxico em CMSP. A análise morfológica das células HL-60 tratadas com 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ após 24h sugeriu indução de apoptose, confirmada por ensaio de citometria com kit anexina V-FIT. Após análise do ciclo celular obtido por citometria de fluxo, verificou-se um aumento nas fases G0/G1 e uma diminuição nas fases G2/M, enquanto que o aumento nas fases G0/G1 pode indicar uma possível quiescência causada pelo composto. Um aumento de células em Sub-G0 causado pelo composto AT39 em sua maior concentração corrobora com a indução de morte celular. Os resultados sugerem que AT39 é um agente anticancerígeno promissor.

Palavras chaves: Tiossemicarbazida; AT39; Citotoxicidade; HL-60; CMSP; Apoptose.

ABSTRACT

Cancer is the second leading cause of death in the world. Therefore, it is necessary to continue the search for new compounds capable of inducing tumor cell death and reducing side effects. Compounds that have the thiosemicarbazide portion in the structure present different activities, including anticonvulsant, antiviral, antibacteria and antitumor effect, the latter by inducing apoptosis. We evaluated the *in vitro* antiproliferative activity of novel compounds that present the thiosemicarbazide portion and the amino acids glycine, phenylalanine, and tryptophan in their structures, against human tumor cell lines HL-60 (promyelocytic leukemia), MCF-7 (breast adenocarcinoma), HEP-2 and NCI-H292 (laryngeal carcinoma) and non-tumor cells (Human Peripheral Blood Mononuclear Cells - PBMC). The assays used were cytotoxicity by MTT salt, morphological analysis by May-Grunwald-Giemsa staining, and flow cytometry to determine apoptosis and cell cycle. Eleven molecules showed cytotoxic activity in at least one tumor lineage. AT39, a phenylalanine derivative showed, among the molecules tested, the lowest inhibitory concentration (IC_{50}) in four tumor lines. The values obtained from IC_{50} and confidence interval (CI) in $\mu\text{g/mL}$ after 72h of treatment are 1.5 (1.2 - 1.7) in (HL-60); 5.5 (3.2 - 9.4) in (MCF-7); 5.1 (4.0 - 6.5) in (NCI-H292) and 7.4 (5.3 - 10.5) in (HEP-2). After 24, 48, and 72h of treatment in HL-60 the compound AT39 presented IC_{50} of 4.7 (3.9 - 5.7), 3.3 (2.6 - 4.2), and 1.5 (1.2 - 1.7) $\mu\text{g/mL}$, respectively. AT39 was not cytotoxic in PBMC. Morphological analysis of HL-60 cells treated with 5 and 10 $\mu\text{g/mL}$ after 24h suggested there was an induction of apoptosis, confirmed by cytometry assay with annexin V-FIT kit. After analyzing the cell cycle obtained by flow cytometry, it was found an increase in the G0 / G1 phases and a decrease in the G2 / M phases, whereas the increase in the G0 / G1 phases may indicate a possible quiescence caused by the compound. An increase in cells in Sub-G0 caused by the compound AT39 in its highest concentration corroborates with the cell death induction. The results suggest that AT39 is a promising anticancer agent.

Keywords: Thiosemicarbazide; AT39; Cytotoxicity; HL-60; CMSP; apoptosis

LISTA DE FIGURAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Figura 1 - Algumas alterações na fisiologia das células cancerígenas	19
Figura 2 - Novas características associadas ao câncer	20
Figura 3 - Passos iniciais para a oncogênese	23
Figura 4 - Ciclo celular	25
Figura 5 - Característica morfológica de uma célula em apoptose	26
Figura 6 - Via intrínseca (mitocondrial) da apoptose	27
Figura 7 - Via extrínseca da apoptose	28
Figura 8 - Característica morfológica de uma célula em necrose	30
Figura 9 - Característica morfológica de uma célula em autofagia	31
Figura 10 - Porção tiossemicarbazida	37

ARTIGO

Figura 1- Estrutura central dos compostos sintetizados	50
Figura 2- Fotomicrografia de células HL-60 tratadas com controle positivo (Dox 5µg/mL) e AT39 nas concentrações de 5 e 10 µg/mL	61
Figura 3- Porcentagem de células nas fases do ciclo celular, obtidos por citometria de fluxo após 24h de tratamento e detecção de apoptose por externalização da fosfatidilserina após 24h de tratamento com o composto AT39 nas concentrações de 2,5, 5 e 10 µg/mL	62

LISTA DE TABELAS E QUADROS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Tabela 1- Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020-2022 por sexo	21
Quadro 1- Modalidades distintas de morte celular com suas características e processos	32

ARTIGO

Tabela 1 - Estrutura química dos compostos derivados da fenilalanina	51
Tabela 2 - Estrutura química dos compostos derivados do triptofano	51
Tabela 3 - Estrutura química dos compostos derivados da glicina	52
Tabela 4 - Atividade citotóxica dos compostos derivados da glicina	56
Tabela 5- Atividade citotóxica dos compostos derivados da fenilalanina	57
Tabela 6 - Atividade citotóxica dos compostos derivados do triptofano	58
Tabela 7 - Compostos que apresentaram atividade de inibição com suas CI_{50} e intervalos de confiança em 72h nas linhagens tumorais e CMSP	59
Tabela 8 - Apresentação dos valores de CI_{50} e IC de 95% do composto AT39 em 24, 48 e 72h	60

LISTA DE ABREVIATURAS

μg - micrograma

μL - microlitro

μM - micromolar

ANOVA - análise de variância

APAF 1 - fator de ativação 1 da protease apoptótica

ATP - adenosina trifosfato

BAK - antagonista assassino análogo de Bcl-2

BAX- proteína X associada a Bcl-2

Bcl-2 - Proteína do linfoma de células B- 2

BCL-W - Proteína 2 semelhante a Bcl-2

BCL-XL- Linfoma de células B extra grandes

BID - Agonista de morte de domínio de interação BH3

CI₅₀ - Concentração inibitória de 50%

CITOCROMO C- Proteína heme associada à membrana externa da mitocôndria

CMSP - Células mononucleadas do sangue periférico

CO₂ - dióxido de carbono

DNA - ácido desoxirribonucleico

DISC - complexo de sialização indutor de morte

DMEM - do inglês, Dulbecco's modification of Minimum Essential Media

DMSO - Dimetilsufóxido

DOX - Doxorrubicina

FADD - proteína associada a Fas com domínio de morte

FAS - Fator relacionado a apoptose

HEP-2 - Linhagem celular do carcinoma de laringe humano

HIF- fator induzível por hipóxia

HL-60 - Linhagem celular da Leucemia Promielocítica

IAP- inibidor de apoptose

IC – Intervalo de confiança

IGF2- fator de crescimento semelhante a insulina 2

INCA - Instituto Nacional do Câncer

LC3II - cadeia leve de proteína associada a microtúbulo

MCF-7 -Linhagem celular do adenocarcinoma de mama

mg -miligrama

mL - mililitro

MTT - brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio

NCI H292 - linhagem celular do carcinoma de pulmão

OMS - Organização Mundial de Saúde

p53 - proteína 53

PI - Iodeto de propídeo

PUMA - modulador de apoptose regulado positivamente

RNA - ácido ribonucleico

RPMI 1640 - do inglês, Roswell Park Memorial Institute

S.E.M - erro médio padrão

TNF - Fator de necrose tumoral

TRADD - proteína do domínio de morte associada ao receptor do fator de necrose tumoral

TRAIL - ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF

XIAP- inibidor de apoptose ligado ao X

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1 DEFINIÇÃO DE CÂNCER	17
2.2 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER	21
2.3 CARCINOGENESE	22
2.4 FATORES DE RISCOS	23
2.5 CICLO CELULAR E CÂNCER	24
2.5.1 Morte celular e câncer	25
2.5.2 Apoptose	26
2.5.3 Necrose	29
2.5.4 Autofagia	30
2.6 ALVOS NA TERAPIA ANTICÂNCER E USO DE TÉCNICAS EM BIOLOGIA MOLECULAR	32
2.7 TRATAMENTO DO CÂNCER	34
2.8 QUIMIOTERÁPICOS	35
2.9 TIOSSEMICARBAZIDA	35
3 OBJETIVOS	38
3.1 OBJETIVO GERAL	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
REFERÊNCIAS	39
4 ARTIGO	47
INTRODUÇÃO	49
MATERIAIS E MÉTODOS	50
5 RESULTADOS	55
DISCUSSÃO	63
6 CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS	67
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	69

1 INTRODUÇÃO

Cem anos atrás, o câncer não era tão comum; no entanto, desde as últimas décadas sua incidência tem aumentado de forma alarmante, provavelmente devido às mudanças no estilo de vida, hábitos e aumento da expectativa de vida. É uma das doenças mais temidas do século 20 e se espalhou ainda mais com continuidade e ocorrência crescente no século 21. Neoplasias malignas ou enfermidades oncológicas são outras denominações utilizadas para descrever esse grupo de doenças, que apresentam como uma de suas características a sua divisão celular excessiva (ROY; SAIKIA, 2016; CARVALHO, 2000). O tumor maligno é um importante problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo responsável por mais de seis milhões de óbitos a cada ano, representando mais de 12% de todas as causas de morte no mundo. Embora as maiores taxas dessa doença sejam encontradas em países desenvolvidos, dos mais de dez milhões de casos novos anuais de câncer, aproximadamente cinco milhões e meio são diagnosticados nos países em desenvolvimento (REV. PANAM. SALUD. PUB., 2002).

O tratamento do câncer pode ser feito através de cirurgia, quimioterapia, radioterapia ou transplante de medula óssea. Em muitos casos, é necessário combinar mais de uma modalidade para que ocorra o sucesso do tratamento. O número de casos dessa doença tem aumentado de maneira considerável desde o século passado se tornando um dos principais problemas de saúde pública no nosso país, que já ultrapassou a marca dos 275 mil óbitos anuais ocasionado por algum tipo de câncer (INCA, 2021; FNC, 2021).

Diante de tal cenário, fica clara a necessidade de continuidade em investimentos no desenvolvimento de ações abrangentes para o controle do câncer, nos diferentes níveis de atuação como: na promoção da saúde, na detecção precoce, na assistência aos pacientes, na vigilância, na formação de recursos humanos, na comunicação, mobilização social e em especial na pesquisa de novos agentes anticancerígenos.

A síntese química contribui tanto para a produção de novos fármacos bioativos como também para o fornecimento em quantidade apropriada desses no tratamento de diversas doenças. Sabe-se que a síntese orgânica é a principal fonte de medicamentos, correspondendo a cerca de 75% do total de fármacos disponíveis no mercado farmacêutico. Esses produtos despertam grande interesse científico e medicinal no tratamento de doenças, por exemplo, o câncer (CHECHINEL, 2009).

Compostos contendo a porção tiossemicarbazida têm sido amplamente descritos na literatura em associação com várias áreas de estudos. A busca de novas moléculas bioativas como alternativas terapêuticas tem se intensificado nas últimas décadas. A tiossemicarbazida é uma molécula altamente eficiente no desenvolvimento de novos protótipos pelo fato de ter simplicidade no seu manuseio, também exibem grande versatilidade por serem reativas tanto nas moléculas ionizadas quanto em moléculas neutras, além de exibirem grande variedade de atividades biológicas (HE *et al.* 2012). Com essas qualidades fica evidente o papel desse grupo químico como farmacóforo responsável pelas respostas biológicas observadas nas mais diversas classes de compostos em que ele é incorporado. Inúmeros trabalhos têm corroborado a versatilidade da atividade biológica das tiossemicarbazidas, sendo utilizado no tratamento antibacteriano (ALAGARSAMY *et al.* 2012), tripanocida e antimalárica (AGUIRRE *et al.* 2004; LEITE, 2006), antiviral (SINGHS, 1985) e anticancerígena (HONG-JIA, *et al.* 2011). Este trabalho teve como objetivo estudar o potencial anticâncer de novos compostos tiossemicarbazídicos em diferentes linhagens de tumores malignos, além de estudos de citotoxicidade em células mononucleadas do sangue periférico.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 DEFINIÇÃO DE CÂNCER

Câncer é o termo utilizado para caracterizar uma série de doenças que apresentam um alto índice de proliferação celular desordenada, que podem invadir tecidos adjacentes ou órgãos mais distantes ocasionando danos ao corpo. Essa neoplasia maligna faz com que as células criem meios de se manterem vivas e com isso adquiram a capacidade de se espalharem para outras partes do corpo e dividindo-se rapidamente tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando assim a formação de tumores que podem espalhar-se para outras regiões corporais. Normalmente as células humanas crescem e se multiplicam por meio da divisão celular para formar novas células conforme a necessidade do corpo, quando as células envelhecem ou ficam danificadas elas entram em um processo de morte e novas células ocupam seu lugar. (NCI, 2021; INCA, 2021).

As últimas duas décadas testemunharam grandes avanços em nossa compreensão da patogênese do tumor maligno. Está claro que o câncer surge por meio de um processo mutagênico de várias etapas, por meio do qual as células cancerosas adquirem um conjunto comum de propriedades (LUO; SOLIMINI; ELLEDGE, 2009). Essas células apresentam defeitos nos circuitos reguladores que governam a proliferação celular normal e a homeostase. Sugere-se que o vasto catálogo de genótipos das células do câncer é uma manifestação que apresenta alterações essenciais na fisiologia celular, onde coletivamente ditam o crescimento maligno (Figura 1), essas modificações são: autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais inibidores de crescimento (anticrescimento), evasão de morte celular programada (apoptose), potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, invasão tecidual e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Células normais requerem sinais de crescimento antes de mudarem de um estado de quiescência - que é um estado onde a célula se encontra metabolicamente ativa, porém não prolifera, para um estado ativo de proliferação. Esses sinais são transmitidos para a célula por receptores transmembrana que ligam distintas classes de sinalizadores. Muitos oncogenes, genes relacionados ao surgimento de tumores, agem imitando um comportamento exacerbado de sinalização de crescimento, tornando as células cancerígenas autossuficientes em sinais de crescimento e proliferação. A insensibilidade aos sinais anticrescimento está relacionada com a capacidade das células cancerígenas de evadir esses sinais, de modo a continuar seu crescimento. As células agem alterando diretamente seu ciclo de replicação, passando

despercebidas por estes sinais. Na evasão de apoptose as células tumorais adquirem a habilidade de impedir a morte celular programada. A apoptose ocorre quando o ambiente ou fatores internos enviam sinais para que as células morram, uma vez que não conseguem executar suas funções propriamente.

Sendo assim, um tumor em expansão deve perpassar esta barreira, de modo a tornar esses sinais de morte programada não funcionais. As capacidades explicadas anteriormente poderiam constituir sozinhas as vantagens necessárias para o crescimento completo de um tumor, no entanto, recentes estudos apresentaram que este crescimento desordenado e evasão da comunicação entre células que gera a apoptose, em si, não é suficiente para garantir o crescimento tumoral. O potencial replicativo ilimitado opera independente das conexões intercelulares, favorecendo ainda mais o sucesso proliferativo dessas células, sendo assim, constitui-se mais uma barreira a ser transposta no sentido de que o tumor se torne macroscópico e letal. Uma grande barreira no crescimento tumoral se encontra no fato de que em certo ponto de seu crescimento ele assume um tamanho muito grande. A corrente sanguínea, e consequentemente os nutrientes, não conseguem alcançar o interior do tumor e células podem entrar em processo de necrose. O tumor para permanecer vivo cria novos vasos sanguíneos (angiogênese) que chegam até o seu interior e levam nutrientes e oxigênio para as células. A partir do momento em que essa barreira é quebrada, o tumor irá trabalhar como um organismo autossuficiente. Finalmente, após sucessivos incrementos em sua vantagem adaptativa o tumor poderá invadir outros tecidos e se alastrar pelo corpo. Este processo é conhecido como metástase, onde as células cancerígenas, agora com alto valor adaptativo, podem se desprender do tecido original, migrar via circulação sanguínea ou linfática e estabelecer novos focos tumorais em outras partes do corpo (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

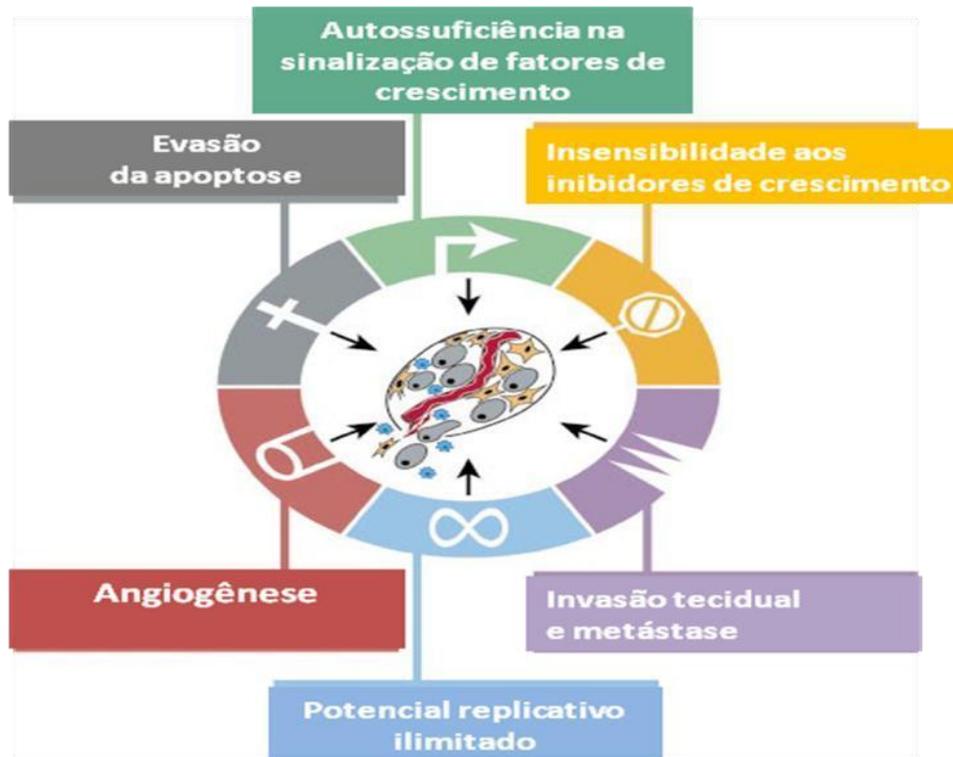


Figura 1. Algumas alterações na fisiologia das células cancerígenas (Adaptado de HANAHAN; WEINBERG. The Hallmarks of Cancer, 2000).

Estudos posteriores demonstraram que além das seis características já conhecidas e estudadas, as células neoplásicas malignas apresentavam mais quatro fatores que dariam forças maiores a patogênese dessa doença, duas se apresentavam no início da doença, que são: estresse energético e evasão do sistema imune, as outras duas se apresentam consequentes ao câncer: instabilidade genômica e promoção tumoral por inflamação (Figura 2). A desregulamentação energética celular envolve a capacidade de modificar ou reprogramar o metabolismo celular para poder apoiar de uma forma mais eficaz a proliferação neoplásica. A evasão do sistema imune permite que as células cancerosas possam escapar da destruição imunológica, em especial por linfócitos T e B e macrófagos. De forma adicional duas características que os autores consideram consequentes ao câncer também estão sendo muito investigadas: a primeira é a instabilidade genômica, ela permite que as células tumorais se beneficiem através da mutabilidade, levando a progressão tumoral; e a segunda é a inflamação, onde células da imunidade contribuem para a progressão tumoral, fornecendo várias moléculas bioativas para o microambiente tumoral como, fatores de crescimento e sobrevivência e modificando enzimas que facilitam a angiogênese, invasão e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

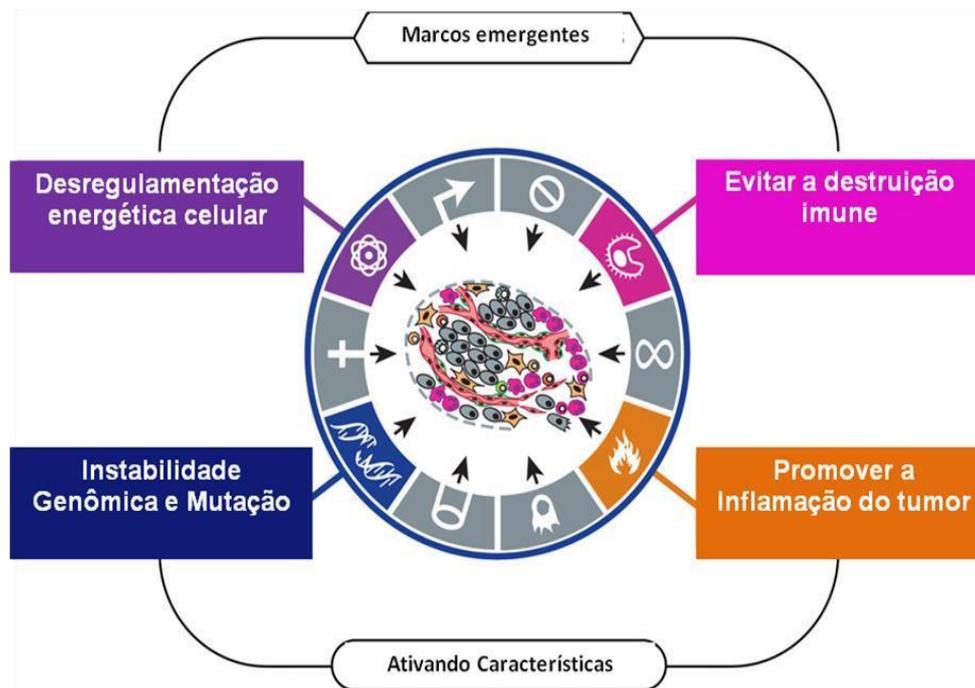


Figura 2. Novas características associadas ao câncer. (Adaptado de HANAHAN; WEINBERG. Hallmarks of Cancer: The Next Generation, 2011).

Vale realçar que somente uma alteração no DNA não é suficiente para o surgimento do câncer, várias mutações que não sejam letais a célula são necessárias para a formação da neoplasia maligna. O foco na pesquisa do câncer tem sido tradicionalmente na identificação de oncogenes (genes que codificam proteínas que promovem a perda do controle sobre o ciclo mitótico, tornando a célula cancerosa) e genes supressores de tumor (genes cuja inativação ou perda irá fazer a célula apresentar fenótipo neoplásico). Em outras palavras, são genes que regulam a proliferação e morte celular. Também é frequentemente mencionado em pesquisas que a interrupção da diferenciação normal é um componente importante da tumorigênese (TENEN, 2003).

No surgimento do câncer encontramos várias causas, tanto os fatores externos e/ou internos ao organismo contribuem para o desenvolvimento da doença. As causas externas estão relacionadas ao ambiente de trabalho, aos hábitos, costumes e qualidade de vida da própria pessoa. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas e estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões sofridas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

2.2 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER

Em 2018 o câncer foi responsável por mais de 10 milhões de mortes, sendo a segunda causa de morte no mundo, tanto os países desenvolvidos como os menos desenvolvidos sofrem com a malignidade dessa doença, na maioria das vezes, essas nações menos desenvolvidas não estão preparadas para administrar essa carga elevada de novos casos, e a falta de diagnóstico precoce e tratamento faz com que essa estatística aumente ainda mais (WHO, 2021). Uma estimativa feita pelo observatório global do câncer e Organização Mundial da Saúde, demonstrou que para o ano de 2040 teremos aproximadamente 30,2 milhões de novos casos de cânceres no mundo, em ambos os sexos (GCO, 2021). Acredita-se que as neoplasias se tornarão as principais causas de óbitos no mundo, sendo que no ano de 2070 os casos de câncer serão o dobro de 2020 com os países de baixa e média renda mais afetados por essa doença (SOERJOMATARAM; BRAY, 2021).

A Organização Mundial de Saúde destaca que as taxas de sobrevivência estão melhorando graças à detecção precoce acessível, tratamento de qualidade e ações educativas sobre a doença. Essas medidas devem ser prioridade, pois ações preventivas rápidas fazem com que haja uma porcentagem maior no sucesso do tratamento (WHO, 2021). Para o nosso país, a estimativa para cada ano do triênio 2020-2022 aponta que ocorrerão mais de 625 mil casos novos de neoplasias malignas. Os principais casos de câncer por sexo, exceto pele não melanoma, estão demonstrados na tabela abaixo (INCA, 2021).

Tabela 1- Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020-2022 por sexo.

Localização primária	Casos	%			Localização primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens 	Mulheres 	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e Reto	20.520	9,1%			Cólon e Reto	20.470	9,2%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.440	5,6%
Cavidade Oral	11.180	5,0%			Glândula Tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema Nervoso Central	5.220	2,3%

* Números arredondados para múltiplos de 10

Fonte: MS/INCA Estimativa do câncer no Brasil, 2020.

Uma boa parte das mortes causadas por neoplasias malignas poderiam ser evitadas se as pessoas diminuíssem a utilização de fatores de riscos como cigarro e bebidas alcoólicas, praticassem mais exercícios e tivessem uma alimentação saudável. Além desses fatores citados, a detecção precoce da doença, melhores condições no sistema único de saúde e estratégias mais avançadas para prevenção fariam com que o índice de morte por câncer se tornasse menor (WHO, 2021).

2.3 CARCINOGENESE

A formação de um câncer está diretamente relacionada com alterações que ocorrem no material genético da célula, com essas mudanças a célula passa a receber instruções erradas para as suas atividades. As modificações podem ocorrer em genes especiais, denominados proto-oncogenes, que são genes relacionados com o crescimento e multiplicação celular, a princípio são inativos em células normais. Quando alterados, os proto-oncogenes tornam-se oncogenes, que são genes relacionados com o surgimento de tumores, tanto benignos quanto malignos, responsáveis por transformar as células normais em células cancerosas. Transformações nesses genes podem ocorrer por acaso, mas na sua maioria são realizadas por fatores endógenos ou exógenos que podem favorecer o desequilíbrio na homeostasia celular, essas mutações se não reparadas, poderão fazer com que a célula aumente de maneira significativa sua proliferação, diminua ou cesse sua morte programada, invada e destrua tecidos e consigam se disseminar para outras áreas do corpo, podendo formar assim um tumor maligno (STOETERAU, 2019). Nos tempos atuais as neoplasias malignas são caracterizadas por distúrbios do crescimento celular, essas mutações adquiridas tem como costume afetar uma ou mais células, dessa forma a progênie clonal continuará a repassar esse erro para as próximas células. Essas mudanças genéticas fornecem autonomia para as células cancerígenas adquirirem mais resistência contra a defesa corporal e com isso aumentarem sua proliferação, independente de estímulos fisiológicos de crescimento (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

Além das células tumorais clonais outros componentes são necessários para a continuidade da carcinogênese, como o estroma reativo por exemplo. O estroma tem como uma das funções aumentar a disseminação celular. Nele, podemos encontrar vasos sanguíneos que facilitarão a captação de nutrientes, tecido conjuntivo que está relacionado com espaço e estrutura do tecido, como também outros tipos celulares (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013). A formação dessas células ocorre de maneira lenta, pois são necessárias várias mutações para

que ocorra a formação de um tumor maligno, ou seja, um câncer pode demorar anos para se manifestar dentro do corpo. Por possuírem uma maior autonomia e reagirem com agentes carcinógenos, essas células irão apresentar seu desenvolvimento divididos em estágio de iniciação, promoção e progressão (Figura 3), (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

No estágio de iniciação as células entram em contato com substâncias mutagênicas, os genes sofrem ação desses agentes e com isso terão início as primeiras alterações celulares. Já no estágio de promoção os oncopromotores que são os agentes cancerígenos atuam para transformar as células iniciadoras (que sofreram as primeiras alterações) em neoplasias malignas. Por fim temos o estágio de progressão, o qual apresenta multiplicação celular descontrolada e irreversível.

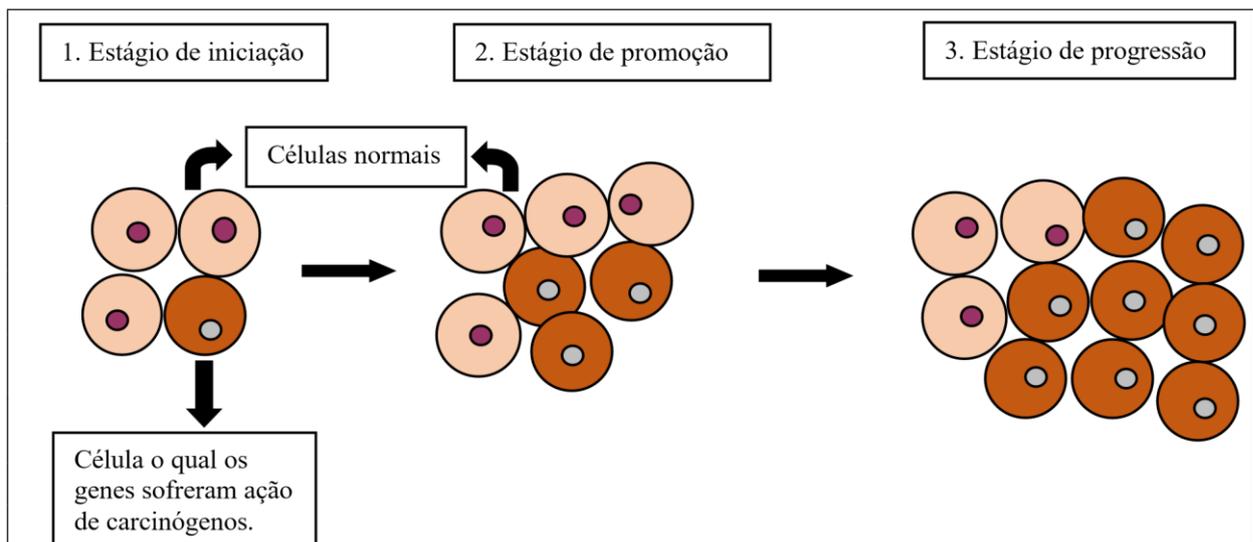


Figura 3: Passos iniciais para a oncogênese.
Fonte: Próprio autor.

2.4 FATORES DE RISCO

Os seres vivos estão constantemente sofrendo ação de elementos físicos, químicos e biológicos, quer como resultado de funções celulares normais ou de interações com o ambiente, seja com produtos naturais ou sintetizados, no qual o DNA apresenta uma grande vulnerabilidade por esses agentes (DÜSMAN *et al.* 2012). O DNA pode ser danificado de várias formas, dependendo do seu tipo de alimentação, bebidas ingeridas, ambiente que se habita ou até pela falta de práticas esportivas, todos esses exemplos citados fazem parte de um leque de possibilidades para o aparecimento de doenças, entre elas o câncer.

A dieta é um dos principais fatores na formação do câncer na espécie humana, sendo que entre as mortes por tumores malignos, 35% estão relacionadas com o hábito alimentar e

consumo de bebidas industrializadas. Dependendo da composição química do produto, da quantidade ingerida ou do modo de preparo, esses elementos podem se tornar o “gatilho” para o início das mutações celulares, aumentando os estágios de iniciação, promoção e propagação da neoplasia maligna (GARÓFOLO *et al.* 2004). Porém não podemos nos prender apenas ao hábito alimentar, pois outros fatores contribuem para o aumento dessa fração mutagênica, tais como a falta de atividade física que desencadeia o sedentarismo, o alcoolismo, drogas ilícitas e o consumo de cigarro (DÜSMAN *et al.* 2012). O consumo de bebidas alcoólicas de maneira não moderada pode favorecer o surgimento de câncer por diferentes mecanismos, por exemplo, aumentando o estresse oxidativo que pode causar danos nos genes, alteração do metabolismo hormonal e também má nutrição tecidual (INCA, 2021). A falta de atividade física pode desencadear o surgimento de doenças, o exercício físico de poucos minutos por dia pode ajudar no controle do peso corporal e estabelecer um bem-estar pessoal, dando mais disposição para o trabalho ou outras atividades e assim prevenir doenças mais graves como o câncer. O sedentarismo pode favorecer a aparição de alguns tipos de câncer, como o de cólon, fígado, mama e estômago, mesmo em pessoas com peso corporal adequado (PRADO, 2014). Os danos ao organismo humano provenientes do tabagismo não afetam apenas os que fumam, mas também as pessoas não fumantes que vivem sob poluição pela fumaça de cigarros nos ambientes diversos também são atingidas. Esses, os chamados fumantes passivos, que sofrem mais com a exposição à fumaça liberada (WÜNSCH, 2010). Isso se deve às mais de 4 mil substâncias tóxicas, no mínimo 60 delas são cancerígenas. Quando liberadas no ar, essas substâncias podem fazer com que os genes das células respiratórias sofram mutação (PRADO, 2014).

2.5 CICLO CELULAR E CÂNCER

Esse ciclo ocorre em estágios de crescimento e desenvolvimento, o qual ela necessita passar pelas fases: G1 (pré-síntese de DNA), S (síntese de DNA), G2 (pré-mitótica) e M (mitótica) para chegar ao seu amadurecimento. O ciclo celular é definido como a sequência de acontecimentos que levam ao crescimento e à divisão da célula, de forma contínua e repetitiva (MOREIRA, 2014). A proliferação celular é um processo coordenado, regulado e muito preciso, aos quais as células apresentam pontos de checagem que analisam se há algum erro no ciclo se houver erro e ele não for reparado, a célula entra em morte celular programada (Figura 4).

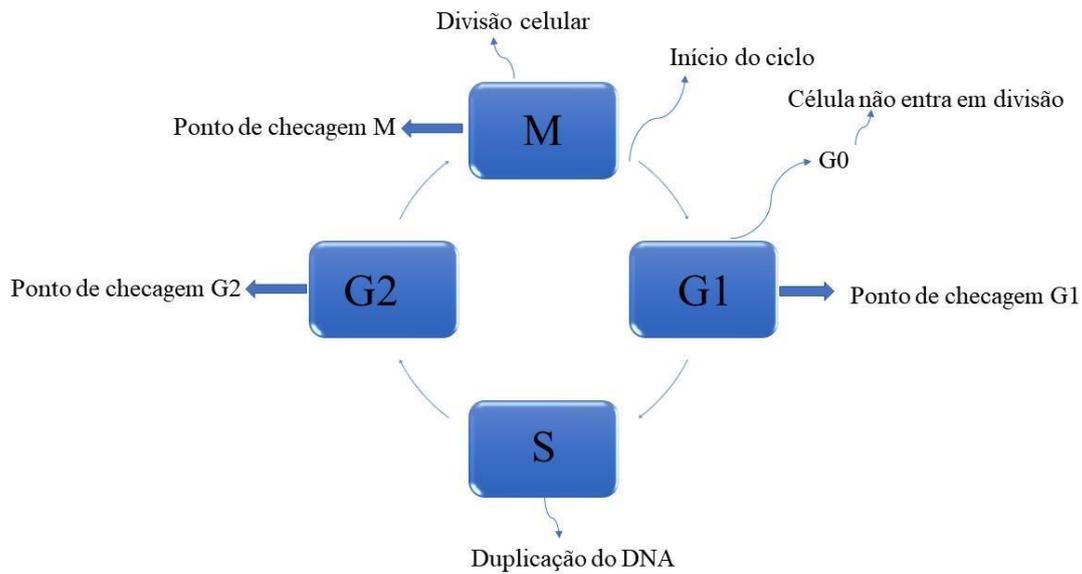


Figura 4: Ciclo celular Fonte: Próprio autor.

A desregulação do ciclo celular é uma característica comum do câncer humano. Nessa situação as células cancerosas frequentemente apresentam proliferação não programada, instabilidades genômica e cromossômica elevadas (MALUMBRES; BARBACID, 2009).

2.5.1 Morte celular e câncer

A morte celular é um mecanismo natural que ocorre tanto para remoção de células desnecessárias ou potencialmente prejudicadas, quanto em resposta a um grave dano ou lesões irreversíveis (PAROLIN; REASON, 2001). Esse processo é de grande utilidade para manter a homeostase corporal, pois se torna importante para o controle de vários distúrbios. É um dos principais alvos para a utilização de fármacos no controle de doenças, inclusive o câncer (KEPP *et al.* 2011). Vários estudos mostram que o desajuste nesse sistema de defesa está relacionado com o surgimento de neoplasias (ARAÚJO *et al.* 2019). Os dois principais tipos são a apoptose e a necrose, no qual podem ser desencadeados por estímulos diversos, porém existem outros processos, por exemplo, à autofagia.

2.5.2 Apoptose

A apoptose é um mecanismo de morte programada que as células realizam para evitarem a passagem de erros irreparáveis que possam ter ocorrido devido a fatores diversos, por exemplo, uma lesão, intoxicação ou outro agente causador, para as células futuras. Nesse processo a célula ativa um mecanismo de suicídio, ativando caspases e proteases no interior intracelular. A apoptose é desencadeada quando a célula se expõe a determinados estímulos fisiológicos, patogênicos ou citotóxicos (TOGNON; NUNES; CASTRO, 2013). Esse mecanismo é um processo fisiológico natural que pode ser induzido pela proteína p53, a qual é uma das responsáveis por controlar o ciclo celular. A p53 tem papel importante na indução da apoptose e no reparo do DNA, pois é um supressor de tumor que regula a proliferação celular (ARAÚJO, 2019). A expressão exacerbada da p53 pode tornar as células mais susceptíveis a morte celular quando tratadas, por exemplo, com agentes antineoplásicos (LANE, 1992; FANIDI *et al.* 1992).

A mutação no gene que codifica a proteína p53 faz com que ela fique incapaz de regular o ciclo celular, com isso os erros encontrados no DNA não serão desfeitos e a proliferação não será cessada, ocasionando o surgimento de clones malignos (FETT-CONTE; SALLES, 2002). As células em apoptose apresentam uma morfologia diferenciada em que são observadas com ajuda do microscópio estruturas características dessa morte programada, tais como: condensação e fragmentação do DNA, pregas na membrana citoplasmática e redução do volume celular (TOGNON; NUNES; CASTRO, 2013) (Figura 5).

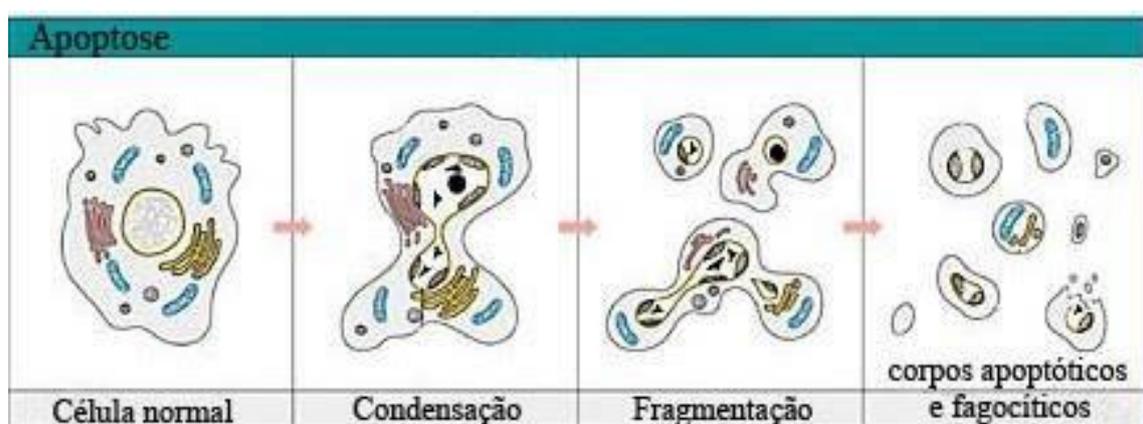


Figura 5: Característica morfológica de uma célula em apoptose. (Adaptado de ANGOSTO, 2003).

A apoptose pode ocorrer por duas vias diferentes: intrínsecas e extrínsecas. Ambas etapas levam a ativação de moléculas pró-apoptóticas, conhecidas como caspases. A via intrínseca ocorre na mitocôndria, sua ativação pode acontecer por estresse celular, devido por

exemplo a uma detecção de danos no DNA não reparados. Quando ocorre um sinal apoptótico o gene p53 mitocondrial libera estímulos para a liberação de citocromo c, que é uma pequena proteína que está associada a membrana interna da mitocôndria. Essa proteína é o agente promotor da apoptose (TEIXEIRA; GUARIENTO, 2010).

O citocromo c, no citosol, liga-se a duas proteínas, a APAF-1 (fator ativado de protease apoptótica -1) e a pró-caspase -9, essa se torna caspase -9 com sua ativação através da adenosina trifosfato (ATP), formando assim o complexo apoptossoma. Esse complexo ativará a prócaspase -3, -6 e -7 em caspases executoras -3, -6 e -7, que irão liberar substâncias apoptóticas para o início da morte programada (PAROLIN; REASON, 2001) (Figura 6).

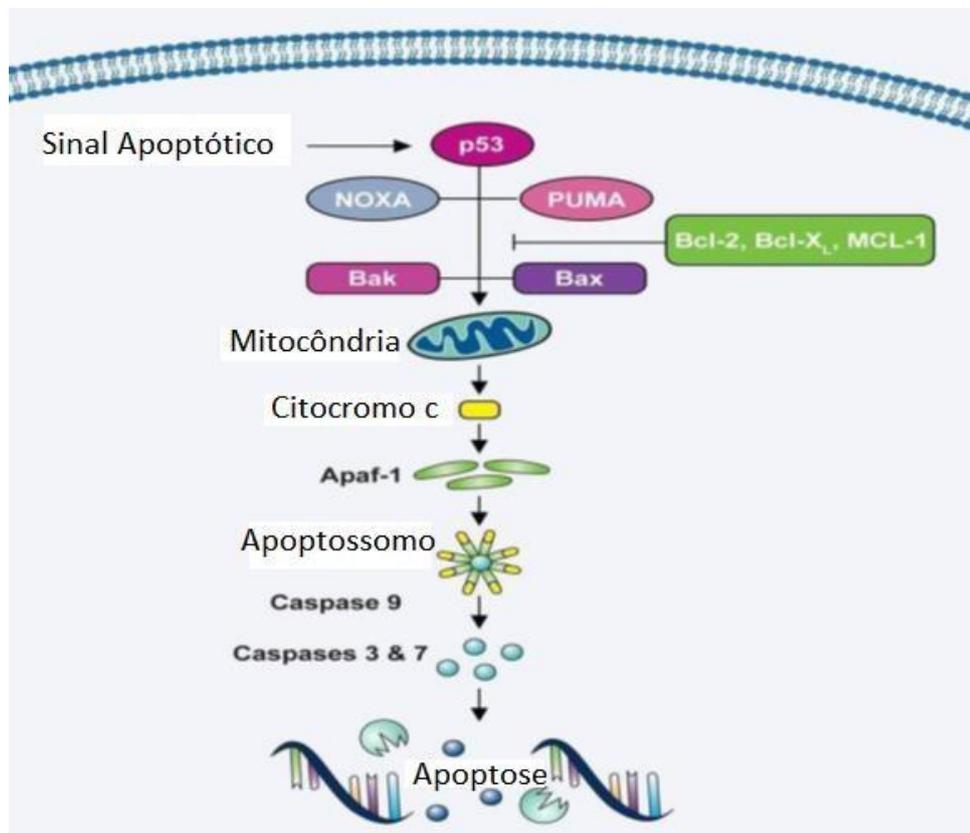


Figura 6 –Via mitocondrial da apoptose. Apaf-1, fator-1 ativador de protease apoptótica. Bak, Bcl-2 homólogos antagonistas; Bax, Bcl-2-associada proteína X; Bcl-2, linfoma de célula B-2; Bcl-xL, Bcl-2 linfoma extra grande; Mcl-1, Célula leucemia mieloide-1; PUMA, p53-proteína moduladora de apoptose. (Adaptado de <http://www.biooncology.com/research-education/apoptosis/>).

A apoptose está relacionada com a família Bcl-2, que são proteínas de membrana mitocondrial que participam modulando todas as formas de apoptose (GESKE; GERSCHENSON, 2001). Os membros dessa família são fatores cruciais na regulação da apoptose e podem ser divididos em moléculas pró-apoptóticas (BID, BAX, BAD, BAK, BIK, BIM, BOK, BCL-2, BCL-XL, PUMA, NOXA e HRK), que são proteínas ativadoras de caspases

apoptóticas e anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xl, Bfl-1, Bcl-w, Mcl-1, A1 e LMW5-hl), proteínas inibidoras de apoptose (FARIA *et al.* 2006).

A via extrínseca da morte celular programada é desencadeada graças aos ligantes de morte, por exemplo, o TNF, CD95L e o FASL que se ligam respectivamente aos seus receptores de membrana como TNFR1, CD95 e FAS (PETER; KRAMMER, 2003). A ligação entre receptores e ligantes promovem a ativação dos seus domínios de morte. Essas moléculas são conhecidas como FADD (domínio de morte associado ao FAS), e o TRADD (domínio de morte associado ao TNF), resultando em um complexo conhecido como DISC (complexo de sinalização indutor de morte). Esse, por sua vez, realiza a ativação de caspase -8 e/ou -10, que ativam caspase 3 diretamente ou clivam membros pró-apoptóticos da família Bcl-2, promovendo a liberação de citocromo c da mitocôndria (GUIMARÃES; LINDEN, 2004) (Figura 7).

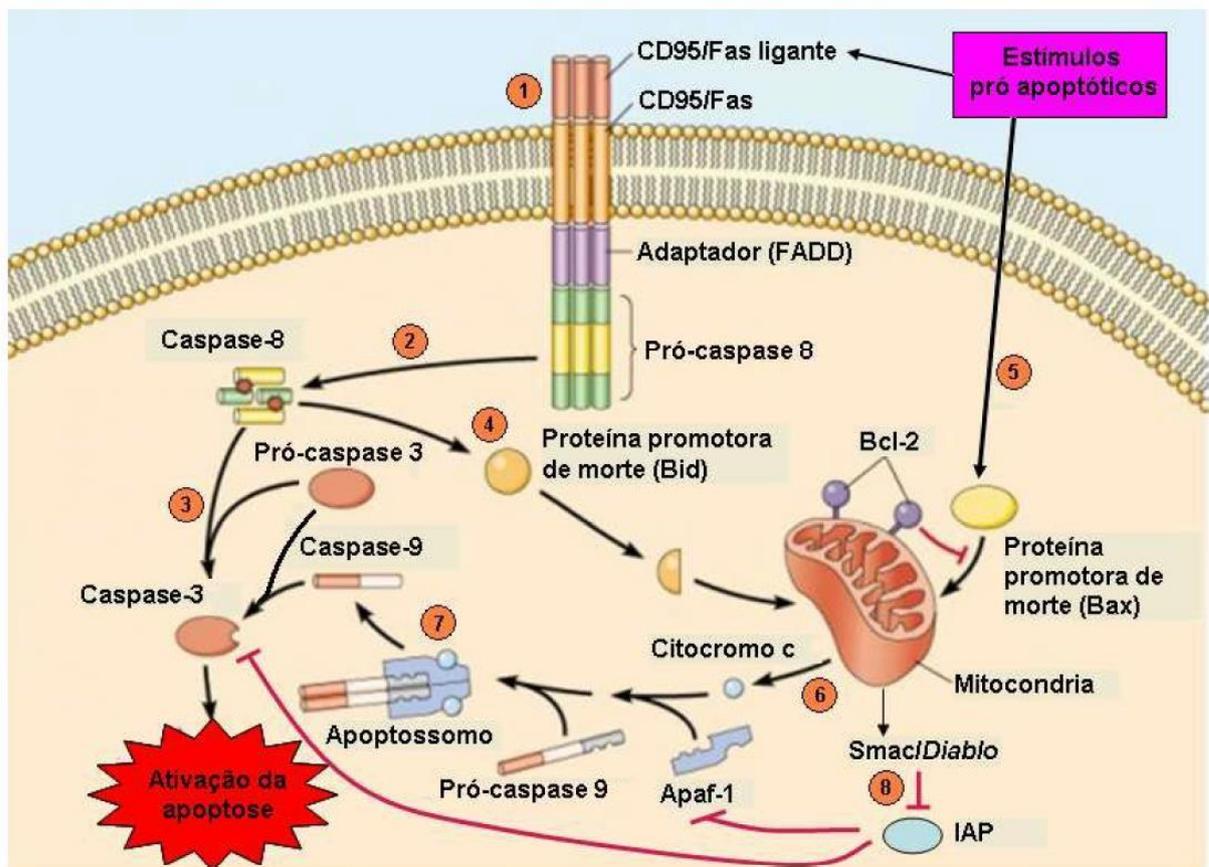


Figura 7: Via extrínseca da apoptose.

A apoptose desencadeada pela via extrínseca (1), também chamada de via receptor, envolve membros da superfamília de receptores de morte (CD95/Fas/Apo1 e TNF R1). Ligantes específicos sinalizam agregação e formação de um complexo indutor de morte que recruta pró-caspase (8 ou 10) através de proteínas de domínio de morte associadas ao receptor. O complexo formado pelo receptor, uma molécula adaptadora (FADD ou TRADD)

e pela pró-caspase é chamado de complexo DISC. O recrutamento da pró-caspase ao complexo DISC permite sua ativação. Uma vez ativada caspase 8 ou 10 (2), cliva a pró-caspase 3 tornando-a ativa (3) e pronta para clivar substratos específicos que induzem a apoptose celular. A via extrínseca pode interagir com a via intrínseca, potencializando o sinal apoptótico através da clivagem e ativação da proteína Bid (4), que facilita a ação da Bax e a formação do poro de transição mitocondrial. Já a apoptose desencadeada pela via intrínseca (5), também chamada de via mitocondrial envolve alterações sofridas na mitocôndria, geralmente ocorre em resposta a lesões de DNA e envolve a ativação de um membro pró apoptótico da família Bcl-2 (Bax, Bid). Membros anti (Bcl-2, Bcl-xL) e pró-apoptóticos (Bax, Bid) da família Bcl-2 regulam a liberação do citocromo c a partir da membrana mitocondrial interna (6). Este associa-se com Apaf-1, ATP e pró-caspase 9, formando o apoptossomo (7), que torna a caspase 9 ativa. A caspase 9, por sua vez, cliva a caspase 3 e a torna ativa. Após dano mitocondrial, a Smac/Diablo é liberada do espaço intermembrana para o citoplasma, juntamente com o citocromo c (8). A Smac/Diablo bloqueia a função da IAP (proteína inibidora da apoptose), impedindo assim que esta iniba a atividade das caspases 9 e 3. FONTE: (adaptado de <http://www.meduniwien.ac.at/pharmakologie/mitarbeiter/images/apoptosis.jpg>).

A Bcl-2 é uma família de proteínas que participa ativamente na regulação por indução ou por repressão da morte por apoptose indutoras e repressoras de morte por apoptose, um dos principais mecanismos de resistência utilizados pelas células cancerígenas envolve a participação de membros dessa família para controlar a integridade da membrana mitocondrial externa. A proteína Bcl-2 bloqueia a liberação de citocromo C pela mitocôndria após estímulo apoptogênico, impedindo a ativação de caspases indutoras de apoptose (REED *et al.* 1998; LUCHS; PANTALEÃO, 2010).

Torna-se cada vez mais necessário o aprofundamento nas pesquisas em relação a fatores pró e anti-apoptóticos, para confirmar ainda mais a relação entre apoptose e as defesas que as células cancerígenas apresentam para evitá-la (CHAUFFAILLE, 2005).

2.5.3 Necrose

A alternativa para a morte celular por apoptose é a necrose, que é considerada um processo tóxico em que a célula é uma vítima passiva e segue um modo de morte independente de energia (ELMORE, 2007). A necrose é um tipo de morte celular que se caracteriza por um aumento do volume celular, inchaço das organelas, ruptura da membrana plasmática e consequente perda do conteúdo intracelular. Alguns trabalhos mostram que a necrose apresenta um controle genético e é regulada por um conjunto de vias de transdução de sinal e mecanismos catabólicos (KROEMER *et al.* 2009). Esse tipo de morte é geralmente mediado por fatores patológicos externos, de maneira rápida e sem estímulos de reparos anteriores ao seu processo, apresenta um caráter agressivo e não fisiológico. Como exemplo de indução a necrose podemos citar a hipóxia, que é um mecanismo passivo característico desse tipo de morte (NETO; FERRAZ, 2000).

Quanto as principais alterações morfológicas que ocorrem com a necrose podemos citar a formação de vacúolos citoplasmáticos, formação de lisossomos inchados e rompidos, liberação das hidrolases lisossomais, e por fim a ruptura da membrana celular (TRUMP *et al.* 1997). A ruptura da membrana celular permite o extravasamento do conteúdo citoplasmático e a entrada do material extracelular. O rompimento celular induz uma resposta inflamatória local e fagocitose do tecido (PROSKURYAKOV; KONOPLYNNIKOV; GABAI, 2003) (Figura 8).

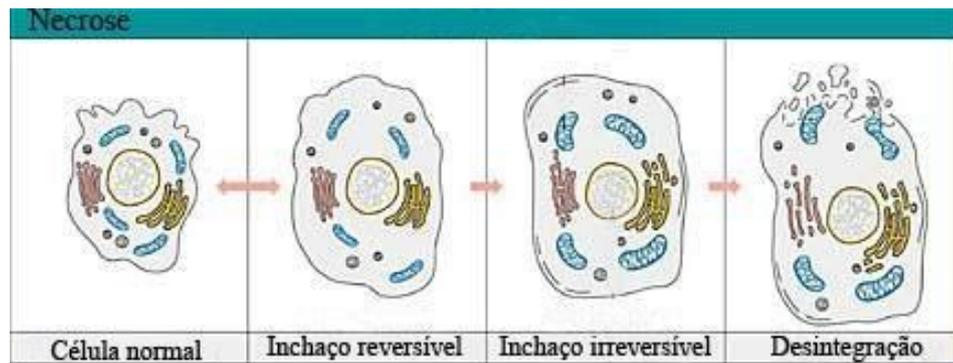


Figura 8: Característica morfológica de uma célula em necrose. (Adaptado de ANGOSTO, 2003).

2.5.4 Autofagia

É um processo de autodigestão de uma célula causada pela ação de enzimas lisossomais da mesma célula levando a degradação de estruturas citoplasmáticas. É um processo catabólico geralmente utilizado pela célula como um mecanismo de sobrevivência em condições de escassez de nutrientes. O vacúolo autofágico inicia-se através de uma estrutura pré-fagossômica (PAS). Nesse processo parte do citoplasma é inicialmente englobado por uma membrana de isolamento, formando o autofagossomo. O autofagossomo funde-se ao lisossomo formando o autolisossomo, e assim o conteúdo localizado no interior dessa estrutura é degradado pelas enzimas lisossomais (DENTON; NICOLSON; KUMMAR; 2012) (Figura 9).

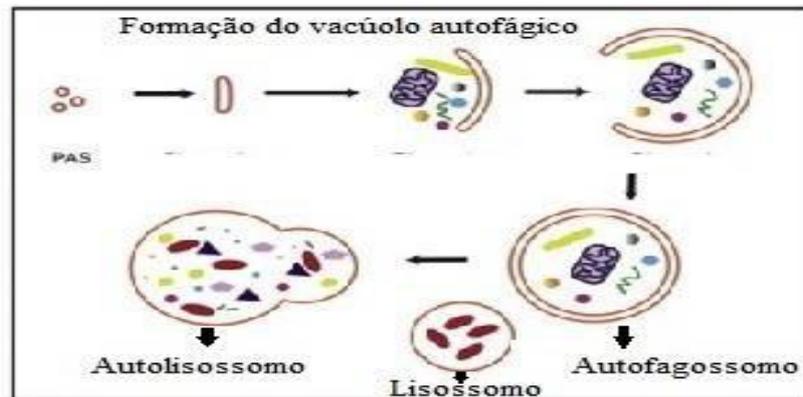


Figura 9: Característica morfológica de uma célula em autofagia. (adaptado de HURLEY; SCHULMAN. *Atomistic Autophagy: The Structures of Cellular Self-Digestion*, 2014).

A autofagia é uma via molecular central para a preservação da homeostase celular e do organismo. É um mecanismo fundamental na prevenção de tensões como um dos principais guardiões do controle de qualidade na célula (MANCIAS; KIMMELMAN, 2016; CONWAY, *et al.* 2020). O sistema autofágico serve como um “guarda” da homeostase, pois apresenta como uma das funções: preservar a integridade genômica de células quiescentes e em proliferação nos tecidos (HEWITT; KOROLCHUK, 2017). Geralmente impede a transformação neoplásica de células saudáveis (GALLUZZI, *et al.* 2015). Em apoio a esta noção, as intervenções farmacológicas ou genéticas que dificultam o fluxo autofágico resultam no aparecimento de lesões neoplásicas precoces em uma variedade ou modelos pré-clínicos (GALLUZZI, *et al.* 2015). Assim, é provável que a autofagia em células saudáveis opere como um mecanismo supressor de tumor para neutralizar os efeitos de estímulos pró-oncogênicos (RYBSTEIN, *et al.* 2018). Apoiando este conceito, a ativação da autofagia parece ser uma etapa essencial para a ativação do programa de senescência induzida por oncogene (YOUNG, *et al.* 2009). No entanto, esse ponto de vista reducionista precisa ser enquadrado em um cenário mais complexo, no qual a real contribuição da autofagia para a biologia do câncer depende de vários aspectos, incluindo tipo de tumor, estágio da doença e fatores do hospedeiro (SANTANA-CODINA, *et al.* 2017).

Apoptose, necrose e autofagia apresentam características e processos diferentes; no entanto, ainda existem inter-relações entre eles (AMELIO; MELINO; KNIGHT, 2011) (Quadro 1).

Tipos de Morte celular	Fatores Morfológicos	Características Bioquímicos
Apoptose	Arredondamento da célula. Retração de pseudópodes. Redução do volume celular e nuclear (picnose). Fragmentação nuclear (cariorrexe). Modificação menor de organelas citoplasmáticas. Bolha da membrana plasmática. Envolvimento por fagócitos residentes, in vivo.	Estímulos indutores fisiológicos e patológicos. Ativação de proteína pró-apoptóticas como as da família Bcl-2 (ex: Bax, Bad, Bid, etc). Presença de caspases.
Necrose	Edema citoplasmático (oncoses). Ruptura da membrana plasmática. Edema das organelas citoplasmáticas. Condensação moderada da cromatina.	Estímulos patológicos. Ausência de caspases. Processos inflamatórios. Aumento na geração de ROS. Liberação de enzimas do lisossomas.
Autofagia	Falta de condensação da cromatina. Vacuolização maciça do citoplasma. Acúmulo de vacúolos autofágicos (de membrana dupla). Pouca ou nenhuma captação pelas células fagocíticas, in vivo.	Estímulos indutores fisiológicos e patológicos. Degradação de P62. Conversão do LC3-I em LC3-II.

Quadro 1: Modalidades distintas de morte celular com suas características e processos.

2.6 ALVOS NA TERAPIA ANTICÂNCER E USO DE TÉCNICAS EM BIOLOGIA MOLECULAR

Proteínas da mitocôndria em geral, e em particular da família Bcl-2, são novos alvos promissores na terapia do câncer devido ao seu papel central na regulação de apoptose, bem como a sua importância no desenvolvimento de resistência a quimioterapia. A morte celular programada ou apoptose, descrita por Kerr e colaboradores em 1972, caracteriza-se por alterações fenotípicas clássicas, tais como: diminuição do volume celular e nuclear,

condensação e marginação da cromatina, formação de bolhas (blebbings) na membrana celular, fragmentação do DNA e do núcleo, formação e liberação dos corpos apoptóticos que são fagocitados por células adjacentes.

A maioria das alterações morfológicas observadas por Kerr são causadas por uma série de cisteína proteases ativadas durante o processo apoptótico (KERR, 1972). Essas proteases fazem parte da família das caspases, que uma vez ativadas clivam diversos alvos na célula como o DNA, a laminina nuclear e gelsolina, uma proteína do citoesqueleto da célula (HENGARTNER, 2000).

As caspases estão na forma inativa dentro da célula e para serem ativadas é necessário aplicação de um indutor de morte celular via receptor de membrana (chamada via extrínseca) ou um dano na célula induzido seja por radicais livres, radiação, substâncias que causem lesão no DNA, entre outros, ativando a via intrínseca da apoptose (HENGARTNER, 2000). Na via extrínseca, a caspase 8 trabalha como iniciadora do processo apoptótico, já na via intrínseca a caspase 9 faz esse papel. Ambas as vias ativam caspases efetoras, caspase 3 e 7 que medeiam a clivagem de substratos.

A família do Bcl-2 regula o processo apoptótico, pois possui como membros do grupo tanto proteínas pro-apoptóticas, como o BAX e BAK, quanto proteínas anti-apoptóticas, como o Bcl-2 e Bcl-xl. De forma geral, a indução de proteínas pro-apoptóticas resulta em ativação de caspases, enquanto um aumento de proteínas antiapoptóticas, como BCL2 inibe a liberação caspases, bloqueando a apoptose (HENGARTNER, 2000; COTTER, 2009). Já a família das inibidoras da apoptose (IAPs) se ligam diretamente e inibem a pró-caspase e caspase bloqueando a sinalização apoptótica. A inibição da XIAP e survivina, membros da família IAP, é um possível mecanismo para indução de apoptose e tratamento do câncer, já que essa proteína está super-expressa em vários tipos de cânceres (FESIK, 2005).

Todas essas vias anti-apoptóticas tornam-se alvos interessantes na pesquisa de fármacos que podem ser estudadas utilizando técnicas em biologia molecular, já que se tratam de mecanismos que muitas vezes estão super-expressos nas células tumorais.

Para pesquisar tais vias, pretende-se utilizar a linhagem HL-60, visto que, está entre os modelos celulares de origem mielóide mais amplamente utilizados para estudo de mecanismo de ação (COLLINS *et al.* 1977; COLLINS, 1987).

2.7 TRATAMENTO DO CÂNCER

Como já citado anteriormente, existem diversas formas de tratamento para as neoplasias malignas, mas nem sempre existe êxito no procedimento. Após o diagnóstico da doença, o médico discutirá com o paciente as opções de tratamento, que dependerão do tipo e do estágio do tumor, da localização, do estado de saúde geral do paciente e dos possíveis efeitos colaterais. A cirurgia é o método mais antigo e mais definitivo quando o tumor se encontra nas condições anatômicas mais favoráveis, sendo um meio simples e seguro para remoção de tumores sólidos, quando esses estão confinados a um local anatômico de origem. Entretanto, no caso de algumas neoplasias sólidas, a maioria dos pacientes já apresentam a doença metastática, dificultando esse procedimento (SALMON; BERTINO, 1996).

A radioterapia é uma modalidade terapêutica para o tratamento local do câncer. Porém, nesse processo as células normais que se encontram próximas ao tumor também são atingidas por esse tipo de terapia. Esse procedimento causa uma morbidade menos aguda e pode ser curativa para alguns locais específicos, enquanto preserva a estrutura e funcionamento de um órgão ou tecido. Na maioria das situações, o tratamento radioterápico é bem tolerado, suas reações são dependentes da região em que está sendo realizada e da dose aplicada (SALMON; BERTINO, 1996; SANTOS *et al.* 2010).

A terapia biológica, também chamada de imunoterapia, tem como função ajudar o sistema imunológico a reconhecer uma célula neoplásica maligna e atacá-la. Esse procedimento inclui além do transplante de medula óssea, o uso de modificadores de resposta biológica como os anticorpos monoclonais e agentes como ácido retinóico que podem fazer com que as células tumorais sofram diferenciação e se tornem inofensivas (GIACOMINI; MENEZES, 2012).

Uma das etapas imprescindíveis no tratamento do câncer é a quimioterapia no qual a utilização de fármacos visa impedir a proliferação das células tumorais. Nos últimos anos, a aplicação da quimioterapia tem conseguido êxitos notáveis na cura de algumas formas de cânceres disseminados tais como a leucemia aguda infantil, distintos tipos de linfomas, e alguns tipos de tumores sólidos. Ao contrário, a melhora no tratamento sistêmico de tumores mais frequentes em adultos (pulmão, mama, cólon e pâncreas) não sofreu grandes avanços, resultando em altos índices de mortalidade dentre os pacientes. Há, portanto, uma clara e urgente necessidade de identificar, avaliar e desenvolver novos e mais eficientes fármacos para o tratamento de tais cânceres.

2.8 QUIMIOTERÁPICOS

Popularmente, o termo refere-se à quimioterapia antineoplásica, um dos tratamentos do câncer, no qual são utilizadas medicações químicas antineoplásicas (EINSTEIN, 2021). É um tipo de procedimento em que se utilizam medicamentos sintéticos para combater o câncer. Esses medicamentos se misturam com o sangue e são levados a todas as partes do corpo, destruindo as células mutadas que estão formando o tumor e impedindo que as mesmas se espalhem. Os medicamentos podem ser utilizados de maneiras diversas dependendo do tipo de doença que se faz o tratamento, ele pode ser administrado por via oral, intravenosa, intramuscular, subcutânea, intratecal e tópica (INCA, 2021). Essa forma de tratamento é a que possui maior incidência de cura de muitos tumores incluindo os mais avançados, e a que mais aumenta a sobrevida dos portadores de câncer. Utiliza agentes químicos que interferem no processo de crescimento, divisão celular e metástase, podendo ser usados tanto isolados como em combinação com a finalidade de eliminar células tumorais do organismo (ANDRADE; SILVA, 2007; BONASSA; SANTANA, 2005).

Porém os quimioterápicos não agredem apenas as células tumorais. As estruturas corporais, entre elas as células normais, também sofrem com esse método de cura. Entre os efeitos colaterais da maioria das drogas antineoplásicas há aqueles que trazem prejuízo para as condições nutricionais do paciente, gerando deficiências nutricionais ao promoverem anorexia, estomatite, distúrbios das vias alimentares, alterações do paladar, náuseas, vômitos, diarreia e aversões a alimentos específicos (FERREIRA; SCARPA; SILVA, 2008). Vários são os estudos moleculares que estão em fase investigativa com a utilização de compostos sintéticos que possam apresentar ação contra as células cancerígenas. Essas pesquisas procuram alvos seletivos que induzam a morte das células tumorais malignas, por exemplo: através da inibição da angiogênese e/ou que sejam indutoras de apoptose (BERNARDI; JACQUES; LENZ, 2003).

2.9 TIOSSEMICARBAZIDA

As tiossemicarbazidas ($\text{NH}_2\text{-NH-CSNH}_2$) apresentam uma grande facilidade de se ligarem a outras moléculas químicas, são os derivados mais simples da hidrazina do ácido tiocarbâmico e não são apenas compostos de transição, mas também compostos orgânicos muito eficazes que possuem no seu núcleo básico carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre, onde os átomos de hidrogênio podem ser substituídos por grupos alquila ou arila (Figura 10).

O comportamento químico da tiosemicarbazida é semelhante ao de sua semicarbazida correspondente, no entanto, é de adaptabilidade química superior do grupo tiona em comparação com o do grupo ceto, e é responsável por comportamento mais diverso da tiosemicarbazida. Devido à existência de vários centros reativos, esses compostos são precursores convenientes para a síntese de compostos heterocíclicos contendo nitrogênio e enxofre, como pirazóis, tiazóis, tiadiazóis, tiadiazinas, triazóis, pirimidinas, triazinas, pirazóis (ACHARYA, *et al.* 2021). Dessa forma, as tiosemicarbazidas têm chamado a atenção de diversos pesquisadores para o desenvolvimento de novos fármacos.

Na literatura já conhecemos compostos que apresentam a porção tiosemicarbazida com atividades anticonvulsivantes, antivirais, antiinflamatórias, antibacterianas, antimicobacterianas, antifúngicas, antioxidantes e anticâncer. Entre as atividades mais estudadas das tiosemicarbazidas e de seus derivados encontra-se a ação anticancerígena, devido à sua habilidade de inibir a biossíntese de DNA, possivelmente pelo bloqueio da enzima ribonucleotídeo difosfato redutase por meio da sua ligação com as bases nitrogenadas. Essa ligação dificulta ou mesmo bloqueia definitivamente a replicação dessas bases, criando lesões nas fitas de DNA por ruptura oxidativa (SARKIS; AHMED, 2010; SINGH; AWASTHI, 1985). Essa habilidade da porção tiosemicarbazida está intrinsecamente associada à natureza dos seus átomos de nitrogênio e ao enxofre, que são bons doadores de elétrons, podendo mesmo exercer suas interações nos sistemas biológicos pela complexação de metais ou pela associação de resíduos de aminoácidos, afetando a funcionalidade de enzimas fundamentais à replicação celular (YOUSEF *et al.* 2011). Além disso, a atividade anticâncer está relacionada com a inibição da maturação e proliferação das células neoplásicas em diversos tipos de câncer (KÜÇÜKQÜZEL; COSKUN, 2016). Alguns compostos que apresentam a porção tiosemicarbazida em sua estrutura foram avaliados quanto a sua atividade antitumoral *in vitro* em algumas linhagens de células tumorais malignas, entre elas, carcinoma hepatocelular (HePG2), carcinoma de mama (MCF-7), adenocarcinoma de pulmão (A549), carcinoma de próstata humano (PC3), carcinoma colorretal (HCT-116) e carcinoma cervical (Hela). A partir dos resultados obtidos, foi visto que a maioria dos derivados que apresentam a porção tiosemicarbazida apresentaram potencial anticâncer contra todas as linhagens de células cancerosas testadas (ACHARYA, *et al.* 2021).

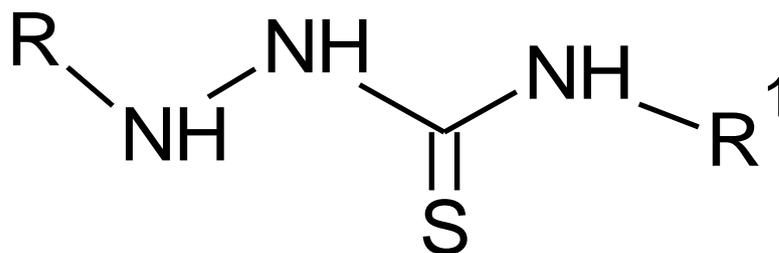


Figura 10: Porção tiossemicarbazida

Fonte: Elaborado pelo autor.

Uma vez que a síntese de derivados tiossemicarbazídicos é relativamente simples e sendo os mesmos substratos para a obtenção de muitas outras classes de substâncias de importância biológica, há um constante interesse pelo planejamento, síntese e avaliação biológica de novas séries de compostos pertencentes a essa classe. Entretanto, o maior problema a ser considerado no desenho de novas moléculas é a associação da porção tiossemicarbazida a outros grupos farmacofóricos ou que possuam características estruturais que lhes permitam promover interação mais efetiva com os sistemas biológicos.

A introdução do grupo N^α-(2,4-dinitrofenil) faz parte de uma estratégia de modificação estrutural no aminoácido visando inicialmente a proteger o grupo amino e, ao mesmo tempo, introduzir um substituinte para o qual estudos prévios indicam papel importante nas interações com sistemas biológicos (AGRAWAL; SARTOREELI, 1978; WUJEC, *et al.* 2009; GONZALEZ *et al.* 2010).

Com base nessa perspectiva, recorre-se à estratégia de hibridação molecular para propor uma nova série de derivados N^α-(2,4-dinitrofenil) aminoácido tiossemicarbazídicos, como potenciais compostos antitumorais. A construção da porção tiossemicarbazida a partir de um aminoácido pode ser feita a partir de reações do grupo carbonila, em três etapas de síntese, viabilizando a obtenção de uma biblioteca de compostos diversificada para os estudos de atividade.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial anticâncer de novos derivados tiossemicarbazídicos da glicina, fenilalanina e triptofano através de estudo do mecanismo de ação como a apoptose e necrose, selecionando assim moléculas bioativas inéditas com capacidade anticâncer e potencialidade para o estabelecimento de publicação.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar a citotoxicidade *in vitro* dos compostos em linhagens não tumorais e tumorais.
- b) Avaliar a viabilidade celular pelo método de exclusão do azul de tripan e realizar uma análise morfológica após coloração por May-Grunwald-Giemsa.
- c) Investigar a integridade da membrana celular e fragmentação do DNA por citometria de fluxo.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, P. T. BHAVSAR, Z. A.; JETHAVA, D. J.; PATEL, D. B.; PATEL, H. D. A review on development of bio-active thiosemicarbazide derivatives: Recent advances. **Journal of Molecular Structure**, v.1226, n.3, p.129268, Apr, 2021.
- AGRAWAL, K. C.; SARTORELLI, A. C. The chemistry and biological activity of alpha - (N)heterocyclic carboxaldehyde thiosemicarbazones. **Prog. Med. Chem.** v.15, n.4, p.321-56, Oct, 1978.
- AGUIRRE, G.; BOIANI L.; CERECETTO, H.; FERNÁNDEZ, M.; GONZÁLEZ, M.; DENICOLA, A.; OTERO, L.; GAMBINO, D.; RIGOL, C.; OLEA-AZARD, C.; FAUNDEZ, M.; *in vitro* activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v.12, n.18, p.4885–4893, Jan, 2004.
- ALAGARSAMY, V.; KUMAR, B. A.; PARTHIBAN, P.; SHEOREY, R. V.; SOLOMON, V. R. Synthesis and antibacterial activity of some novel 1-(4-oxo-3-(3-methoxyphenyl)-3Hquinazolin-2-yl)-4-(substituted) thiosemicarbazides. **Journal Anti-Infective Agents**. v.10, n.2, p.105-110, Aug, 2012.
- AMELIO, I.; MELINO, G.; KNIGHT, R. A. Cell death pathology: cross-talk with autophagy and its clinical implications. **Biochem. Biophys.** v.414, n.2, p.277–281, Feb, 2011.
- ANDRADE, M.; SILVA, S. R. Administração de quimioterápicos: uma proposta de protocolo de enfermagem. **Rev. Bras. Enferm.** v.60, n.3, p.331-335, Set, 2007.
- ANGOSTO, M. C. Bases moleculares de la apoptosis. **Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia**, v.69, n.1, p.36-64, Jun, 2003.
- ARAÚJO, G. L. S.; PARRELA, A. F. B.; BORGES, J. M. S.; TRINDADE, J V F.; SOUZA, L T JÚNIOR, M F. Apoptose como perspectiva de cura do câncer: **Braz. J. Surg. Clin. Res.** v.28, n.2, p.32-35, Set, 2019.
- BERNARDI, A.; JACQUES-SILVA, M. C.; LENZ, G. Abordagem molecular no desenvolvimento de fármacos anti-tumorais. **Infarma**. v.15, n.9-10, p.61-64. Dec, 2003.
- BONASSA, E. M.A.; SANTANA, T. R. **Enfermagem em terapêutica oncológica**. 3ª ed. São Paulo: Editora Atheneu; p.03-15, 2005.
- CARVALHO, M. M. Imunologia, estresse, câncer e o programa Simonton de auto-ajuda. **Academia Paulista de Psicologia**, v.10, n.1, p. 27-30, Oct, 2000.

CHAUFFAILLE, M. L. L. F. A propósito da apoptose em LMC: estudos promissores: **Rev. Bras. Hematol. hemoter.** v.27, n.2, p.79-82, Mar, 2005.

CHECHINEL, F. V. Produtos Naturais e Sintéticos com potencial terapêutico: 15 anos de estudos realizados no núcleo de investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR)/UNIVALI: **Revista Fitos.** v.4, n.2, p.06-23, dez. 2009.

COLLINS, S. J.; GALLO, R. C.; GALLAGHER, R. E. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. **Nature.** v.24, n.270, p.347-349, Jan, 1977.

COLLINS, S.J. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. **Blood.** v.70, n.6, p.1233-1244, Apr, 1987.

CONWAY, O.; AKPINAR, H. A.; ROGOV, V. V.; KIRKIN, V. Selective autophagy receptors in neuronal health and disease . **J. Mol. Biol.** v.432, n.4, p.2483–2509, May, 2020.

COTTER, T.G. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. **Nature Reviews Cancer.** v.9, p.501-507. jul. 2009.

DARZYNKIEWICZ, Z., BRUNO, S., DEL BINO, G., GORCZYCA, W., HOTZ, M. A., LASSOTA, P., TRAGANOS, F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. **Cytometry.** v.13, n.2, p.795-808, Set, 1992.

DENTON, D.; NICOLSON, S KUMAR, S. Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. **Cell Death and Differentiation.** v.19, n.4, p.87–95. Jul, 2012.

DÜSMAN, E.; BERTI, A. P.; SOARES, L C.; VICENTINI, V. E. P. Principais agentes mutagênicos e carcinogênicos de exposição humana. SaBios: **Rev. Saúde e Biol.**, v.7, n.2, p.6681, Nov, 2012.

EINSTEIN, <<https://www.einstein.br/especialidades/oncologia/examestratamentos/quimioterapia>>. Acesso em 10 de outubro de 2021.

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

FARIA, M. H. G., PATROCÍNIO, R. M. S. V.; FILHO, M. O. M.; RABENHORST, S. B. R. Expressão das proteínas Bcl-2 e BAX em tumores astrocíticos humanos: **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v.42, n.4, p.271-278, Out, 2006.

FANIDI, A.; HARRINGTON, E. A.; EVAN, G. I. Cooperative interaction between c-myc and Bcl-2 proto oncogenes. **Nature**. v.359, n.5, p.554-556, Jan, 1992.

FERREIRA, N. M. L. A.; SCAROA, A.; SILVA, D. A. Quimioterapia antineoplásica e nutrição: uma relação complexa. **Rev. Eletr. Enf.** v.10, n.4, p.1026-1034. Set, 2008.

FETT-CONTES, A. C.; SALLES, A. B. C. F. A importância do gene p53 na carcinogênese humana: **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.24, n.2, p.85-89, Mar, 2002.

FNC, Fundação Nacional do Câncer. Disponível em: <<https://agenciabrasil.ebc.com.br/radioagencia-nacional/saude/audio/2021-02/diamundial-do-cancer-brasil-registra-280-mil-obitos-anuais>>. Acesso em: 02 de junho de 2021.

GALLUZI, L.; PIETROCOLA, F.; BRAVO-SAN, P. J. M.; AMARAVADI, R. K.; BAEHRECKE, E. H.; CECCONI, F.; CODOGNO, P.; DEBNATH, J.; GEWIRTZ, D. A.; KARANTZA, V. *et al.* Autophagy in malignant transformation and cancer progression. **The Embo Journal**. v.34, n.7, p.856–880, Oct, 2015.

GARÓFOLO, A.; AVESANI, C. A.; CAMARGO, K. G.; BARROS, M E.; SILVA, S R J.; TADDEI, J A A.; SIGULEM, D M. Dieta e câncer: um enfoque epidemiológico. **Rev. Nutr. Campinas**, v.17, n.4, p.491-505, Out, 2004.

GCO, Observatório global do câncer. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?single_unit=500000>. Acesso em: 14 de junho de 2021.

GESKE, F. J.; GERSCHENSON, L. E. The biology of apoptosis. **Human Pathology**, v.32, n.10, p.1029-1038, Jan, 2001.

GIACOMINI, G.; MENEZES, H. Técnicas e perspectivas em imunoterapia do câncer. **Saúde e Pesquisa**, v.5, n.3, p.567-578, Fev, 2012.

GONZALEZ, M. S.; De Brasi, C.D.; BIANCHINI, M.; GARGALLO, P.; MOIRAGHI, B.; BENGIO, R.; LARRIPA, I. BAX/BCL-XL gene expression ratio inversely correlates with disease progression in chronic myeloid leukemia. **Blood Cells Mol. Dis.** v.45, n.3, p.192-196, Mar, 2010.

GUIMARÃES, C. A.; LINDEN, R. Programmed Cell Deaths. Apoptosis and Alternative Deathstyles: **European Journal of Biochemistry**, v.271, n.9, p.1638-1650, Dec, 2004.

HANAHAN, D.; WEINBERG, A. R. The hallmarks of cancer. Review. **Cell**. v.100, n.1, p.5770, Oct, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks Of cancer: the next generation, **Cell**. v.144, n.2, p.646–674, Apr, 2011.

HE, J.; WANG, X.; ZHAO, X.; LIANG.; Y. HE, H.; FU, L. Synthesis and antitumor activity of novel quinazoline derivatives containing thiosemicarbazide moiety. **European Journal Medicinal Chemistry**. v.54, n.4, p.925-930, Aug, 2012.

HENGARTNER, M. The biochemistry of apoptosis. **Nature**. v.407, n.1, p.770–776, Set, 2000.

HEWITT, G.; KOROLCHUK, V. I. Repair, reuse, recycle: the expanding role of autophagy in genome maintenance. **Trends Cell Biol**. v.27, n.6, p.340–351, Oct, 2017.

INCA, Instituto Nacional do Câncer, Brasil. Disponível em: [<https://www.inca.gov.br/o-quee-cancer>](https://www.inca.gov.br/o-quee-cancer). Acesso em: 17 de Maio de 2021.

INCA, Instituto Nacional do Câncer, Brasil. Disponível em: [<https://www.inca.gov.br/tratamento/quimioterapia>](https://www.inca.gov.br/tratamento/quimioterapia). Acesso em: 17 de Setembro de 2021.

INCA, Instituto Nacional do Câncer, Brasil. Disponível em: [<https://www.inca.gov.br/tratamento>](https://www.inca.gov.br/tratamento). Acesso em: 17 de setembro de 2021.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: [<https://www.inca.gov.br/estimativa/estado-capital/brasil>](https://www.inca.gov.br/estimativa/estado-capital/brasil). Acesso em: 14 de junho de 2021.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/causas-eprevencao/prevencao-e-fatores-de-risco/bebidas-alcoolicas> >. Acesso: 26 de outubro de 2021.

KEPP, O.; GALLUZZI, L.; LIPINSKI, M.; YUAN, J.; KROEMER, G. Cell death assays for drug Discovery: **Nat. Ver. Drug. Discov**, v.10, n.3, p.221–237, Feb, 2011.

KERR, J.F.R.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R.; Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**. v.4, n.4, p.239–257. Jan, 1972.

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, Mar, 2009.

KÜÇÜKQÜZEL, Ş. G.; COSKUN, G. P. Macromolecular Drug Targets in Cancer Treatment and Thiosemicarbazides as Anticancer Agents. **Anticancer Agents Med. Chem.** v.16, n.10, p.1288-300, Oct, 2016.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; ASTER, J. **Robbins e Cotran – Patologia – Bases Patológicas das Doenças**. Tradução 9ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

LANE, D. P. P53, Guardian of the genome. **Nature.** v.358, n.2, p.15-16, May, 1992.

LEITE, A. C. L.; LIMA, R. S.; MOREIRA, D. R. M.; CARDOSO, M. V. O.; BRITO, A. C. G.; SANTOS, L. M. F.; HERNANDES, M. Z.; KIPERSTOK, A. C.; LIMA, R.S.; SOARES, M. B. P. Synthesis, docking, and in vivo activity of thiosemicarbazones, aminoacylthiosemicarbazides and acyl-thiazolidones against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorg. Med. Chem.** v.14, n.8, p.3749-3757, Set, 2006.

LUCHS, A.; PANTALEÃO, C. Apoptose e modelos *in vivo* para estudo das moléculas relacionadas a este fenômeno: **J. Einstein**, v.8, n.4, p.495-497, May, 2010.

LUO, J.; SOLIMINI, N. L.; ELLEDGE, S. J. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Nononcogene. Review. **Cell**, v. 136, n. 6, p. 823-837, Dec, 2009.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nat. Rev. Cancer**, v.9, n.3, p.153–166, Nov, 2009.

MANCIAS J. D.; KIMMENMAN, A. C. Mechanisms of selective autophagy in normal physiology and cancer. **J. Mol. Biol.** v.428, n.4, p.1659–1680, Jul, 2016.

MILITÃO, G. C. G., DANTAS, I. N. F., PESSOA, C., FALCÃO, M. J. C., SILVEIRA, E. R., LIMA, M. A. S., CURI, R., LIMA, T., MORAES, M. O., COSTA-LOTUFO, L. V. Induction of apoptosis by pterocarpanes from *Plastymiscium foribundum* in HL-60 human leukemia cells. **Life Sci.**, v.78, n.4, p.2409-2417, Mar, 2006.

MOREIRA, C. Ciclo Celular: **Rev. Ciência Elementar**, v.2, n.4, p.249, Dec, 2014.

MS, Ministério da saúde. Disponível em: <[https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abc do cancer.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abc_do_cancer.pdf)>. Acesso em 30 de agosto de 2021.

MS, Ministério da Saúde. Disponível em: <

NCI, National Cancer Institute. Disponível em: <https://www.cancer.gov/aboutcancer/understanding/what-is-cancer#definition>. Acesso em: 17 de Maio de 2021.

NETTO, F. A. C. S.; FERRAZ, E. M. Apoptose, neutrófilos e o cirurgião: **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**. v.28, n.1, p.56-61, jul.2000.

PAROLIN, M. B.; REASON, I. J. M. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares: **ARQGA / 976**. v.38, n.2, p.138-144, jun. 2001.

PETER, M.; KRAMMER, P. The CD95 (APO-1 / Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ*: **Rev. nature**. v.10, n.1, p.26-35, jan.,2003.

Policies and managerial guidelines for national cancer control programs: **Rev. Panam. Salud. Pública**. v.12, n.5, p.366-370, nov. 2002.

PRADO, BERNARDETE BISI FRANKLIN. Influência dos hábitos de vida no desenvolvimento do câncer. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v.66, n.1, p.21-24, Mar, 2014.

PROSKURYAKOV, S. Y.; KONOPLYNNIKOV, A. G.; GABAI, V. L. Necrosis: a specific form of programmed cell death? **Experimental Cell Research**. v.283, n.1, p.1-16, Set, 2003.

REED, J.C.; JURGENSMEIER, J.M.; MATSUYAMA, Y. 1998. Bcl-2 family proteins and mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**. v.281, n.1-2, p.127137, Oct, 1998.

ROY, P.; SAIKIA, B. Cancer and cure: A critical analysis: **Indian J. Cancer**. v.53, n.3, p.441442, Apr, 2016.

RYBSTEIN, M. D.; BRAVO-SAN, P. J. M.; KROEMER, G.; GALLUZZI, L. The autophagic network and cancer. **Nat. Cell Biol**. v.20, n.3, p.243–251, May, 2018.

SALMON, S. E.; BERTINO, J. R. **Fundamentos da Terapia do Câncer**. 20ª edição, editora Guanabara Koogan, v.1, p.1145-1147, 1996.

SANTANA-CODINA, N.; MANCIAS, J.D KIMMELMAN, A. C. The role of autophagy in cancer. **Annu. Rev. Cancer Biol**. v.1, p.19–39, Oct, 2017.

SANTOS, M. G.; SILVA, L. C. F.; LINS, C. A.; PASSOS, D. D.; OLIVEIRA NETO, J. N.; SANTOS, T. S. Fatores de risco em radioterapia de cabeça e pescoço. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v.58, n.2, p.191-196, Dez, 2010.

SARKIS, G. Y.; AHMED, S.; Synthesis And Antibacterial Activity Of Some New α Phenylcinnamoyl Thiosemicarbazides And 5-Substituted- α -Phenylstyryl-1,3,4-Triazole-2Thiols, Kerbala **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.1, n.4, p.26-32, Mar, 2010.

SINGH, S. P.; AWASTHI. Thiosemicarbazides and Triazole Derivatives as Potential Antiviral Agents. **Zentralblatt für Mikrobiologie**. v.140, n.2, p.155–159, Jan, 1985.

SOERJOMATARAM, I; BRAY, F. Planning for tomorrow: global cancer incidence and the role of prevention. **Nat. Rev. Clin Oncol**. v.36, n.4, p. 2020–2070, Nov, 2021.

STOETERAU, I. Antocianinas e Carcinogênese: Uma revisão narrativa. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**. v.4, n.12, p. 171-190, Abr, 2019.

TEIXEIRA, I. N. A.; GUARIENTO, M. E. Biologia do envelhecimento: teorias, mecanismos e perspectivas: **Ciência & Saúde Coletiva**, v.15, n.6, p.2845-2857, Mai, 2010.

TENEN, D. Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. **Nat. Rev. Cancer**. v.3, n.2, p.89–101, Oct, 2003.

TOGNON, R.; NUNES, N. S.; CASTRO, F. A. Desregulação da apoptose em neoplasias mieloproliferativas crônicas: **J. Einstein**. v.11, n.4, p.540-544, Set, 2013.

TRUMP, B. F.; BEREZESKY, I. K.; CHANG, S. H.; PHELPS, P. C. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. **Toxicol Pathol**. v.25, n.3, p.82–88, Feb, 1997.

WHO, World Health Organization. Disponível:
<https://www.who.int/healthtopics/cancer#tab=tab_1>. Acesso: 03 de agosto de 2021.

WHO, World Health Organization. Disponível:
<https://www.who.int/healthtopics/cancer#tab=tab_2>. Acesso: 08 de agosto de 2021.

WUJEC, M.; STEFANSKA, J.; SIWEK, A.; MALAGORZATA, T.; Synthesis, Lipophilicity and Antimicrobial Activity of New Derivatives of Thiosemicarbazides and 1,2,4-Triazoline-5thione. **Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research**, v.66, n.1 p.73-82, Feb, 2009.

WÜNSCH, V. F.; MIRRA, A. P.; LÓPEZ, R. V. M.; ANTUNES L F. Tabagismo e câncer no Brasil: evidências e perspectivas. **Rev. Bras. Epidemiol**, v.13, n.2, p.175-87, Jan, 2010.

YOUNG, A. R.; NARITA, M.; FERREIRA, M.; KIRSCHNER, K.; SADAIE, M.; DAROT, J. F.; TAVARE, S.; ARAKAWA, S.; SHIMIZU, S.; WATT, F. M. *et al.* Autophagy mediates the mitotic senescence transition. **Genes Dev**. v.23, n.7, p.798-803, Mar, 2009.

YOUSEF, T. A.; BADRIA, F. A.; GHAZY, S. E.; EL-GAMMAL, O. A.; ABU EL-REASH,

G.M.; *in vitro* and *in vivo* antitumor activity of some synthesized 4-(2-pyridyl)-3-thiosemicarbazides derivatives, **International Journal of Medicine and Medical Sciences**. v.3, n.2, p.37-46, Feb, 2011.

ZHANG. HJ.; QIAN, Y.; ZHU, DD.; YANG, XG.; ZHU, HL. Synthesis, molecular modeling and biological evaluation of chalcone thiosemicarbazide derivatives as novel anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v.46, n.9, p.4702-4708, Mar, 2011.

4 ARTIGO

Investigação do potencial anticâncer de novos compostos tiossemicarbazídicos

ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO

“European Journal of Medicinal Chemistry”



Fator de impacto: 6.514

Instruções para autores: <https://www.journals.elsevier.com/european-journal-of-medicinalchemistry>

SILVA, P.B.N¹; MILITAO, G.C.G¹; FILHO, J.M.S²

¹ Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

¹ Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

ABSTRACT

Cancer is the second leading cause of death in the world. Therefore, it is necessary to continue the search for new compounds capable of inducing tumor cell death and reducing side effects. Compounds that have the thiosemicarbazide portion in the structure present different activities, including anticonvulsant, antiviral, antibacteria and antitumor effect, the latter by inducing apoptosis. We evaluated the *in vitro* antiproliferative activity of novel compounds that present the thiosemicarbazide portion and the amino acids glycine, phenylalanine, and tryptophan in their structures, against human tumor cell lines HL-60 (promyelocytic leukemia), MCF-7 (breast adenocarcinoma), HEP-2 and NCI-H292 (laryngeal and lung carcinoma) and non-tumor cells (Human Peripheral Blood Mononuclear Cells - PBMC). The assays used were cytotoxicity by MTT salt, morphological analysis by May-Grunwald-Giemsa staining, and flow cytometry to determine apoptosis and cell cycle. Eleven molecules showed cytotoxic activity in at least one tumor lineage. AT39, a phenylalanine derivative showed, among the molecules tested, the lowest inhibitory concentration (IC_{50}) in four tumor lines. The values obtained from IC_{50} and confidence interval (CI) in $\mu\text{g/mL}$ after 72h of treatment are 1.5 (1.2 - 1.7) in (HL-60); 5.5 (3.2 - 9.4) in (MCF-7); 5.1 (4.0 - 6.5) in (NCI-H292) and 7.4 (5.3 - 10.5) in (HEP-2). After 24, 48, and 72h of treatment in HL-60 the compound AT39 presented IC_{50} of 4.7 (3.9 - 5.7), 3.3 (2.6 - 4.2), and 1.5 (1.2 - 1.7) $\mu\text{g/mL}$, respectively. AT39 was not cytotoxic in PBMC. Morphological analysis of HL-60 cells treated with 5 and 10 $\mu\text{g/mL}$ after 24h suggested there was an induction of apoptosis, confirmed by cytometry assay with annexin V-FIT kit. After analyzing the cell cycle obtained by flow cytometry, it was found an increase in the G0 / G1 phases and a decrease in the G2 / M phases, whereas the increase in the G0 / G1 phases may indicate a possible quiescence caused by the compound. An increase in cells in Sub-G0 caused by the compound AT39 in its highest concentration corroborates with the cell death induction. The results suggest that AT39 is a promising anticancer agent.

Keywords: Thiosemicarbazide; AT39; Cytotoxicity; HL-60; CMSP; Apoptosis

INTRODUÇÃO

O câncer é um grande grupo de doenças que pode começar em quase qualquer órgão ou tecido do corpo (WHO, 2021). As neoplasias malignas começam quando as células em uma parte do corpo sofrem várias mutações genéticas e moleculares irreparáveis e passam a se dividir de maneira incontrolável, formando tumores malignos que invadem regiões próximas através de metástase (TEIXEIRA, 2007). As neoplasias malignas estão entre as principais causas de morte em todo o mundo. Em 2018, houve 18,1 milhões de novos casos e 9,5 milhões de mortes relacionadas ao câncer em todo o mundo. Em 2040, o número de novos casos de câncer por ano deverá aumentar para 29,5 milhões e o número de mortes relacionadas ao câncer para 16,4 milhões. Geralmente, as taxas de câncer são mais altas em países cujas populações têm a maior expectativa de vida, nível de educação e padrão de vida. Mas para alguns tipos de câncer, como câncer cervical, o inverso é verdadeiro, e a taxa de incidência é mais alta em países nos quais a população tem baixa classificação nessas medidas (IARC, 2021)

A quimioterapia consiste no emprego de substâncias químicas antineoplásicas, isoladas ou em combinação. A maioria dos agentes quimioterápicos habitualmente empregados causam efeitos colaterais como: anorexia, náuseas, vômitos, diarreia e necrose da mucosa do cólon, pois esses compostos, não possuem especificidade para células tumorais, atingindo também as células sadias (DIAS *et al.* 2006; YAACOB *et al.* 2010; SHANG *et al.* 2011).

Neste contexto, faz-se necessário o estudo e descobrimento de novos compostos com potencial anticâncer, que causem menos efeitos colaterais e que apresentem uma eficácia maior e em menor tempo no combate as neoplasias malignas. Dessa forma, alguns compostos que apresentam a porção tiossemicarbazida são candidatos a agentes terapêuticos no combate a essa doença. As tiossemicarbazidas constituem uma classe de compostos de aplicação relevante em síntese orgânica, uma vez que são substratos capazes de sofrerem uma grande variedade de modificações estruturais, gerando novos compostos com propriedades diversificadas. No campo da Química Medicinal, tais compostos já foram relatados como agentes antifúngicos, antitumorais, antibacterianos, anticoagulantes e antituberculostáticos (SARKANJ *et al.* 2013; SIWEK *et al.* 2011).

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção dos compostos

Os compostos foram sintetizados, purificados e identificados pelo professor José Maurício dos Santos Filho do Laboratório de Planejamento e Síntese Aplicados a Química Medicinal do Departamento de Engenharia Química no Centro de Tecnologia e Geociências da Universidade Federal de Pernambuco. E a síntese de três novas séries de tiossemicarbazidas foi baseada nas modificações estruturais dos aminoácidos comercialmente disponíveis: glicina, fenilalanina e triptofano como materiais de partida gerando três classes de compostos. A porção tiossemicarbazida foi modificada quanto aos radicais R, onde R representa diferentes substituintes aromáticos e alifáticos, selecionados para permitir a avaliação de suas propriedades físico-químicas e estabelecer padrões de relação estrutura-atividade dos compostos (Figura 1). Ao modificar a metodologia de Vinson e Pepper (CHERNG, 2000; VINSON; PEPPER, 1972), uma reação de substituição nucleofílica aromática (S_NAr) entre os aminoácidos e 2,4-dinitroclorobenzeno foi realizada produzindo N^α-2,4-dinitrofenil aminoácidos com bons rendimentos e alta pureza dos produtos. Posteriormente, uma esterificação simples de Fisher nos compostos com a presença de metanol e ácido mineral como catalisador resultou nos correspondentes ésteres metílicos. As principais hidrazidas foram facilmente preparadas à temperatura ambiente na presença de hidrato de hidrazina e tempos de reação curtos. As estruturas químicas estão apresentadas nas tabelas 1, 2 e 3. Uma série de 33 novos compostos foram produzidos após quatro etapas sintéticas.

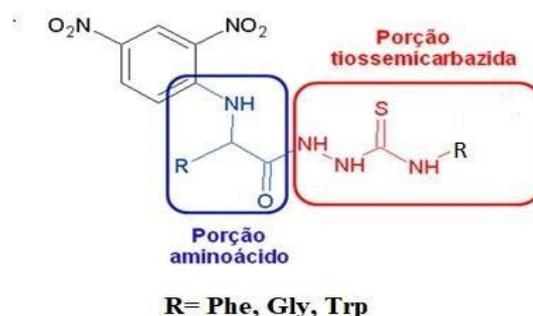


Figura 1: Estrutura central dos compostos sintetizados

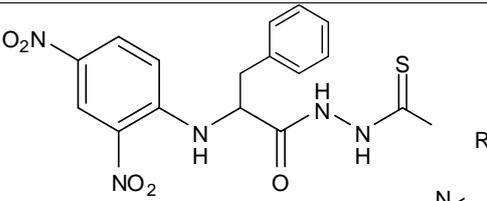
 Phe-2,4-DNF-derivados					
R	Código	P.M. (g/mol)	R	Código	P.M. (g/mol)
Ph	AT2	480,6	-CH ₂ Ph	AT31	494,57
4-ClPh	AT3	514,98	3-CH ₃ Ph	AT33	494,57
4-CH ₃ OPh	AT32	510,57	4-CNPh	AT35	505,55
4-NO ₂ Ph	AT34	525,54	3-ClPh	AT37	514,98
3-CH ₃ OPh	AT36	510,57	Ciclo-hexil	AT39	486,60
-CH=CH ₂	AT38	444,51	4-FPh	AT41	498,53
-CH ₂ CH ₂ Ph	AT40	508,60	-	-	-

Tabela 1- Estruturas química dos compostos derivados da fenilalanina.

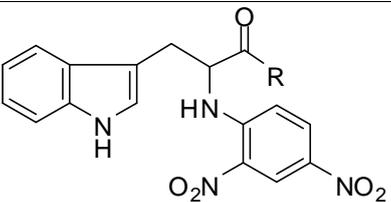
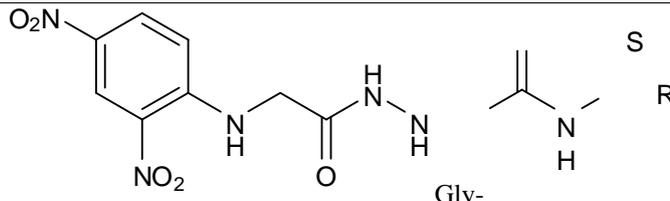
 Trp-2,4-DNF-derivados					
R	Código	P.M. (g/mol)	R	Código	P.M. (g/mol)
Phe	AT4	519,58	4-ClPh	AT9	554,02
CH ₂ Ph	AT6	533,61	4-OCH ₃ Ph	AT10	549,61
4-CH ₃ Ph	AT11	533,61	4-NO ₂ Ph	AT12	564,58
4-CNPh	AT13	544,59	3-OCH ₃ Ph	AT14	549,61
3-ClPh	AT15	554,02			

Tabela 2- Estruturas química dos compostos derivados do triptofano.



2,4-DNF-derivados

R	Código	P.M. (g/mol)	R	Código	P.M. (g/mol)
-CH=CH ₂	AT26	354,38	4-FPh	AT29	408,40
-CH ₂ CH ₂ Ph	AT28	418,47	3-ClPh	AT25	424,85
4-CH ₃ Ph	AT21	404,44	4-NO ₂ Ph	AT22	435,41
4-CNPh	AT23	415,42	Ciclo-hexil	AT27	396,47
3-CH ₃ OPh	AT24	420,44	4-CH ₃ OPh	AT8	420,44
Ph	AT1	390,41			

Tabela 3- Estruturas químicas dos compostos derivados glicina

Os resultados obtidos serviram de fundamento para a otimização estrutural dos derivados aminoácido-tiossemicarbazida, tendo como base modificações no anel fenílico ligado à tiossemicarbazida.

Aspectos Éticos

O projeto foi submetido e foi aprovado pelo comitê de ética em humanos da Universidade Federal de Pernambuco, visto que o mesmo utilizou células sanguíneas para a conclusão da pesquisa.

Cultura de células

As linhagens tumorais, NCI H-292 (câncer de pulmão- humano), HEP-2 (carcinoma de laringe), HL-60 (leucemia promielocítica) e MCF-7 (carcinoma de mama) foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro e foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. As células (CMSP) foram obtidas de voluntários saudáveis com idades entre 18 a 30 anos, não fumantes, que não faziam uso de bebidas alcoólicas, sem exposição recente a radiações e sem ter feito uso crônico de fármacos.

Citotoxicidade em linhagens de células tumorais

Este teste se baseia na capacidade da enzima do ciclo de Krebs succinato desidrogenase ativa nas mitocôndrias de células viáveis em converter o sal tetrazolium (MTT) que é hidrossolúvel e de cor amarelada, em cristais de azul de formazan, que são de cor púrpura. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE *et al.* 1993).

Para determinar a concentração dos fármacos capaz de inibir 50% do crescimento celular (CI_{50}), as células foram plaqueadas em placas de 96 poços nas seguintes concentrações (células/mL): NCI H-292, MCF-7 e HEP-2 em 1×10^5 cel/mL e HL-60, em $0,3 \times 10^6$ cel/mL. As substâncias previamente dissolvidas em DMSO foram diluídas no meio RPMI para obtenção da concentração final de 25 μ g/mL para o teste de concentração única e (0,3-25 μ g/mL) para o ensaio de determinação da CI_{50} . Apenas moléculas que induziram mais de 75% de morte celular na concentração de 25 μ g/mL foram testadas para determinar a CI_{50} .

Verificação da toxicidade em células normais - Células mononucleadas do sangue periférico (CMSP) através do método do MTT

As CMSP foram isoladas a partir de uma amostra de cerca de 7 mL de sangue, acrescida de 4 mL de salina que foram adicionados à 3 mL de Ficoll, seguida por 30 minutos de centrifugação a 1.500 rpm, após essa etapa foi feita a aspiração das CMSP, presentes na região intermediária entre as hemácias e o plasma. As células mononucleadas foram plaqueadas na concentração de $0,3 \times 10^6$ cél/mL e tratadas com os compostos por 72 horas. Três horas antes de completar o período de incubação, 20 μ L da solução estoque (5 mg/mL) de MTT foi adicionado em cada poço. Após 3 horas, o sobrenadante foi retirado e o precipitado resultante foi dissolvido em 100 μ L de DMSO e lido em espectrofotômetro de placa na absorbância de 575nm.

Análise de alterações morfológicas - Coloração por May-Grunwald-Giemsa

Para observar a morfologia das células, lâminas foram preparadas, com 50 μ L da suspensão de células tratadas com os compostos teste, em citocentrífuga (cytospin) e fixadas com metanol 100% por 30 segundos.

Indução de apoptose- externalização da fosfatidilserina- marcação para apoptose

A externalização da fosfatidilserina foi avaliada por citometria de fluxo após a exposição das células à substância AT39 nas concentrações de 2,5; 5 e 10 µg/mL por 24 horas, através da marcação da fosfatidilserina (FS) com a Anexina V. Após a adição do reagente as células foram agitadas suavemente e incubadas por 20 min a temperatura ambiente (25°C) ao abrigo da luz. As células foram adquiridas e analisadas no citômetro de fluxo. A proporção de células em apoptose foi determinada pela porcentagem de anexina quantificada. Deste modo foi possível calcular a porcentagem de células viáveis, em apoptose inicial, em apoptose tardia e em necrose.

Fragmentação de DNA e ciclo celular

Esse método consiste na capacidade do PI se ligar ao DNA das células cuja membrana plasmática foi primeiramente permeabilizada por um detergente (triton X-100) para permitir a entrada do corante no núcleo. Ao final de 24h de incubação as amostras foram tratadas com uma solução de lise contendo PI 10 µg/mL, 0,1 % de citrato de sódio e 0.1 % de triton X-100. Após 30 minutos, as células foram adquiridas e analisadas em citômetro de fluxo.

Análise estatística

Os dados foram analisados segundo suas médias e respectivos intervalos de confiança de 95%, por regressão não linear, a partir de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata. A diferença entre os grupos experimentais foi avaliada pelo teste ANOVA (análise de variância) seguida do teste de Dunnett's Multiple Comparison ($P < 0,05$). O programa GraphPad Prism versão 5.0 foi utilizado para a realização de todas as análises. Os debris celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

5 RESULTADOS

Avaliação da atividade citotóxica dos derivados N^a-(2,4-dinitro-fenil aminoácido tiossemicarbazida) em células tumorais humanas em 72h.

Inicialmente as amostras foram testadas em concentração única de 25 µg/mL. Nenhum dos compostos derivados da glicina apresentou atividade biológica (Tabela 4). No entanto dos 13 compostos derivados da fenilalanina, seis apresentaram atividade citotóxica em pelo menos duas linhagens testadas (Tabela 5). Da mesma forma, entre os nove compostos derivados da triptofano, cinco apresentaram atividade citotóxica (Tabela 6).

Ao todo onze moléculas foram capazes de inibir o crescimento das células tumorais em mais de 75% em pelo menos 2 linhagens testadas. Essas amostras foram então selecionadas para o ensaio que determina a concentração inibitória em 50% em quatro linhagens tumorais. A linhagem mais sensível aos compostos estudados foi a HL-60 com moléculas apresentando CI₅₀ entre 0,7 até 8,8 µg/mL (tabela 7). Já a linhagem de adenocarcinoma de mama (MCF-7) mostrou-se mais resistente com muitas moléculas não apresentando atividade nessa linhagem ou com CI₅₀ apresentando variações entre 5,5 e superior a 25 µg/mL).

O composto AT10 derivado do triptofano com porção para-metoxifeniltiossemicarbazida foi o mais ativo em 72h para HL-60 e MCF-7 (CI₅₀ variando de 0,9 à 15,08). A molécula AT39 (derivado da fenilalanina com porção ciclo-hexil-tiossemicarbazida) apresentou melhores resultados em 72h com CI₅₀ menor que 10 µg/mL em todas as linhagens tumorais testadas (CI₅₀ variando de 1,5 até 7,4 µg/mL).

Tabela 4- Atividade citotóxica em 72h de compostos derivados da glicina em NCI H-292 (câncer de pulmão humano), HEP-2 (carcinoma de laringe) e MCF-7 (carcinoma de mama). Compostos testados com 25 µg/mL.

Resultados expressos em porcentagem de inibição (%) ± (Desvio Padrão).

Amostras	Inibição NCI-H292 (%) ± (DP)	Inibição HEP-2 (%) ± (DP)	Inibição MCF-7 (%) ± (DP)
Dox 5 µg/mL	83,9 ± 0,21	96,0 ± 1,0	63,6 ± 9,73
AT1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
AT5	0 ± 0	NT	0 ± 0
AT7	0 ± 0	NT	43,63 ± 4,1
AT8	0 ± 0	0 ± 0	21,3 ± 1,2
AT21	7,9 ± 0,0	16,1 ± 10,9	24,8 ± 6,2
AT22	38,8 ± 30,9	30,5 ± 8,6	66,1 ± 4,6
AT23	3,1 ± 4,3	30,4 ± 7,4	29,1 ± 2,5
AT24	7,4 ± 1,2	29,2 ± 0,0	0,5 ± 3,0
AT25	1,1 ± 3,4	20,8 ± 11,2	4,6 ± 9,4
AT26	10,4 ± 6,0	18,4 ± 24,5	39,3 ± 8,9
AT27	0 ± 3,7	26,2 ± 3,9	65,1 ± 7,0
AT28	27,7 ± 3,8	48,1 ± 12,2	42,6 ± 4,3
AT29	1,2 ± 3,9	0 ± 0	37,4 ± 3,2

Tabela 5- Atividade citotóxica em 72h de compostos derivados da fenilalanina em NCI H292 (câncer de pulmão humano), HEP-2 (carcinoma de laringe) e MCF-7 (carcinoma de mama). Compostos testados com 25 µg/mL.

Resultados expressos em porcentagem de inibição (%) ± (Desvio Padrão).

Amostras	Inibição	Inibição	Inibição
	NCI-H292	HEP-2	MCF-7
	(%) ± (DP)	(%) ± (DP)	(%) ± (DP)
Dox 5 µg/mL	83,9 ± 0,21	96,0 ± 1,0	63,6 ± 9,73
AT2	76,9 ± 3,30	89,7 ± 0,78	0 ± 0
AT3	50,7 ± 18,7	91,5 ± 5,4	19,0 ± 0,7
AT31	74,1 ± 8,1	88,6 ± 4,0	8,1 ± 30,3
AT32	0 ± 0	53,9 ± 8,2	15,9 ± 6,8
AT33	91,2 ± 5,3	93,8 ± 4,2	68,4 ± 5,4
AT34	40 ± 10,8	46,3 ± 5,4	56,3 ± 0,6
AT35	0 ± 0	18,3 ± 3,3	8,6 ± 22,0
AT36	8,8 ± 25,7	72,7 ± 5,6	0 ± 0
AT37	81,4 ± 0	90,8 ± 2,5	28,9 ± 7,5
AT38	0 ± 0	40,2 ± 1,7	23,2 ± 6,8
AT39	93,2 ± 2,6	96,6 ± 6,4	63,8 ± 7,6
AT40	89,9 ± 6,3	79,9 ± 0,8	19,8 ± 14,9
AT41	19,6 ± 31,2	72,4 ± 10,5	0 ± 0

Tabela 6- Atividade citotóxica em 72h de compostos derivados do triptofano em NCI H-292 (câncer de pulmão humano), HEP-2 (carcinoma de laringe) e MCF-7 (carcinoma de mama). Compostos testados com 25 µg/mL.

Resultados expressos em porcentagem de inibição (%) ± (Desvio Padrão).

Amostras	Inibição NCI-H292 (%) ± (DP)	Inibição HEP-2 (%) ± (DP)	Inibição MCF-7 (%) ± (DP)
Dox 5 µg/mL	83,9 ± 0,21	96,0 ± 1,0	63,6 ± 9,73
AT4	81,06 ± 1,0	100,0 ± 1,4	39,8 ± 2,2
AT6	82,65 ± 6,84	84,2 ± 0,91	22,5 ± 1,0
AT9	42,5 ± 11,3	48,0 ± 3,0	20,0 ± 8,0
AT10	81,1 ± 7,2	100,0 ± 0,3	68,9 ± 5,9
AT11	81,7 ± 1,4	100,0 ± 3,4	81,6 ± 3,1
AT12	0 ± 0	45,9 ± 3,3	0 ± 0
AT13	0 ± 0	45,8 ± 2,1	0 ± 0
AT14	76,3 ± 3,4	100,0 ± 3,2	60,9 ± 5,1
AT15	61,1 ± 0,5	96,3 ± 2,1	54,1 ± 1,8

Tabela 7- Concentração que causa 50% de inibição (CI₅₀) e intervalo de confiança em NCI H-292 (câncer de pulmão humano), HEP-2 (carcinoma de laringe), HL-60 (leucemia promielocítica), MCF-7 (adenocarcinoma de mama) e CMSP (células mononucleadas do sangue periférico) em 72h.

Amostras	HL-60	MCF-7	NCI-H292	HEP-2	CMSP
			CI ₅₀ µg/mL		
			(Intervalo de Confiança)		
AT2	2,9 (2,2 – 4,0)	>25	11,3 (9,6 – 13,3)	8,5 (5,7 -12,8)	>25
AT4	1,9 (1,5 – 2,5)	>25	14,0 (12,6 -15,6)	14,5 (12,9 - 16,3)	>25
AT6	2,8 (1,9 – 4,3)	>25	7,9 (5,5 – 11,2)	11,3 (8,0 – 15,9)	>25
AT10	0,9 (0,7 – 1,2)	15,08 (9,4-24,1)	11,8 (8,1 -17,1)	7,4 (5,7 - 9,7)	>25
AT11	1,4 (1,1 – 2,0)	16,8 (13,8 - 20,1)	10,3 (8,7 – 12,8)	11,6 (8,4 – 16,1)	>25
AT14	4,0 (2,8 – 5,8)	23,0 (20,3 -26,0)	15,7 (13,7 -18,0)	16,9 (12,3 -23,3)	>25
AT31	4,8 (2,8 – 8,1)	>25	NT*	21,8 (18,7 - 25,3)	>25
AT33	0,70 (0,5 – 1,0)	>25	11,2 (9,3 – 13,5)	11,7 (9,3 – 14,7)	>25
AT37	0,7 (0,5 – 1,1)	>25	21,1 (14,3 - 31,2)	16,1 (10,2 - 25,6)	>25
AT39	1,5 (1,2 – 1,7)	5,5 (3,2 – 9,4)	5,1 (4,0 -6,5)	7,4 (5,3 – 10,5)	>25
AT40	7,6 (5,9 – 9,6)	14,3 (9,9 – 20,6)	NT*	15,9 (10,1 - 24,8)	>25

NT*= NÃO TESTADO

Verificação da citotoxicidade em células HL-60 (leucemia promielocítica) em 24, 48 e 72 horas

Apenas a molécula AT39, apresentou maior citotoxicidade entre os compostos testados, quando avaliados antiproliferativos em células de leucemia promielocítica nos tempos de 24, 48 e 72h. AT39 não apresentou toxicidade em células mononucleadas do sangue periférico na concentração de 25 µg/mL nos testes anteriores, por esse motivo não foi usada as CMSP para esse experimento. Frente a HL-60 (leucemia promielocítica) a molécula AT39 apresentou atividade nos períodos de 24h a 72h de incubação, conforme demonstrado na tabela 8. A CI₅₀ foi

tempo dependente, visto que quanto maior o tempo de incubação menor a CI_{50} . A molécula AT39 mostrou-se muito promissora para testes futuros.

Tabela 8- Apresenta os valores de CI_{50} (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular), ($\mu\text{g/mL}$) e intervalo de confiança (IC) de 95%, realizado pelo teste do MTT para HL-60, após 24, 48 e 72 horas de incubação obtidas através de regressão não linear utilizando o programa GraphPad prism.

Amostra	HL-60 24h	HL-60 48h	HL-60 72h
	CI_{50}		
	(Intervalo de Confiança)		
AT39	4,7 (3,9 – 5,7)	3,3 (2,6 – 4,2)	1,5 (1,2 – 1,7)

Estudos que avaliam o mecanismo de indução de morte celular ocasionado pelo tratamento com a molécula AT39 sobre a linhagem leucêmica HL-60

Células de leucemia promielocítica (HL-60) foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 em placas de 24 poços. As células foram tratadas com a molécula AT39, por 24h, nas concentrações de (5 e 10 $\mu\text{g/mL}$), após esse tempo foi aplicada às células a coloração por Giemsa-May-Grunwald. O tratamento (Figura 2-C e D) induziu um aumento no número de células com menor tamanho e com DNA fragmentado (seta preta).

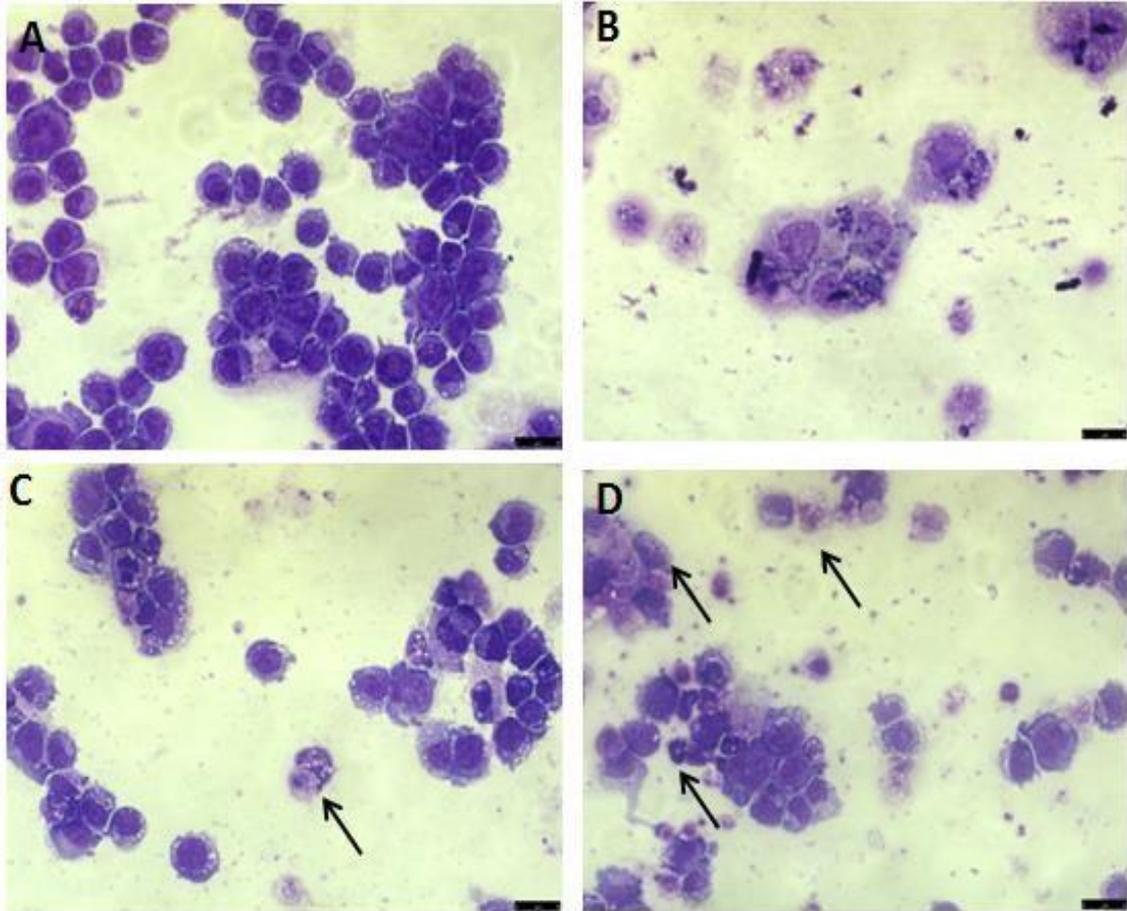


Figura 2: Fotomicrografias de células HL-60 tratadas com veículo RPMI com 0.5% DMSO (A); Doxorrubicina 0.3 µg/mL como controle positivo (B). AT39 em 5 µg/mL e AT39 em 10 µg/mL (C e D respectivamente)

A fim de quantificar as alterações do conteúdo de DNA foi feito uma análise do ciclo celular por citometria de fluxo. As células tratadas com AT39 na concentração de 10 µg/mL apresentaram um aumento em G0/G1 e aumento do DNA fragmentado (Figura 3). O tratamento também induziu um aumento no número de células em apoptose inicial para as concentrações de 5 e 10 µg/mL de AT39 e nas células em apoptose tardia na concentração de 10 µg/mL (Figura 3).

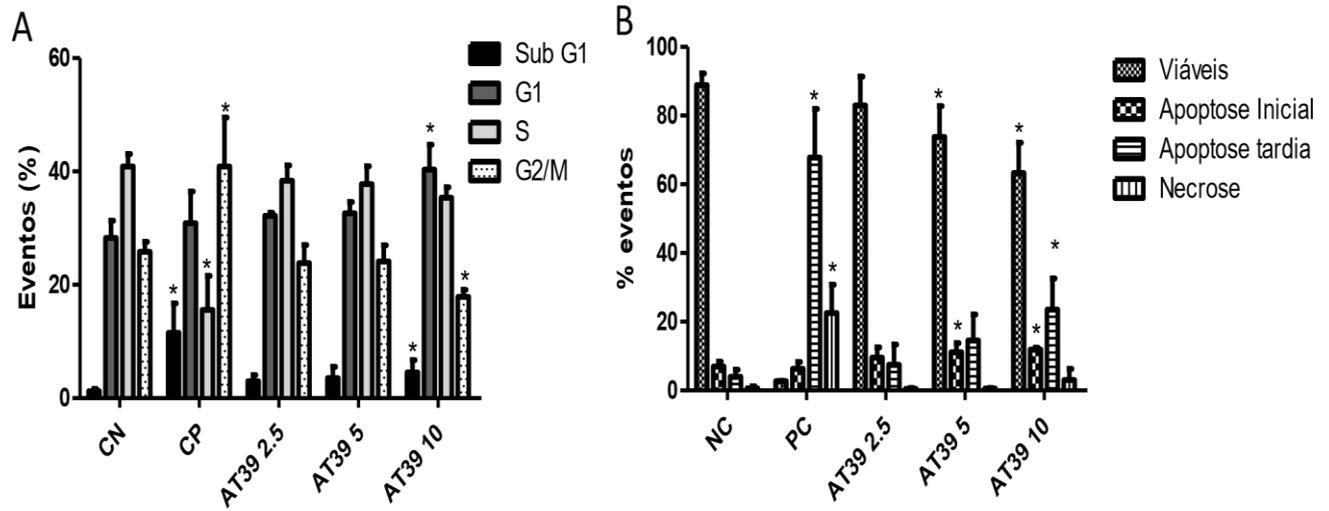


Figura 3: A- Porcentagem de células nas fases do ciclo celular obtidos por citometria de fluxo após 24h de tratamento. B- Detecção de apoptose por externalização da fosfatidilserina após 24h de tratamento. * $p < 0,05$ comparado por ANOVA seguido de Dunnett's. CN (controle negativo), CP (controle positivo).

DISCUSSÃO

Já é bem conhecido na literatura o grande poder das moléculas que apresentam em suas estruturas a porção tiossemicarbazida, sendo demonstrados em vários artigos os diversos benefícios desses componentes como tendo atividade antimalárica, antituberculose, anticoagulante, antiinflamatórias, antitrypanossomal, antibacteriana, antiviral e anticâncer, desse modo esses compostos ocupam um lugar vital na Química Médica (KÜÇÜKQÜZEL; COSKUN, 2016).

A química dos derivados da hidrazina como a tiossemicarbazida e suas hidrazonas é de enorme interesse devido às suas extensas aplicações sintéticas, analíticas e atividades biológicas. Durante as últimas décadas o interesse tem crescido rapidamente devido às suas atividades biológicas perceptíveis (ACHARYA, *et al.* 2021; SARKIS; AHMED, 2010).

A atividade citotóxica *in vitro* dessas moléculas foram estudadas pela primeira vez nesse trabalho, e através dos ensaios realizados com os compostos tiossemicarbazícos encontramos moléculas inéditas capazes de causarem alguns danos em linhagens de células cancerígenas, o composto AT39 derivado da fenilalanina foi o que apresentou maior atividade, assim o escolhemos para dá continuidade à pesquisa.

Após a célula sofrer um dano, seja por um agente interno como dano ao DNA, choque térmico, privação de nutrientes, ou por indução de um agente farmacológico, essa célula passa por um processo de morte celular programada (FULDA, 2006). Proteínas existentes dentro do compartimento celular, são como guarda costa, que atuam na defesa destas células e ao sinal de algum erro elas agem ativando outros receptores de morte para assim dá início a uma cascata de sinalização de morte celular. A apoptose ou morte celular programada pode ser desencadeada por vários estímulos extracelulares e intracelulares que irão resultar na ativação coordenada de uma família de proteases de cisteína denominadas caspases, e esse mecanismo de ativação irá percorrer duas vias a extrínseca e intrínseca (DEVARAJAN *et al.* 2002). Na via intrínseca a ativação da caspase está intimamente ligada à permeabilização da membrana mitocondrial externa por membros pro-apoptóticos (Bax/Bak) da família Bcl-2 (FULDA, 2006).

A atividade citotóxica do composto AT39 frente as linhagens NCI H-292 (câncer de pulmão humano), HEP-2 (carcinoma de laringe), HL-60 (leucemia promielocítica), MCF-7 (carcinoma de mama), apresentou concentração inibitória que causa 50% de inibição satisfatória com valores de 1,5 µg/mL em HL-60, 5,5 µg/mL em MCF-7, 5,1 µg/mL em NCI H-292 e 7,4 µg/mL em HEP-2, além de não apresentar atividade citotóxica <25 µg/mL em

CMSP (células mononucleadas do sangue periférico), esses resultados são referentes a um experimento de 72h. O composto AT39 apresentou atividade tempo dependente em 24, 48 e 72h na linhagem de leucemia promielocítica (HL-60), essa característica realça ainda mais a importância desse composto no tratamento de neoplasias malignas.

Conseguimos observar alterações morfológicas causada pelo composto AT39 nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ em HL-60 plaqueada em placa de 24 poços na concentração de 1×10^5 cél/mL, a partir de lâminas preparadas utilizando a coloração por May-Grunwald-Giemsa (Figura 2), essas alterações foram comprovadas através de ensaios em citometria de fluxo utilizando o kit de anexina/iodeto de propídeo. A externalização da fosfatidilserina foi comprovada através da fluorescência no citômetro de fluxo, onde observamos cores indicativas de apoptose e necrose de acordo com o kit V-FIT utilizado. Foi possível observar uma diminuição favorável do número de células viáveis nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ em relação ao controle negativo, a necrose não foi significativa nas concentrações utilizadas em relação com o controle negativo e positivo, mas a apoptose inicial foi significativa nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$, onde observamos um aumento em relação aos controles negativo e positivo, já a apoptose tardia teve um aumento relevante na maior concentração em relação ao controle negativo. Esses achados foram possíveis devido aos experimentos realizados em 24h com as células incubadas com o composto AT39 nas concentrações de 2,5; 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ e analisado pela citometria de fluxo (Figura 3-B).

Na célula viável, a membrana plasmática apresenta-se íntegra e não há externalização de fosfatidilserina considerável, nas células em apoptose a membrana plasmática apresenta-se íntegra, porém há externalização de fosfatidilserina facilitando a marcação por kits específicos. (APPELT *et al.* 2005). A fosfatidilserina é um componente fosfolipídico normalmente mantido no folheto interno das membranas celulares por uma enzima denominada translocase aminofosfolipídeo ATP de células metabolicamente ativas. Quando uma célula passa por morte por apoptose, a fosfatidilserina não está mais restrita ao lado citosólico da membrana, mas torna-se exposta na superfície da célula, facilitando a sua marcação por compostos específicos, por exemplo, anexina.

Através dos nossos resultados foi possível observar de maneira significativa células em apoptose caracterizada pela externalização da fosfatidilserina. Poucas foram as células em necrose do nosso tratado nas concentrações maiores, porém as marcadas apresentaram fluorescência específica para a anexina e iodeto de propídeo. Células em necrose ou em necrose secundária a apoptose, além da externalização da fosfatidilserina apresentam a disruptura da

membrana plasmática permitindo a entrada, por exemplo, de iodeto de propídeo que se liga ao DNA e emite fluorescência. Um ensaio que utiliza a anexina V e o iodeto de propídeo permite identificar o status da célula, se ela está viável, em apoptose ou em necrose.

Após análise do ciclo celular das células tratadas com o composto AT39 na maior concentração em comparação com o controle negativo, observamos um aumento no número de células com DNA fragmentado, sendo caracterizadas como células mortas, e uma parada na fase G0/G1 do ciclo celular, indicando que as células tratadas não estavam avançando do processo de divisão celular. De fato, também foi observado diminuição significativa da fase G2/M do ciclo celular dessas células tratadas com o composto na maior concentração, em comparação com o controle negativo. Vale mencionar que através das lâminas preparadas com células HL-60 tratadas nas concentrações 5 e 10 µg/mL conseguimos observar fragmentação do DNA, presença de corpos apoptóticos e uma baixa quantidade de células em necrose, sendo esta análise qualitativa confirmada por citometria de fluxo.

A fragmentação do DNA é uma característica marcante nas células que estão em apoptose e necrose. Foi possível observar uma significância de células em apoptose, tal como uma diminuição no número de células viáveis, esses indicados foram observados em 24h através das análises e sugerem a indução de apoptose pelo composto testado na linhagem tumoral (HL-60). A fragmentação nuclear é a principal característica da apoptose, sendo utilizada como um marcador da indução desse tipo de morte celular (MAJTNEROVÁ; ROUŠAR, 2018; ABONDANZA et. al., 2008; FLOROS *et al.* 2006).

Por fim, os compostos estudados neste trabalho mostraram-se com propriedades citotóxicas, bem como indutores de apoptose.

6 CONCLUSÕES

Por meio dos ensaios de citotoxicidade foi concluído que os compostos testados que possuem a porção tiossemicarbazida apresentaram atividade citotóxica frente a quatro linhagens de células cancerígenas (HL-60, MCF-7, HEP-2, NCI-292), sendo o composto AT39, derivado da fenilalanina o que se mostrou mais eficaz. Os testes de mecanismo de ação mostraram que o composto AT39 induz apoptose em células HL-60.

Através da série de compostos sintetizados e testados selecionou-se uma molécula que apresentou atividade citotóxica nas linhagens tumorais testadas. Por se tratar de uma molécula inédita pode-se inferir que esta pode ser um representante de uma nova classe de substâncias com potencial antitumoral. Para inserir esta molécula no mercado será necessário fazer estudos pré-clínico que avaliem tanto a segurança quanto a eficácia do composto.

REFERÊNCIAS

ABONDANZA, T.S.; OLIVEIRA, C.R.; BARBOSA, C.M.V.; PEREIRA, F.E.G.; CUNHA, R.L.O.R. CAIRES, A.C.F.; COMASSETO, J.V.; QUEIROZ, M.L.S.; VALADARES, M.C.; BINCOLETTO, C. Bcl-2 expression and apoptosis induction in human HL-60 leukaemic cells treated with a novel organotellurium (IV) compound RT-04. **Food and Chemistry Toxicologic**. v.46, n.4, p.2540–2545, Oct, 2008.

APPELT, U. *et al.* Viable, apoptotic and necrotic monocytes expose phosphatidylserine: cooperative binding of the ligand Annexin V to dying but not viable cells and implications for OS dependent clearance. **Cell Death and Differentiation**, v.12, n.2, p.194-196, Mar, 2005.

BERRIDGE, M.V.; TAN, A.S. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction, **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.303, n.2, p.474-482, Mar 1993.

CHERNG, Y. J. Efficient Nucleophilic Substitution Reaction of Aryl Halides with Amino Acids Under Focused Microwave Irradiation, **Tetrahedron**, v.56, n.42, p.8287-8289, Feb, 2000.

DEVARAJAN, E.; SAHIN, A.; CHEN, J.; *et al.* Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. **Oncogene**, v.21, n.4, p.8843–8851, Oct, 2002.

DIAS, V. M.; COELHO, S. C.; FERREIRA, F. M. B.; VIEIRA, G. B. S.; CLÁUDIO, M. M.; SILVA, P. D. G. O grau de interferência dos sintomas gastrintestinais no estado nutricional do paciente com câncer em tratamento quimioterápico. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v.21, n.2, p.104-110, Apr, 2006.

FLOROS, K.M.; HELLINIDA T.; DIMITRA F.; MAROULIO T.; ANDREAS S. Alterations in mRNA Expression of Apoptosis-Related Genes *BCL2*, *BAX*, *FAS*, *Caspase-3*, and the Novel Member *BCL2L12* after Treatment of Human Leukemic Cell Line HL-60 with the Antineoplastic Agent Etoposide. **Academy of Science**. v.1090, n.2, p.89–97, Nov, 2006.

FULDA, S., DEBATIN, K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**. v.25, n.3, p. 4798–4811, Jul, 2006.

IARC, international Agency for Research on câncer. Disponível em: <https://gco-iarcfr.translate.google/? x tr sl=en& x tr tl=pt& x tr hl=pt-BR& x tr pto=sc>. Acesso: 03 de agosto de 2021.

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

MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v.65, n.2, p.55-63. Jul, 1983.

PESSOA, C. Determinação do mecanismo de ação citotóxica de alguns compostos extraídos de plantas do nordeste brasileiro. **Tese de Doutorado**. Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, UFC, 2000.

ŠARKANJ, B. *et al.* 4-Methyl-7-hydroxycoumarin antifungal and antioxidant activity enhancement by substitution with thiosemicarbazide and thiazolidinone moieties. **Food chemistry**, v.139, n.1-4, p.488-495, May, 2013.

SHANG, W.; QIAO, J.; GU, C.; YIN, W.; DU, J., WANG, W.; ZHU, M.; HAN, M.; LU, W. Anticancer activity of an extract from needles and twigs of *Taxus cuspidata* and its synergistic effect as a cocktail with 5-fluorouracil. **BMC complementary and alternative medicine**, v.11, n.1, p.123-133, Feb, 2011.

SIWEK, A.; STACZEK, P.; STEFAŃSKA, J. Synthesis and structure-activity relationship studies of 4-arylthiosemicarbazides as topoisomerase IV inhibitors with Gram-positive antibacterial activity. Search for molecular basis of antibacterial activity of thiosemicarbazides. **Eur. J. Med. Chem.** Paris, v.46, n.11, p.5717-5726, May 2011.

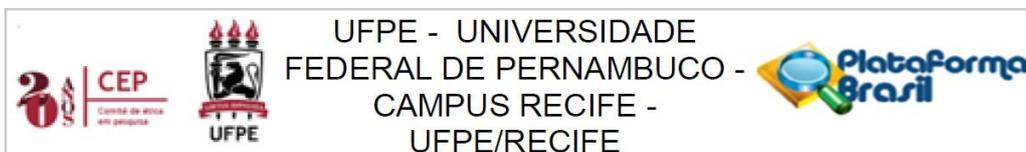
TEIXEIRA, M. Explicação diversa para a origem do câncer, com foco nos cromossomos, e não nos genes, ganha corpo no establishment científico. **Revista Latino-americana de Psicopatologia Fundamental**, v.10, n.1, p.664-676, Jan, 2007.

VINSON, J. A.; PEPPER, L. D. Preparation of 2,4-dinitrophenyl derivatives of amino acids in dipolar aprotic solvents, **Anal. Chim. Acta**. v.58, n.4, p.245-247, Apr, 1972.

WHO, World Health Organization. Disponível em: <https://www.who.int/healthtopics/cancer#tab=tab_1> Acesso: 15 de outubro de 2021.

YAACOB, N. S.; HAMZAH, N.; KAMAL, N. N. N. M.; ABIDIN, S. A. Z.; LAI, C. S.; NAVARATNAM, V.; NORAZMI, M. N. Anticancer activity of a sub-fraction of dichloromethane extract of *Strobilanthes crispus* on human breast and prostate cancer cells *in vitro*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.10, n.6, p. 42-56, Aug, 2010.

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação do potencial anticâncer de novos compostos tiossemicarbazídicos

Pesquisador: Paulo Bruno Norberto da Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 26302319.9.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.907.451

Apresentação do Projeto:

O projeto "Investigação do Potencial Anticâncer de Novos Compostos Tiossemicarbazídicos" trata-se de um projeto de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, da Universidade Federal de Pernambuco, do mestrando Paulo Bruno Norberto da Silva, tendo como orientadora a Profa. Dra. Gardênia Carmen Gadelha Militão, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE, e como co-orientador o Prof. Dr. José Maurício dos Santos Filho, do Departamento de Engenharia Química da UFPE. Esta pesquisa tem como objetivo analisar novos compostos sintéticos com atividade anticâncer através de pesquisas experimentais com células tumorais em cultura e células mononucleadas de doadores saudáveis, ao qual serão realizadas etapas para a verificação da citotoxicidade da droga nas células, redução do número de células com essa droga, alteração na membrana e no DNA que podem levar as células a uma morte programada e proteínas que podem estar envolvidas no processo de apoptose. Estas verificações e estatísticas serão analisadas por programas profissionais instalados no computador do Laboratório de Cultura e Proliferação Celular do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral:

Investigar o potencial anticâncer de novos derivados tiossemicarbazídicos através de estudo do mecanismo de ação de proteínas envolvidas na apoptose.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 3.907.451

Objetivos secundários:

- Determinar a citotoxicidade “in vitro” dos compostos em linhagens tumorais,
- Realizar análises morfológicas das células,
- Avaliar a viabilidade celular,
- Estudar a integridade da membrana celular e fragmentação do DNA,
- Investigar a ação da molécula em alvos moleculares envolvidos na indução da apoptose,
- Avaliar a citotoxicidade da molécula em células mononucleadas do sangue.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os pesquisadores consideram como risco a formação de hematoma, que é a complicação mais comum em uma punção venosa. A dor é o sintoma de maior desconforto ao paciente, e eventualmente, pode ocorrer a compressão de algum ramo nervoso. Caso alguns desses efeitos sejam observados será tomada como medida imediata a aplicação de compressa de gelo no local do hematoma. Esta é uma forma muito simples e rápida de tirar hematomas da pele. O risco será reduzido pelo fato de ser um profissional habilitado e treinado que irá coletar o sangue. O tempo de coleta será inferior a 10 minutos.

Benefícios:

Não estão previstos benefícios diretos para os voluntários. O estudo é de caráter científico e traz como benefício o desenvolvimento para a sociedade de novos fármacos com potencial antitumoral.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O objetivo desta pesquisa é utilizar as células tumorais de culturas obtidas em banco de células e células normais do sangue periférico dos voluntários com o objetivo de identificar uma nova substância com potencial para tratamento do câncer. Para tanto será realizada uma coleta de 10 mL de sangue de uma veia na região do braço utilizando seringas estéreis e descartáveis. Após a coleta do material serão isoladas as células do sangue (células saudáveis) para serem cultivadas in vitro (modelo de cultura de células) e submetidas a testes de toxicidade com vários fármacos, com a proposta de selecionar fármacos não tóxicos. Os experimentos propostos serão desenvolvidos de acordo com protocolos já validados e descritos na literatura. A relevância científica desta proposta está pautada na contribuição de elucidar mecanismos envolvidos no processo de morte celular

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 3.907.451

tumoral utilizando novas drogas potencialmente terapêuticas. Serão recrutados para esse estudo 10 voluntários adultos, na faixa etária de 18 a 30 anos, sem histórico de doenças recentes, não fumante ou etilista, sem exposição recente a radiações ou a medicamentos. Todas as despesas serão custeadas pelo pesquisador responsável pelo projeto de pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O pesquisador responsável anexou Folha de Rosto assinada pela Vice-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia; declaração de matrícula no Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Carta de Anuência do Departamento de Fisiologia e Farmacologia; projeto de pesquisa; Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para maiores de 18 anos ou emancipados, Termo de Compromisso e Confidencialidade assinado pelo pesquisador responsável e os currículos dos três pesquisadores envolvidos no projeto.

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto não apresenta pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

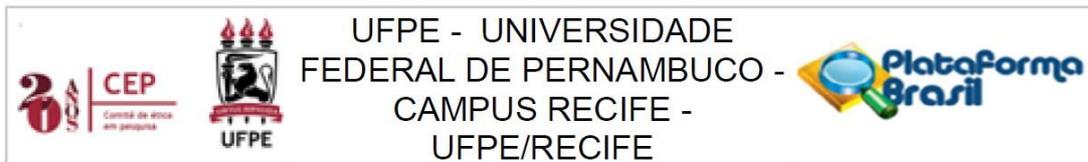
Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 3.907.451

o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1459930.pdf	23/02/2020 20:09:54		Aceito
Outros	CARTADERESPOTAASPENDENCIAS.doc	23/02/2020 20:08:06	Paulo Bruno Norberto da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEMaiores18.doc	23/02/2020 12:35:46	Paulo Bruno Norberto da Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetodepesquisa.doc	23/02/2020 11:27:07	Paulo Bruno Norberto da Silva	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	23/02/2020 10:46:09	Paulo Bruno Norberto da Silva	Aceito
Outros	lattesjosemauricio.pdf	29/11/2019 08:56:25	Paulo Bruno Norberto da Silva	Aceito
Outros	LattesGardeniaCarmen.pdf	29/11/2019 08:55:58	Paulo Bruno Norberto da Silva	Aceito
Outros	lattespaulo.pdf	29/11/2019 08:55:32	Paulo Bruno Norberto da Silva	Aceito
Outros	termodeconfidencialidade.pdf	28/11/2019 07:05:31	Paulo Bruno Norberto da Silva	Aceito
Outros	declaracaodevinculo.pdf	28/11/2019 07:01:23	Paulo Bruno Norberto da Silva	Aceito
Outros	cartadeanuencia.pdf	28/11/2019 06:57:07	Paulo Bruno Norberto da Silva	Aceito

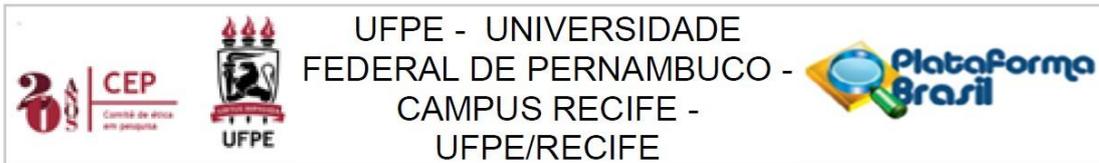
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 3.907.451

RECIFE, 10 de Março de 2020

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador(a))

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br