

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MANOEL OLIVEIRA DE MORAES JUNIOR

Avaliação do efeito citotóxico e antileucêmico de adutos de Heck

JOÃO PESSOA

2017

MANOEL OLIVEIRA DE MORAES JUNIOR

Avaliação do efeito citotóxico e antileucêmico de adutos de Heck

Monografia apresentada ao curso de em Ciências Biológicas (Trabalho Acadêmico de Conclusão de Curso), como requisito parcial a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal da Paraíba.

Orientador: Dr. Demetrius Antonio Machado de Araújo

Coorientadora: Me. Bruna Braga Dantas

JOÃO PESSOA

2017

Catálogo na publicação Biblioteca
Setorial do CCEN/UFPB Josélia M.O.
Silva – CRB-15/113

M828a Moraes Junior, Manoel Oliveira de.
Avaliação do efeito citotóxico e antileucêmico de adutos de Heck/
Manoel Oliveira de Moraes Junior. – João Pessoa, 2017.
66 p. : il. color.

Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade
Federal da Paraíba.

Orientador(a): Prof. Dr. Demetrius Antonio Machado de Araújo.
Coorientadora: Msc. Bruna Braga Dantas

1. Câncer. 2. Adutos de Heck. 3. Citotoxicidade. 4. Autofagia.
I. Título.

MANOEL OLIVEIRA DE MORAES JUNIOR

Avaliação do efeito citotóxico e antileucêmico de adutos de Heck

Monografia apresentada ao curso de em Ciências Biológicas (Trabalho Acadêmico de Conclusão de Curso), como requisito parcial a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal da Paraíba.

Data: 12 de junho de 2017

Resultado: _____

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Demetrius Antonio Machado de Araújo, Universidade Federal da Paraíba – Orientador

Dra. Márcia Rosa de Oliveira, Universidade Federal da Paraíba – Membro Titular

Dra. Gláucia Veríssimo Faheina Martins, Universidade Federal da Paraíba - Membro Titular

Dra. Aline Alves Lara Gomes, Universidade Federal da Paraíba - Membro Suplente

RESUMO

Atualmente, o câncer é a segunda causa de morte por doenças não infectocontagiosas, sendo o uso da quimioterápicos uma das principais formas de tratamento. Os quimioterápicos já utilizados na clínica, não são completamente eficazes para todos os tipos de câncer e não apresentam absoluta seletividade, atacando assim células não-cancerígenas, causando assim diversos efeitos colaterais. Nesse contexto, a busca de novas drogas citotóxicas e seletivas para o tratamento do câncer, incluindo a leucemia, se faz necessário. A reação de Heck-Matsuda é uma possibilidade de aprimoramento de moléculas de origem natural, possibilitando o melhoramento farmacológico, como a atividade anticâncer. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial citotóxico *in vitro* de adutos de Heck inéditos, derivados do ácido labdênico 16, em linhagens celulares leucêmicas e não cancerígenas. O efeito dos compostos foi determinado pela redução da viabilidade celular por meio do ensaio de redução de MTT com os 8 adutos de Heck, no período de 24h e 72h, na linhagem Thp-1. Desses compostos, 4 apresentaram citotoxicidade nas concentrações testadas (6,25 a 200 μ M), nos quais tiveram suas toxicidades e seletividade avaliadas nas linhagens K562 e HUVEC. Assim, o composto AH-8 demonstrou maior efeito em K562, com CI₅₀ de $97,85 \pm 3,9\mu$ M em 24h e $54,58 \pm 3,4\mu$ M em 72h, além de maior seletividade quando comparado com o efeito em HUVEC. Dessa forma, foi escolhida a linhagem K562 e o composto AH-8 (100, 50 e 25 μ M) para elucidação do tipo de morte. Quando avaliada a distribuição das fases do ciclo, o composto AH-8 (100 μ M) causou um aumento do número de eventos em sub-G1 $35,85 \pm 5,43\%$. Adicionalmente, AH-8 não demonstrou ação na externalização de fosfatidilserina, nem dano na membrana celular de K562 nas concentrações testadas. AH-8 (100 μ M) também foi comprovado o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), com um percentual de $17,72 \pm 2,22\%$. Além disso, foi evidenciado o aumento da formação de organelas vesiculares ácidas, indicador de autofagia, causado por AH-8 a partir de 50 μ M. Em conclusão, o composto AH-8 demonstrou citotóxico e seletivo para células cancerígenas, danificando o DNA, provocando a formação de EROs e induzindo autofagia.

Palavras-chave: adutos de Heck, câncer, citotoxicidade, autofagia.

ABSTRACT

Currently, cancer is the second cause of death by non-infectious diseases, in which the use of chemotherapy is one of the main forms of treatment. The chemotherapeutic drugs that are already used by the clinics are not completely effective for all types of cancer, which also they are not fully selective attacking non-cancerous cells and causing then various side effects. Therefore, the search for new cytotoxic and selective drugs for the treatment of cancer including leukemia is absolute necessary. The Heck-Matsuda reaction is a possibility of enhancement of molecules with natural origin enabling pharmacological improvement, such as anticancer activity. Hence, the objective of the present study was to evaluate the *in vitro* cytotoxic potential of unpublished Heck adducts derived from labdenic acid 16 in leukemic and non-cancerous cell lines. The effect of the molecules was determined by the evaluation of the reduction of the Thp-1-line viability by the 8 Heck-adducts effect using the MTT reduction assay, during the period of 24h and 72h. From all those compounds, 4 presented cytotoxicity at the tested concentrations (6,25-200 μ M), and then they had their respective toxicities and selectivity evaluated on the K562 and HUVEC cell lines. Thus, AH-8 showed a greater effect on K562, presenting a IC₅₀ of $97,85 \pm 3,9\mu\text{M}$ at 24h and $54,58 \pm 3,4\mu\text{M}$ at 72h, in addition to a greater selectivity when compared to its effect on HUVEC line. Thus, the lineage K562 and the AH-8 compound (100, 50 and 25 μ M) were chosen to the elucidation of what type of programmed cell death were being induced. When the distribution of the cell cycle phases was evaluated, the compound AH-8 (100 μ M) caused an increase in the number of events in subG1 $35,85 \pm 5,43\%$. In addition, AH-8 showed no effect on phosphatidylserine externalization, or damage on the cell membrane of K562 at the tested concentrations. AH-8 (100 μ M) was also proven to increase the production of reactive oxygen species (ROS), within the percentage of $17,72 \pm 2,22\%$. Additionally, AH-8 (50 and 100 μ M) displayed an increased formation of acidic vesicle organelles, which it can indicate autophagy. In conclusion, the AH-8 compound has been shown to be cytotoxic and selective for cancer cells, damaging their DNA, causing ROS formation, and inducing autophagy.

Keywords: Heck-adducts, cancer, cytotoxicity, autophagy.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, dedico esse trabalho de forma integral a todos os portadores de câncer do mundo. Espero verdadeiramente um dia, através do poder da ciência, encontrar uma maneira de melhorar a qualidade de vida de vocês.

Agradeço primeiramente a minha família, que esteve sustentando e incentivando meu caminho durante todo esse processo. Especialmente aos meus pais, Maria José e Manoel, por sempre sonharem comigo. Também, gostaria de agradecer imensamente a meus avós, João Batista e Maria do Socorro, por terem me criado com tanto carinho, espero que onde quer que estejam sintam orgulho de mim.

Ao o professor e orientador Dr. Demetrius Araújo. Agradeço imensamente por ter me recebido no LBCM e acreditado no meu potencial. Obrigado por todos os ensinamentos e conhecimento compartilhado. O senhor é um exemplo de profissional e cientista que eu almejo ser um dia.

A minha coorientadora Bruna Dantas pelos ensinamentos, paciência e determinação. Esse trabalho nunca teria acontecido sem a sua ajuda. Obrigado também por ter se tornado uma grande e fiel amiga em todos os momentos. Você merece todo o sucesso do mundo. Espero que sinta orgulho de tudo isso.

Aos meus amigos do Jaburu, a todo momento estenderam a mão para mim e sempre mandaram energia positiva. Orgulho-me de cada um de vocês, meu sucesso também foi fruto dessa amizade.

Aos amigos da biologia, que durante todos esses anos me acompanharam quase diariamente tornando a UFPB minha segunda casa. Obrigado por todas as experiências compartilhadas, vocês fizeram toda essa jornada maravilhosa.

Ao todos os integrantes do Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular (LBCM). Essa equipe que compartilhou não só conhecimento científico de qualidade, mas foi uma família que me acolheu e fez todos os momentos de trabalho parecer diversão. Em especial Carol, Luíse e Sâmia por toda ajuda e suporte, inclusive com resultados nesse trabalho.

Agradeço à banca examinadora, Dr^a Márcia Rosa, Dr^a Aline Lara e Dr^a Gláucia Faheina por aceitarem o convite. Se vos escolhi foi porquê vejo em vocês um exemplo e inspiração no mundo da pesquisa. Obrigado desde já pelas contribuições feitas.

Agradeço ao prof. Dr. Jailton Ferrari, que com sua equipe trabalhou no isolamento e síntese dos adutos de Heck aqui usados, imprescindíveis para a realização desse estudo.

A todos os professores do curso de Ciências Biológicas que participaram da minha formação acadêmica e profissional de alguma forma, principalmente a professora Dr^a Denise Dias que começou a lapidar minha formação científica.

À Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Biotecnologia pelo apoio estrutural e institucional durante a pesquisa e minha formação acadêmica.

E especialmente à CAPES e o CNPq, por todo o apoio financeiro fundamental para realização desse trabalho e pela oportunidade de crescimento profissional e acadêmico em mim investida através do programa Ciências sem Fronteiras.

*Meus mais sinceros agradecimentos,
cada linha desse trabalho também pertence a vocês!
Manoel Oliveira de Moraes Júnior.*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Distribuição proporcional entre homens (à esquerda) e mulheres (à direita) dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016. **17**
- Figura 2:** Características particulares e exclusivas à progressão do câncer. **18**
- Figura 3:** Estrutura molecular do ácido labdênico 16. **27**
- Figura 4:** Fotomicrografia de linhagem não-tumoral HUVEC em microscópio óptico invertido com aumento de 400x. **34**
- Figura 5:** Fotomicrografia de linhagem leucêmica K562 em microscópio óptico invertido com aumento de 400x. **35**
- Figura 6:** Fotomicrografia de linhagem leucêmica Thp-1 em microscópio óptico invertido com aumento de 400x. **35**
- Figura 7:** Histograma representativo da quantidade de DNA a partir do efeito do composto AH-8 ao longo do ciclo celular na linhagem K562. **47**
- Figura 8:** Gráfico da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pela linhagem K562 tratadas com AH-8 com período de incubação de 24h. **48**
- Figura 9:** Gráficos de células (K562) marcadas com Anexina V e/ou PI após o tratamento com AH-8 por 24h. **49**
- Figura 10:** Gráfico das células K562 em processo de morte celular por autofagia marcadas com Laranja de Acridina induzidos por AH-8 no período de 24h. **50**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Linhagens modelo utilizadas para os ensaios de citotoxicidade *in vitro*. **34**
- Tabela 2:** Efeito citotóxico dos adutos de Heck (AH) e do etoposídeo (Etop.) com 24h e 72h de tratamento sobre a linhagem Thp-1. **44**
- Tabela 3:** Efeito citotóxico dos adutos de Heck (AH) e do etoposídeo (Etop.) com 24h e 72h de tratamento sobre as linhagens K562 e HUVEC. **44**
- Tabela 4:** Efeito do composto AH-8 e do etoposídeo a 100 μ M (Etop.100 μ M) na distribuição do DNA ao longo do ciclo celular na linhagem K562. **46**

LISTA ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACD – morte celular accidental
- AKT ou PKB – proteína quinase B
- ACS – American Cancer Society
- ANOVA – análise de variância
- AO – Laranja de Acridina
- Apaf-1 – fator 1 ativador de protease apoptótica
- ATG – genes de autofagia
- AVOs – organelas vesiculares ácidas
- Bcl-2 – B-cell lymphoma 2
- CC – citocromo c
- CI₅₀ – concentração inibitória média capaz de promover 50% do efeito máximo
- DISC – complexo de sinalização indutor de morte
- EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
- EPM – erro padrão da média
- EROs – espécies reativas de oxigênio
- FADD – proteína fas associada ao domínio de morte
- FasR – receptor da proteína fas; CD95 – cluster of differentiation 95
- H₂-DCFH-DA - sonda molecular 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetato
- Hcl – ácido clorídrico
- HtrA2/OMI – mitochondrial serine protease HtrA2
- IAPs – proteínas inibitórias de apoptose
- INCA – Instituto Nacional do Câncer
- LAMP – proteína de membrana associada ao lisossomo
- MAPK – mitogen activated protein kinases
- mTOR – proteína alvo da rapamicina em mamíferos
- MTT – brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium]
- NAC – N-acetilcisteína
- NCCD – Comitê de Nomenclatura em Morte Celular
- Nk-kB – fator nuclear-kB
- PBS – tampão fosfato-salino
- PCD – morte celular programada
- PI – iodeto de propídio

PI3Ks – phosphatidylinositide 3-kinases

PS – fosfatidilserina

RCD – morte celular regulada

RIPKs – proteínas quinase que interagem com receptores

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

SBF – soro bovino fetal

SDS – dodecil sulfato de sódio

Smac/DIABLO – proteína mitocondrial pró-apoptótica

TNF – fator de necrose tumoral

TRAIL – ligante indutor de apoptose associado ao TNF

WHO – organização mundial de saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 O câncer: caracterização e epidemiologia	16
1.2 Leucemia	18
1.3 Citotoxicidade	19
1.4 Ciclo e morte celular	20
1.4.1 Autofagia	22
1.4.2 Apoptose	23
1.4.3 Necrose programada ou necroptose	25
1.5 Produtos semissintéticos como fonte de fármacos a partir de reações de hemissíntese: derivados de diterpenos labdânicos e suas aplicações	25
2 OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Materiais	31
3.2 Equipamentos	31
3.3 Reagentes e soluções	32
3.4 Modelos de experimentação <i>in vitro</i>	32
3.4.1 Cultivo de modelos <i>in vitro</i> (linhagens celulares)	32
3.5 Métodos experimentais	35
3.5.1 Moléculas estudadas	35
3.5.2 Ensaio colorimétrico por redução de MTT	36
3.5.3 Estudo dos mecanismos de morte celular por citometria de fluxo	38
3.5.3.1 Análise do conteúdo de DNA e sua distribuição nas fases do ciclo celular	38
3.5.3.2 Avaliação da apoptose por externalização da fosfatidilserina (PS) e necrose por marcação com iodeto de propídio (PI)	39
3.5.3.3 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)	39
3.5.3.4 Marcação de organelas vesiculares ácidas (AVOs) como indicador de autofagia	40
3.5.2.5 Análise dos dados em citometria de fluxo	41
4. RESULTADOS	43
4.1 Avaliação do efeito citotóxico dos adutos de Heck	43
4.2 Avaliação do tipo de morte celular por AH-8 em leucemia mieloide crônica (K562)	45

4.2.1 A distribuição do ciclo celular de K562 é afetada por AH-8	45
4.2.2 AH-8 induz produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em K562	47
4.2.3 Efeito do AH-8 na externalização da fosfatidilserina (PS)	48
4.2.4 Indução de autofagia por AH-8 em K562	50
5 DISCUSSÃO	52
6 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	69

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 O câncer: epidemiologia e caracterização

Atualmente, o câncer é um problema de saúde pública cada vez mais grave devido a seu alto grau de incidência e mortalidade pelo mundo. Estima-se que por ano cerca de 6 milhões de pessoas sejam diagnosticadas com esse tipo de enfermidade, conferindo ao câncer o título mundial de segunda causa de morte por doença crônica não-transmissível (SIEGEL, 2016; IBRAHIM, 2013). Nos Estados Unidos da América, foram esperados para o ano de 2016, segundo a *American Cancer Society* quase 1 milhão e 700 mil novos diagnósticos de câncer, com números de mortalidade que poderiam chegar a marca 600 mil pessoas. Diante desse panorama, foram gastos pelos americanos, em 2013, uma marca de 74,8 bilhões de dólares em despesas de tratamento para pacientes com câncer, incluindo gastos com hospitais e medicamentos (ACS, 2016).

A Organização Mundial de Saúde, em 2014, contabilizou um total de quase 224 mil mortes por câncer no Brasil, no quais 53,46% foram de homens e 46,54% de mulheres. Essa diferença de números também se reflete no tipo de câncer que acomete cada população: para o sexo feminino, o que mais matou foi o câncer de mama (16,8%), seguido de pulmão (10,6%) e colorretal (9,3%); no sexo masculino, a maior mortalidade é causada por câncer de próstata (14,9%), seguido de pulmão (14,1%) e estômago (9,2%); dentre outros (WHO, 2014).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA) as estimativas para Brasil entre os anos de 2016-17, no que diz respeito a novos casos e diagnósticos, mostram-se bastante alarmantes. A expectativa para esses anos é de 600 mil novos casos, dos quais 180 mil correspondem apenas de neoplasias de pele do tipo não-melanoma. Os números epidemiológicos de novos casos se mantêm semelhantes ao painel de mortalidade divulgado pela Organização Mundial de Saúde em 2014, sendo o câncer de próstata o mais preocupante para o sexo masculino e o câncer de mama para o sexo feminino. No entanto, dados de mortalidade e incidência também podem divergir de acordo com o grupo afetado e o tipo de câncer relacionado (Figura 1) (INCA, 2015).

Tais taxas de incidência e mortalidade, considerando o tipo e o local de surgimento do câncer, tanto em homens quanto em mulheres, estão intimamente ligados às causas de seu aparecimento e seus respectivos grupos de risco. Isso acontece porque o câncer se desenvolve principalmente a partir de fatores como predisposição genética, hábitos alimentares inadequados e estilo de vida não saudáveis, além de também fatores ambientais, nos quais se

incluem carcinogênicos artificiais feitos pelo homem, radiação e mutações causadas por vírus (REDDY et al, 2003).



Localização primária	casos novos	%			Localização primária	casos novos	%
Próstata	61.200	28,6%	Homens		Mama Feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do Útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do Útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%
			Mulheres				

Figura 1: Distribuição proporcional entre homens (à esquerda) e mulheres (à direita) dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 (Fonte: INCA, 2015).

O câncer é amplamente descrito na literatura como um aumento descontrolado no crescimento e proliferação celular em relação a taxa de morte celular, causando um acúmulo de células anormais no tecido alterando diretamente sua homeostase. Quando a massa de células se acumula no tecido de origem sem a capacidade de colonizar outras áreas, denomina-se tumor benigno, no entanto quando tais células possuem a capacidade de colonizar qualquer parte do corpo e reproduzir-se em outros tecidos, é caracterizado como tumor maligno e consequentemente considerado câncer (BERGMAN; HARRIS, 1997; ALBERTS et al., 2004).

Essas alterações anormais na taxa de proliferação celular ocorrem por um acúmulo de mutações que atingem proto-oncogenes, fazendo-os se expressarem mais que o necessário tornando a célula cancerígena autossuficiente para estímulos de crescimento. Mutações também podem ocorrer em genes supressores de tumor, nos quais normalmente se expressariam para evitar a divisão celular inadequada, nesses casos quando mutados permitem que as células tumorigênicas progridam no ciclo celular e se multipliquem sem controle (FOSTER, 2008). Alterações moleculares no DNA, também conhecida como alterações epigenéticas, podem desregular a dinâmica de expressão gênica considerada saudável, também desencadeando processos cancerígenos sem necessariamente haver mutação diretamente no material genético da célula (ESTELLER, 2008).

Células que acumulam tais mutações ou alterações epigenéticas normalmente também desenvolvem progressivamente algumas características exclusivas de células cancerígenas que facilitam o estabelecimento da doença, sendo essas: evasão de sinais anticrescimento, resistência a resposta imunológica, potencial replicativo ilimitado, estimulação de mediadores inflamatórios, tendência a invasão de outros tecidos e metástase, indução de angiogênese, instabilidade genômica e consequentemente maior propensão a mutações, resistência a morte

celular, desregulação do metabolismo energético, além de autossuficiência aos sinais de crescimento (Figura 2). A aquisição gradativa e o acúmulo dessas características é essencial para a progressão da divisão celular descontrolada e para o avanço e estabelecimento da neoplasia (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

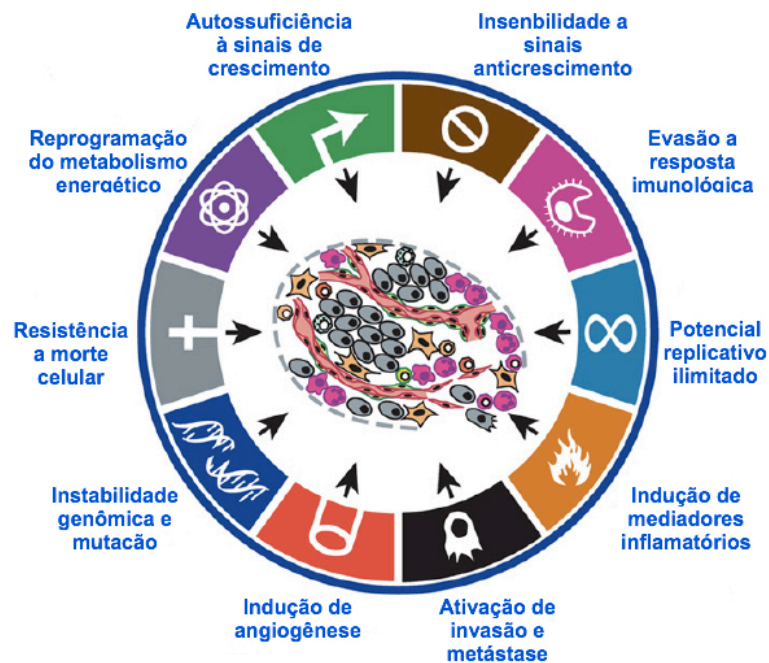


Figura 2: Características particulares e exclusivas à progressão do câncer (Adaptado de HANAHAN e WEINBERG, 2011).

1.2 Leucemia

Os diferentes tipos de células do sangue são produzidos rápida e continuamente a partir de uma linhagem pluripotente capaz de se diferenciar por um processo denominado hematopoese. Essas células pluripotentes se diferenciam em duas linhagens: a linhagem de células mieloides que incluem hemácias (ou eritrócitos), granulócitos, megacariócitos e monócitos; e a linhagem de células linfoides que incluem linfócitos B e linfócitos T (SCHMIDT; PRZYBYLSKI, 2001; VISNJIC et al, 2004).

A leucemia é um tipo câncer que acontece quando os mecanismos de controle de produção dessas células sofrem algum distúrbio, como consequência alguma fase dessas linhagens, mioelide ou linfoide, podem ter sua homeostase alterada levando uma proliferação excessiva em detrimento das células saudáveis. Há diferentes classificações da leucemia, sendo esses baseados no tipo da linhagem celular afetada e no estágio de maturação das células

anormais. Por conseguinte, a leucemia pode ser classificada em leucemia linfoide/linfocítica que afeta a linhagem linfoide (linfócitos B ou linfócitos T); a leucemia mieloide/mielocítica que é das células da linhagem mieloide; e a leucemia eritroide que afeta os eritrócitos. Quanto ao estágio de maturação da linhagem afetada é possível destacar a leucemia aguda, na qual se desenvolve a partir de células jovens ou pouco diferenciadas que se alastram rapidamente e seus efeitos clínicos são sentidos a curto prazo; além da leucemia crônica que desenvolve a partir de células anormais já maduras que possuem crescimento contínuo e lento (POKHAEL, 2012; ROSE-INMAN; KUEHL, 2014).

Na busca de novos compostos quimioterápicos ou novas estratégias para o tratamento de vários tipos de câncer, incluindo a leucemia, vem-se utilizando primariamente modelos de linhagens celulares cancerígenas e não cancerígenas para ensaios *in vitro* de avaliação de citotoxicidade e determinação de mecanismos de ação desses compostos. Para a leucemia são utilizadas linhagens modelo humanas como a K562, leucemia mieloide crônica; e/ou THP-1, leucemia monocítica aguda (AUWERX, 1991; DANTAS et al, 2015; COULIDIATI et al, 2015; LI et al, 2017).

1.3 Citotoxicidade

O controle do uso de animais em laboratório como modelos experimentais, bem como a busca da biossegurança no uso de substâncias novas em seres humanos criou uma necessidade crescente do uso, desenvolvimento e padronização de testes *in vitro* que avaliem uma possível toxicidade à saúde humana e animal. Estabelecido pela *International Standard Organization* (ISO), de acordo com o ISO 10993, a priori é imprescindível a utilização de ensaios *in vitro* que mensurem a biocompatibilidade da substância em questão visando uma maior segurança para o ser alvo ao qual se destina a substância testada, além de também evitar a utilização desnecessária de modelos *in vivo* (ROGERO et al, 2003; MULLER, 2008).

Sendo assim, a citotoxicidade é considerada a capacidade potencial de um composto de causar efeito tóxico a nível celular, podendo assim acarretar em danos à membrana plasmática, redução do metabolismo, alterações enzimáticas e no funcionamento de organelas, diminuição da proliferação celular, e deformações morfológicas; induzindo assim, direta ou indiretamente à morte celular (FRESHNEY, 2001; EISENBRAND, 2002; MULLER, 2008).

Técnicas de avaliação de citotoxicidade buscam estipular a concentração média de uma substância capaz de gerar uma resposta biológica, sendo ela neutra, de morte ou proliferação celular. Um parâmetro bastante utilizado para indicar a alteração da viabilidade celular pela

substância testada é a CI_{50} . A CI_{50} indica a capacidade inibitória média capaz de gerar 50% do efeito máximo da substância, medido através da substância em concentrações crescentes em interação direta ou indireta com as células modelo, assim pode ser gerado uma curva concentração-resposta que vai de 0 a 100% de faixa de inibição (RANG, 2004; FAHEINA-MARTINS, 2009). Além da concentração inibitória média, estudos de citotoxicidade podem servir para o estabelecimento de perfis de ligação aos receptores celulares, propor mecanismos de ação dos compostos utilizados e elucidar o tipo de morte celular induzido (SNODIN, 2002).

Mesmo drogas já aprovadas e utilizadas comercialmente e diretamente como fármacos, sobretudo drogas anticâncer, ainda há uma preocupação enorme no que diz respeito a seu modo de utilização e posologia na administração, uma vez que devido a sua alta toxicidade existe um limite tênue entre a administração de uma dose letal da administração terapêutica (ERDLLENBRUCH et al, 2002; FYHR; AKSELSSON, 2012).

De acordo com diferentes modos de obtenção e níveis de complexidade, os sistemas celulares mais comumente aplicados em testes *in vitro* são: culturas primárias, linhagens imortalizadas, culturas em diferentes estágios de diferenciação, co-culturas de diferentes linhagens celulares, amostras teciduais isoladas diretamente de órgãos, culturas tridimensionais, células tronco e células geneticamente modificadas (ZUCCO et al, 2004).

Portanto, a experimentação *in vitro* é empregada indispensavelmente por apresentarem vantagens que vão de rapidez na produção dos resultados, diminuição na quantidade de animais manipulados, facilidade na reprodução dos dados, financeiramente mais viáveis em determinados casos, até a possibilidade de limitação e controle das variáveis testadas (ROGERO et al, 2003).

1.4 Ciclo e morte celular

A maioria das células somáticas quando já diferenciadas encontram-se em estado de quiescência, ou seja, nesse momento não estão passando por diferenciação ou proliferação celular, sendo essa fase chamada de G_0 . Contudo, quando as células começam a sofrer estímulos mitogênicos através da ação de fatores de crescimento (CDKs e ciclinas), elas podem ser reintroduzidas ao ciclo celular. Assim sendo, as células passam para a fase G_1 que consiste na preparação para a fase de replicação do DNA; a fase S, que se caracteriza como sendo o período de síntese do DNA que tem sua quantidade dobrada passando para a fases G_2 , conhecida como fase de preparação para a fase final M em que a célula de fato se divide. Entre todas as fases do ciclo, existem pontos de checagem do conteúdo celular afim de garantir que

o DNA e as proteínas necessárias estejam íntegras e a célula está segura para passar para a próxima fase do ciclo (BRAUN-DULLAEUS et al., 1998; KAPLON et al., 2015; WIMAN; ZHIVOTOVSKY, 2017).

Assim como os mecanismos de controle de proliferação e ciclo celular, os organismos multicelulares complexos possuem seus mecanismos de controle de morte celular gerenciando diretamente a taxa de proliferação e morte, para renovação tecidual e remoção de células lesadas, mantendo assim um domínio da homeostase em tecidos saudáveis (REED et al., 1996; BERGMAN; HARRIS, 1997).

A morte celular pode ser classificada de duas formas diferentes mutuamente exclusivas: a morte celular acidental (“accidental cell death” – ACD) e a morte celular regulada (“regulated cell death” – RCD). A ACD é causada por injúrias severas de qualquer tipo, sendo elas físicas, incluindo altas temperaturas e pressão; químicas, potentes detergentes ou mudanças drásticas no pH; e mecânicas, como o corte/rompimento da célula propriamente dito; sem que esses fatores possam ser revertidos por intervenções genéticas ou farmacológicas. Já a RCD, envolvem diretamente o uso de ferramentas moleculares de regulação genética pela célula, em que tais mecanismos podem sofrer interferências farmacológica e genéticas (GALLUZZI et al., 2015).

Os mecanismos de morte celular podem ser reversíveis, até que as células que estão passando por tais processos cheguem a um ponto irreversível podendo assim serem consideradas mortas. Portanto, o *Nomenclature Committee on Cell Death* (NCCD), postulou os seguintes parâmetros para considerarem uma célula definitivamente morta, ou seja, quando ela passou do “ponto de restrição” considerado irreversível: (1) a célula que perdeu a integridade da membrana plasmática, percebido pelo uso de corante vitais usados em ensaios *in vitro*; (2) a célula que, incluindo seu núcleo, fragmentar-se e formar pequenos corpúsculos discretos, definidos frequentemente como “corpos apoptóticos” e (3) tais corpúsculos forem fagocitados por células adjacentes, se tratando de sistema *in vivo* (KROEMER et al., 2005).

Quando necessário, as células utilizam diferentes mecanismos de morte celular programada (“programmed cell death” – PCD), sendo 3 tipos: apoptose, autofagia e necrose programada ou necroptose; sendo que cada uma delas segue vias de sinalização diferentes e manifestam, mas não necessariamente, sinais morfológicos distinguíveis uns dos outros (OUYANG et al., 2012).

Visto que as células cancerígenas são capazes de evadir os mecanismos de controle de proliferação celular do sistema imune e se retroalimentar de fatores de crescimento, a indução

de mecanismos de morte celular por meios quimioterápicos funcionam como uma estratégia de combate ao câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011; LETAI, 2015).

1.4.1 Autofagia

A autofagia é um mecanismo de PCD presente numa diversa gama de espécies em resposta a danos celulares causados por fatores estressantes como: espécies reativas de oxigênio; substâncias citotóxicas; parasitismo por bactérias ou vírus; privação de nutrientes disponíveis para a célula; além de também esse processo fazer parte do controle homeostático natural. A autofagia pode tanto levar a morte de células com metabolismo e estruturas muito danificadas, como também atuar como uma resposta positiva e protetiva contra estresses em que as células estão submetidas levando assim a um aumento no seu potencial de sobrevivência e proliferação (LEVINE; YUAN, 2005; HA; KIM, 2016).

Morfologicamente, células passando por processo de autofagia também se diferenciam dos outros tipos de PCD pelas seguintes características: formação de autofagossomos, também consideradas organelas vesiculares ácidas (AVOs); degradação de organelas em estágios iniciais; manutenção da estrutura do citoesqueleto até estágios mais avançados; fragmentação do DNA apenas nos estágios finais; e ausência de indução de inflamação (LEVINE; YUAN, 2005; LIN; BAEHRECKE, 2015).

A autofagia é subdividida em 3 tipos: microautofagia, autofagia mediada por chaperonas e a macroautofagia. Durante a microautofagia ocorre o englobamento de componentes celulares (exceto organelas) pelo lisossomo para a degradação e reciclagem. Na autofagia mediada por chaperonas, as proteínas das células ligadas a chaperona hsc70 (proteínas do retículo endoplasmático rugoso responsáveis pelo enovelamento adequando das proteínas celulares) são reconhecidas pelo lisossomo através da proteína de membrana associada ao lisossomo tipo 2 (LAMP-2A) que levam a sua entrada pela membrana do lisossomo e posterior degradação (HA; KIM, 2016). Já a macroautofagia, comumente referida apenas como autofagia, há o englobamento de componentes celulares, incluindo as organelas, levadas aos lisossomos pelo retículo endoplasmático rugoso formando o autofagossomo (vesículas de membrana dupla). Quando o autofagossomo chega ao lisossomo, fundem-se formando o autofagolisossomo, iniciando a degradação dos componentes internos em meio ácido (DOORN; PAPINI, 2013; HA; KIM, 2016).

As vias de sinalização da autofagia são moduladas pelas proteínas produzidas por genes de autofagia (ATG), que já foram descritos mais de 30 tipos com potencial de regulação do

processo autofágico (HALE et al., 2013). Uma série de genes e proteínas são críticos na sinalização, como PI3K classe I, III/AKT, Beclin-1, MAPK e p53 nos quais atuam para regular positiva ou negativamente a proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) (SU et al., 2015).

No câncer, a autofagia pode funcionar de forma benéfica ou maléfica para a manutenção do tumor, visto que sua função pode ser de morte celular ou de manutenção da integridade de suas funções frente a estresses. Vários estudos vêm demonstrado que tanto as abordagens de estratégias de inibição, quanto de indução de autofagia podem ser úteis como alvos no tratamento do câncer através de intervenções quimioterápicas (YAN et al., 2011; CHEN; KARANTZA; 2011; LIN; BAEHRECKE, 2015; HA; KIM, 2016).

1.4.2 Apoptose

A PCD por apoptose se trata do tipo de morte celular mais comum em metazoários para controle de homeostase tecidual, assim as células que não possuem mais utilidade ou que são potencialmente perigosas para células adjacentes, como por exemplo em infecções virais e células tumorais, passam por apoptose e são posteriormente fagocitadas e digeridas por macrófagos ou células adjacentes, sem que haja extravasamento do conteúdo intracelular (STELLER, 1995). Dado tal fato, substâncias que induzem apoptose não tem efeito inflamatório nem causam dano a células vizinhas e tecidos próximos (JOHNSTONE; RUEFLI; LOWE, 2002).

No que diz respeito a alterações morfológicas nas células apoptóticas, são majoritariamente caracterizadas pela condensação da cromatina e fragmentação nuclear; enrugamento da membrana plasmática com perda da capacidade de adesão, com externalização da fosfatidilserina (PS), mantendo a integridade da membrana celular até os últimos estágios do processo; pouca ou nenhuma alteração estrutural em organelas citoplasmáticas; diminuição do volume celular; com finalmente formação de corpos apoptóticos (EDINGER; THOMPSON, 2004; OUYANG et al., 2012).

Alternativamente, há dois caminhos de vias de sinalização celular que culminam na morte celular por apoptose associados a quimioterápicos, são elas chamadas de via extrínseca, associada a receptores na membrana celular; a via intrínseca, associada a estímulos mitocondriais (ELMORE, 2007). Ambas as vias estão diretamente ligadas a ativação de uma classe de proteases, denominada caspases (sintetizadas com zimogênios, ou seja, pró-enzimas

inativas), nas quais são responsáveis por boa das alterações morfológicas e execução do processo de apoptose (HENGARTNER, 2000).

A via extrínseca está associada diretamente a receptores na membrana celular membros da superfamília de fator de necrose tumoral (TNF). Esses receptores, como exemplo o CD95 também conhecido como Receptor Fas (FasR), são ativados por citocinas específicas a seus respectivos receptores, como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), também conhecido como TRAIL-R1 e a proteína Fas associada ao domínio de morte (FADD), a TRAIL-R2. As procaspases (forma inativa) iniciadoras, comumente a procaspase-8 e procaspase-10, então são recrutadas para o complexo de sinalização indutor de morte (DISC) formado pelo receptor de morte, seu ligante e a caspase iniciadora, nos quais vão então serem conseqüentemente clivadas transformando-se sua forma ativa caspase-8 e caspase-10, respectivamente, iniciando a cascata de clivagem e sinalização de procaspases efetoras que têm a função de clivar proteínas ligadas ao citoesqueleto e estrutura nuclear, especialmente a procaspase-3 que é comum às duas vias apoptóticas. (IGNEY; KRAMMER, 2002).

Também conhecida como via mitocondrial, a via intrínseca da apoptose é estimulada por fatores de morte que aumentam a permeabilidade da membrana da mitocôndria causando conseqüentemente sua despolarização permitindo assim, a liberação de proteínas pró-apoptóticas que irão ativar as proteínas caspases (MENAKER et al.; LIU; BROUHA; GROSSMAN 2004).

A regulação da via apoptótica mitocondrial ocorre pelo balanço entre proteínas pró-apoptóticas e antiapoptóticas da família Bcl-2 que tem a função de regular a permeabilidade da membrana mitocondrial (SAELENIS et al., 2004). Uma vez que ocorre a alteração na permeabilidade da membrana mitocondrial, fatores apoptogênicos, como o citocromo c (CC), iniciam a efetivação do processo ligando-se ao fator 1 ativador de protease apoptótica (Apaf-1), formando um complexo proteico chamado apoptossomo que por sua vez ativa a procaspase 9 em caspase 9, responsável pela clivagem da procaspase 3 tornando-a efetora, caspase 3 (OOI; MA, 2013).

Além do CC, outros fatores pró-apoptóticos podem ser liberados das mitocôndrias, como é o caso das proteínas Smac/DIABLO e HtrA2/OMI. Tais fatores mitocondriais promovem a apoptose através da inibição das proteínas inibidoras de apoptose (IAPs) que possuem a função de regular a atividade das caspases, sobretudo a caspase 9 que está diretamente envolvida na via mitocondrial da ativação da procaspase 3 (LIU; BROUHA; GROSSMAN; SAELENIS 2004).

1.4.3 Necrose programada ou necroptose

Caracterizada morfológicamente pelo aumento no volume celular, desorganização do citoplasma, agregação na cromatina e perda da integridade da membrana celular resultando no extravasamento do conteúdo citoplasmático no meio extracelular sinalizando para estímulo de processo inflamatório (GRIVICH; REGNER; ROCHA, 2007), a morte celular por necrose foi por muito tempo considerada apenas uma ACD, como já referenciado em Galluzzi et al. (2005), resultado de dano muito severo de caráter químico, físico ou mecânico.

No entanto, sob condições específicas, como em infecções virais ou bloqueio de maquinaria apoptótica por inibição ou não ativação das caspases, pode ocorrer um tipo de PCD com características morfológicas de necrose denominada necrose programada ou necroptose (CHO, 2014).

Metabolicamente a necroptose está associada tanto a receptores de morte celular de membrana que incluem a família de receptores TNF, FasR ou CD95, TRAIL21 e TRAILR2 quanto com a sinalização proveniente de dano ao DNA pela ação do fator nuclear-kB (NF-kB) causando uma cascata de morte independente da ação das caspases. Tais fatores que iniciam necrose acionam as proteínas quinase que interagem com os receptores (RIPKs), como as RIP1 e RIP3, dando continuidade ao processo necrótico programado (CHAN; LUZ; MORIWAKI, 2014).

A necrose programada é considerada como um plano alternativo em relação ao não funcionamento da apoptose. Contudo, já foi demonstrado que no período embrionário e na fase adulta, essas 2 formas de PCD agem concomitantemente na manutenção da homeostase tecidual. Não obstante, os mecanismos moleculares de substituição de um tipo de morte celular pelo outro ainda não foram claramente descritos (ZHANG et al., 2009; DAGENAIS; DOUGLAS; SALEH, 2014).

1.5 Produtos semissintéticos como fonte de fármacos a partir de reações de hemissíntese: derivados de diterpenos labdânicos e suas aplicações

Do século XX para o XXI, ocorreu um avanço extraordinário na busca de novos fármacos para combate de diversas doenças, sobretudo as neoplasias, com o uso de produtos que possuem algum componente de origem natural em sua composição. Nesse contexto, os produtos naturais vêm se mostrando de grande importância nessa jornada, sendo as plantas e os

micro-organismos grandes aliados (COSTA-LOTUFO, 2010). No entanto, certamente essa história não é recente, visto que há registros do uso de componentes naturais não isolados para as mais variadas funções e mais variadas formas de administração, sobretudo a partir de plantas, sendo o que classificamos hoje por Etnobotânica Medicinal (GURIB-FAKIM, 2006).

Hoje em dia a ciência está bastante focada no isolamento da possível molécula responsável pelo princípio ativo desejado, permitindo iniciar testes *in vitro* e *in vivo* (LEE, 1999). Todavia, as moléculas de origem natural isoladas não necessariamente servirão da melhor forma para o fim farmacêutico designado, é então que compostos naturais podem auxiliar na geração de outras moléculas com propriedades biotecnológicas e farmacêuticas diferentes e melhoradas através de processos químicos (ORTHOLAND; GANESAN, 2004).

Nessa conjuntura, a reação de hemissíntese é de grande utilidade na estratégia de ampliar a quantidade de moléculas possíveis, a partir de uma única molécula de isolamento de origem natural. O produto molecular resultado da reação de hemissíntese gera uma estrutura semissintética, ou seja, parte de origem natural e parte de origem sintética. Sendo assim, esse processo se insere na busca de substâncias inéditas, análogas às substâncias naturais, com uma possibilidade de melhor resposta farmacológica e também bioativa como já é altamente reportado na literatura científica (BALUNAS; KINGHORN, 2005; SILVA et al., 2010; SILVA JUNIOR, 2015).

As moléculas derivadas de extratos de diferentes partes de plantas podem servir de base para a reação de hemissíntese e são de grande utilidade na farmacologia atualmente. Como exemplo, destaca-se nesse trabalho a planta do gênero *Moldenhawera*, com taxonomia não totalmente definida e de difícil classificação, no qual pertence a família Leguminosae e possui cerca de 10 espécies, com distribuição geográfica concentrada ao nordeste do Brasil. A espécie *Moldenhawera nutans* tem porte arbustivo, sendo ao que tudo indica limitada endemicamente ao estado da Bahia primordialmente em áreas de restinga e é usada como modelo para extração de compostos com atividades biológicas importantes (DAVID et al., 1998; do VALE et al., 2005; SILVA JUNIOR, 2015).

Dentre os compostos encontrados em *Moldenhawera nutans* são ressaltados os diterpenos labdânicos, que constituem uma classe bastante diversa de diterpenos cíclicos, no qual tem sua principal origem em vegetais. Vem sido reportada na literatura uma vasta aplicação biológica, são exemplos: atividade antitumoral, antifúngica, antibacteriana, anti-inflamatória, antiprotozoária; bem como indutora enzimática no controle da hipertensão vascular e na proteção gástrica; além de também terem sido reportados como possíveis moduladores da atividade de células do sistema imune e de receptores neurológicos

(SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2005; LAHLOU et al., 2007; KOUKOULITSA et al, 2008; KIM et al.; SCHRAMM et al., 2013; CORREIA JUNIOR et al., 2014).

Alguns grupos de pesquisa vêm aplicando a reação de hemissíntese de derivados de diterpenos labdânicos naturais a fim de produzir e estudar diferentes estruturas químicas inéditas e suas possíveis atividades biológicas. Dentre outros compostos dessa classe, o ácido labdênico 16 (Figura 3), também conhecido como ácido labd-8(20)-en-15-óico que consiste numa olefina natural de origem vegetal extraído comumente de plantas do gênero *Cistus* (majoritariamente *Cistus symphytifolius* e *Cistus palinhae*) e também da espécie *Moldenhawera nutans* que se mostrou como uma poderosa fonte desse produto natural. Por conseguinte, a partir da reação de arilação de Heck-Matsuda é possível produzir compostos aril-labdânicos hemissintéticos, *adutos de Heck*, inéditos para a investigação de suas possíveis atividade biológicas, sobretudo anticâncer (CALABUIG, 1981; KOUKOULITSA et al, 2008; SILVA JUNIOR, 2015). Dessa maneira, adutos de Heck serviram de base para realização desse estudo, cujas estruturas foram preservadas por proteção da propriedade intelectual, pois possivelmente serão enviados para depósito de patente.

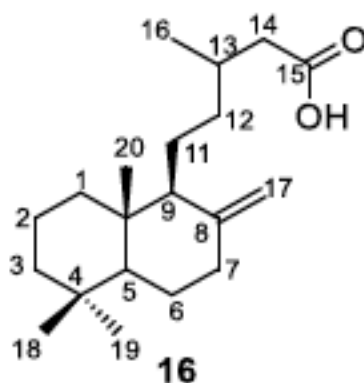


Figura 3: Estrutura molecular do ácido labdênico 16 (Fonte: SILVA JUNIOR, 2015).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial citotóxico *in vitro* de adutos de Heck inéditos derivados do ácido labdênico 16 em linhagens celulares leucêmicas e não cancerígenas.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar um screening avaliando o potencial citotóxico dos compostos AH-1, AH-2, AH-3, AH-4, AH-5, AH-6, AH-7 e AH-8 frente a linhagem de leucemia monocítica aguda Thp-1;
- Avaliar o potencial citotóxico dos compostos AH-2, AH-3, AH-7 e AH-8 frente a linhagem de leucemia mieloide aguda K562 e suas respectivas seletividades frente a linhagem não-cancerígena humana HUVEC;
- Determinar o efeito de AH-8 na distribuição do DNA nas fases do ciclo celular de K562;
- Examinar a indução da produção de espécies reativas de oxigênio por AH-8 em K562;
- Identificar o efeito do composto AH-8 na indução da apoptose ou necrose em K562;
- Analisar se há indução de morte celular por autofagia provocado por AH-8 em K562.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

- Balões Volumétricos (250 a 1000mL)
- Béqueres (100 a 1000mL)
- Câmara de Neubauer
- Erlenmeyer (200 a 500mL)
- Frasco para cultivo celular (25cm² e 75cm²)
- Frascos para armazenamento de soluções (250, 500 e 1000mL)
- Kitassato (500 e 1000mL)
- Pipetas do tipo pasteur estéreis
- Placa de pétri
- Placas estéreis (24 e 96 poços)
- Ponteiras
- Provetas (100 a 1000mL)
- Tubos do tipo “ependorffs” (1,5 e 2mL)
- Tubos do tipo “falcon” (15 e 50mL)

3.2 Equipamentos

- Agitador de placas (Shaker PSU-2T Plus)
- Agitador magnético com controle de temperatura (Vextor)
- Autoclave (Vertica Phoenix)
- Balança analítica modelo AY220 (Shimadzu)
- Banho maria com agitação (Nova Ética)
- Centrífuga (HERMLE Labortechnik GmbH)
- Citômetro de fluxo (BD FACS Calibur)
- Estufa HF212 UV Ultrasafe (Biosystem)
- Estufa de secagem (De Leo)
- Fluxo laminar EcoPa300 (Pachane)
- Fluxo laminar Pa410 (Pachane)
- Freezer -20°C DC41 (Electrolux)

- Leitor de ELISA ELx800 (Biotek Instruments)
- Microscópio óptico de inversão XS 201 (Taimin)
- Microscópio óptico de inversão (Medilux)
- pHmetro (Quimis)
- Refrigerador (Electrolux)
- Ultra freezer -86°C (Indrel)
- Ultra purificador de água (New Human UP900)
- Vórtex QL-901 (Vertex)

3.3 Reagentes e soluções

- Álcool etílico 70% (Toscano)
- Azul de tripan 4%, (Sigma)
- Dimetilsulfóxido, DMSO (Cristália 36)
- EDTA 0,5M (Sigma)
- Etoposídeo (Amresco)
- Sonda molecular H₂DCFDA (Sigma)
- Iodeto de propídio 50µg/mL de PBS (Sigma)
- Meio de cultura celular RPMI 1640 (Sigma)
- MTT (Amresco)
- Salina tamponada com sais de fosfato (PBS) (Vetec)
- SDS/HCL, 10g de SDS (Amresco), 100mL HCL 0,01N (Fisher)
- Solução de antibióticos: penicilina e estreptomicina (Sigma)
- Solução de tripsina/EDTA (Amresco)
- Soro Bovino Fetal Inativado (SBF) (Cripion)
- Tampão de lise para análise do ciclo celular, 50mg de citrato de sódio (Grupo Química), 50µL de Triton-X (Isofar), 2,5mg de IP (Sigma).

3.4 Modelos de experimentação *in vitro*

3.4.1 Cultivo de modelos *in vitro* (linhagens celulares)

Para que esse estudo fosse realizado, foi utilizado células cancerígenas e não-cancerígenas (Tabela 1) obtidas através do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) ou de colaboradores. Os cultivos foram feitos no Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular no Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba.

As células utilizadas (Figura 4, 5 e 6), sendo cancerígenas e não-cancerígenas, em todos os experimentos foram cultivadas em frascos estéreis com meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e acrescidos dos antibióticos penicilina (100U/mL) e estreptomicina (100µg/mL). Tais frascos de cultivo foram mantidos em estufa com temperatura controlada de 37°C e 5% de CO₂. Houve monitoramento diário do crescimento celular utilizando microscopia óptica invertida.

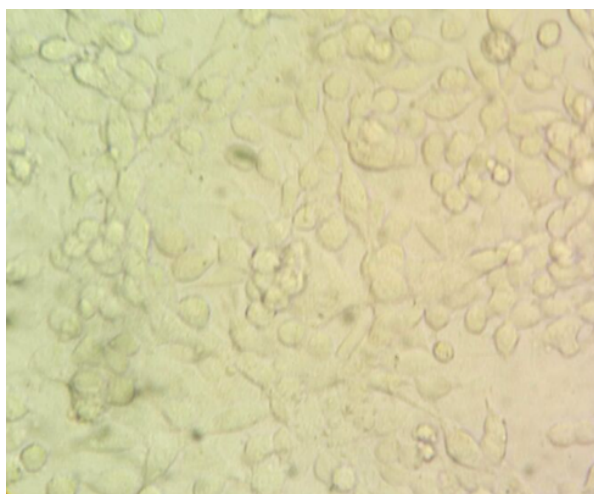
A troca do meio de cultura era realizada periodicamente a cada dois dias. As células aderentes demandavam o uso da solução tripsina/EDTA afim de solta-las do frasco de cultivo quando se atingia a confluência de 80%. O cultivo celular ficava em contato com a solução de tripsina/EDTA no volume de 1,5mL por 5 minutos, ou até notar-se o deslocamento da monocamada na parede do frasco. Posteriormente a ação da tripsina/EDTA era bloqueada com o uso de meio RPMI/SBF, e as células então centrifugadas. As linhagens não aderentes foram diretamente centrifugadas. Ambas eram centrifugadas a 200 g durante 5 minutos.

Para assegurar a viabilidade celular da linhagem no frasco de cultivo, era feita contagem na câmara de Neubauer utilizando a técnica de exclusão por azul de tripan. Quando a membrana celular está íntegra, o azul de tripan não penetra na célula, indicando assim que a célula está viável. Já na célula de membrana danificada, o corante consegue penetrar deixando a célula com uma cor azulada podendo assim ser identificada e contada como inviável no microscópio óptico invertido. Quando a amostra possuía 90% de células viáveis, poderia seguir para a experimentação (STROBER, 2015). O seguinte cálculo de contagem de viabilidade celular foi utilizado:

$$\% \text{ de viabilidade celular} = \frac{\text{número de células viáveis}}{\text{número de células totais}} \times 100$$

Tabela 1: Linhagens modelo utilizadas para os ensaios de citotoxicidade *in vitro*.

<i>Linhagem</i>	Tipo histológico da linhagem celular	Origem	Tipo de cultura
<i>HUVEC</i>	Não-cancerígena – Imortalizadas isoladas do endotélio de cordão umbilical humano	Humana	Aderente
<i>K562</i>	Tumoral – Leucemia mieloide crônica	Humana	Não- aderente/em suspensão
<i>Thp-1</i>	Tumoral – Leucemia monocítica aguda	Humana	Não- aderente/em suspensão

**Figura 4: Fotomicrografia de linhagem não-tumoral HUVEC em microscópio óptico invertido com aumento de 400x.**

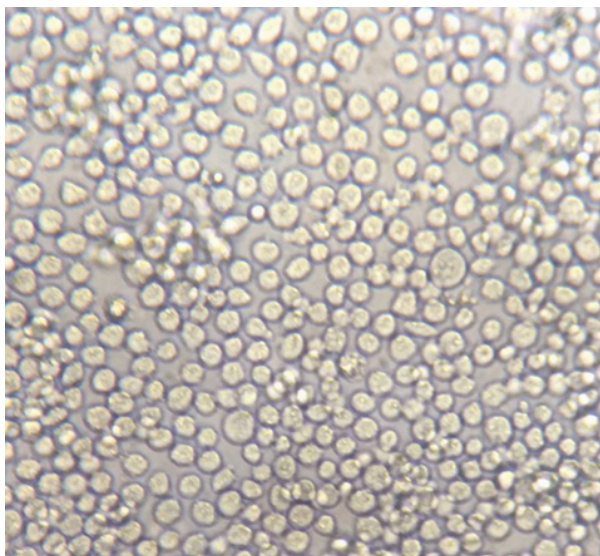


Figura 5: Fotomicrografia de linhagem leucêmica K562 em microscópio óptico invertido com aumento de 400x.

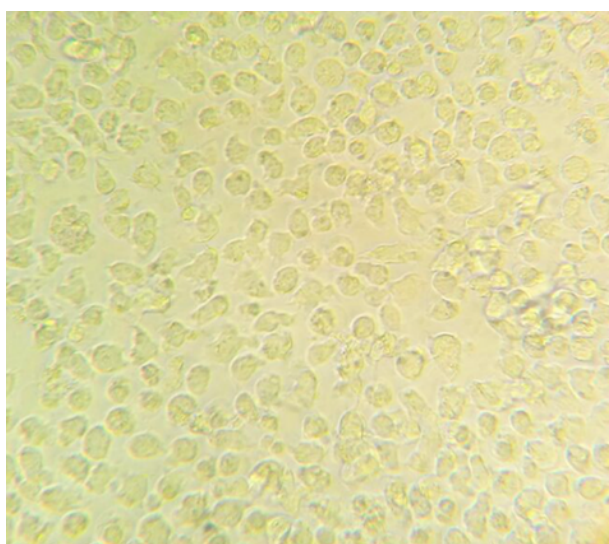


Figura 6: Fotomicrografia de linhagem leucêmica Thp-1 em microscópio óptico invertido com aumento de 400x.

3.5 Métodos experimentais

3.5.1 Moléculas estudadas

As moléculas estudadas foram sintetizadas através da reação de arilação de Heck-Matsuda a partir do ácido labdênico 16 (Figura 3) puro isolado da planta de espécie *Moldenhawera nutans*. As estruturas moleculares dos adutos de Heck, todas inéditas, não serão

reveladas nesse trabalho para preservar a propriedade intelectual. Todas as moléculas utilizadas foram purificadas e sintetizadas, sendo gentilmente cedida pela equipe do professor Dr. Jailton de Souza Ferrari do Departamento de Química, da Universidade Federal da Paraíba.

Para a realização dos ensaios, os 8 adutos de Heck, denominados AH-1, AH-2, AH-3, AH-4, AH-5, AH-6, AH-7 e AH-8, foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) puro e estéril, com concentração de DMSO não superior a 1%, para o preparo da solução estoque a uma concentração de 50mM. A partir da solução estoque de 50mM, era realizada uma diluição seriada em meio RPMI para obtenção das concentrações finais utilizadas no tratamento.

3.5.2 Ensaio colorimétrico por redução de MTT

A técnica de redução de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium]) consiste num ensaio colorimétrico que serve para a inferência da citotoxicidade, proliferação e/ou viabilidade celular. A redução de MTT ocorre nas células viáveis através do metabolismo intracelular indireto feito pelo subproduto, NADH e NADPH, de enzimas mitocondriais e lisossomais (MOSMANN, 1983; LIU et al, 1997). Então, o MTT que é um sal com estrutura de anel tetrazólio hidrossolúvel é reduzido em cristais de formazan não hidrossolúveis de cor púrpura a terem a intensidade da absorbância mensurada por espectrofotometria do tipo ELISA. Considera-se assim, a intensidade de absorbância lida pelo ELISA diretamente proporcional a quantidade de células viáveis em cada poço pós-tratamento (FAHEINA-MARTINS, 2009; RISS et al, 2013).

O índice de seletividade (SI) é utilizado para indicar a ação seletiva de um composto em relação a mais de uma linhagem celular, podendo assim indicar um potencial anticâncer da substância. Nesse estudo foi determinado que quanto maior o valor do índice de seletividade, mais seletivo é o aduto de Heck. Então, o SI corresponde ao valor da CI_{50} da linhagem cancerígena (K562) dividido pela CI_{50} da linhagem não-cancerígena (HUVEC) (SUFFNESS; PEZZUTO; ROMERO et al., 1991; CITALINGAM et al., 2015):

$$\text{Índice de Seletividade (SI)} = \frac{CI_{50} \text{ da linhagem cancerígena}}{CI_{50} \text{ da linhagem não-cancerígena}}$$

Primeiramente foi realizado um “screening” das moléculas modelo na linhagem de leucemia monocítica aguda (Thp-1) afim de avaliar a citotoxicidade baseado nos valores das CI_{50} . As moléculas que apresentaram efeito citotóxico em Thp-1 prosseguiram para a avaliação de citotoxicidade e do SI as linhagens de leucemia mieloide crônica (K562) e não-cancerígena

(HUVEC). Quando a molécula não apresentou atividade nas concentrações testadas no período de incubação de 72 horas, não foi realizado o teste de redução de MTT em 24 horas.

Protocolo experimental:

Após o teste de viabilidade com azul tripan (>90%), as células foram incubadas em placas de 96 poços, para serem colocadas numa estufa durante o tratamento a condições reguladas de temperatura de 37°C e 5% de CO₂ numa densidade celular em cada poço de 5x10⁴ células/mL para células não-aderentes (em suspensão); e 3x10⁴ células/mL para células aderentes.

Posteriormente, foi adicionada a substância a ser testada nas concentrações de 6,25 a 200µM/mL, e incubadas nos períodos de tratamento de 24h e/ou 72h. Para células aderentes a substância foi adicionada logo após o plaqueamento das células, já para células aderentes foi respeitado o tempo de adesão celular à placa: portanto a substância foi colocada apenas no dia seguinte ao plaqueamento. Respeitado os períodos de incubação de 24h ou 72h, o tratamento foi interrompido para uma lavagem com solução salina (PBS), e subsequente adição de MTT (5mg/mL de PBS) e esperado o período de 4h (necessário para a metabolização do MTT em azul de formazan pelas células viáveis) nos quais foi adicionado a solução de SDS/HCl.

Finalmente, as placas foram colocadas no agitador de placas pelo período de “overnight” afim de ajudar na solubilização dos cristais de formazan, sendo em seguida mensuradas por espectrofotômetro do tipo ELISA com filtro de 570nm.

Análise de dados de ensaio colorimétrico de redução de MTT:

Cada experimento foi feito em triplicata e repetido no mínimo 3 vezes respeitando um $n \geq 3$. A representação dos resultados foi feita por gráficos de barra com um eixo representando a porcentagem de viabilidade celular *versus* concentração de substância (6,25 a 200 µM/mL). Com base nos resultados obtidos pôde ser determinada a CI₅₀ (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) usando uma curva de regressão não-linear utilizando o software *GraphPad Prism*, versão 6.0. Os dados então foram comparados por análise de variância ANOVA seguida do pós-teste de Bonferroni, sendo considerada uma diferença significativa quando $p < 0,05$.

3.5.3 Estudo dos mecanismos de morte celular por citometria de fluxo

Todos os experimentos em citometria de fluxo seguiram o seguinte protocolo: após o teste de viabilidade por exclusão de azul tripan (>90%), as células foram incubadas em placas de 24 poços para serem colocadas numa estufa durante o tratamento a condições reguladas numa estufa a temperatura de 37°C e 5% de CO₂ numa densidade celular de 1x10⁶ células/mL. Posteriormente, foram tratadas por 24 horas com o composto AH-8 considerando as concentrações da CI₅₀, CI₅₀/2 e CI₅₀/4 (100, 50 e 25µM). Foi utilizado como controle positivo o etoposídeo considerando a CI₅₀ da substância testada na célula modelo.

3.5.3.1 Análise do conteúdo de DNA e sua distribuição nas fases do ciclo celular

Quando a célula deixa a fase de quiescência (G₀) e reingressa no ciclo, é possível se identificar 4 fases diferentes: G₁, S, G₂ e M, sendo cada uma caracterizada por sua quantidade de DNA. Com exceção das fases G₂ e M que possuem a mesma quantidade, todas as fases são distinguíveis entre si utilizando esse parâmetro. Sendo assim, a avaliação das fases do ciclo celular utiliza-se o iodeto de propídio (PI) que se liga ao DNA da célula que teve sua membrana rompida pela ação de uma solução detergente utilizada no protocolo (0,1% de triton X-100, 0,1% de citrato de sódio e 50µg/mL). Consequentemente, a fluorescência gerada pelo PI no citômetro é diretamente proporcional a quantidade de DNA na célula, determinando assim sua fase no ciclo (NUNEZ, 2001).

Protocolo experimental:

Após o período de tratamento as células foram transferidas para um microtubo do tipo “ependorffs” e centrifugadas a 400g por 5 minutos em temperatura ambiente, além de seguidos de lavagem com PBS. O ‘pellet’ celular foi ressuscitado na solução de lise da membrana contendo PI, por 30min a 4°C de temperatura. Subsequentemente, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo modelo FACS Calibur (BD Biosciences), tendo o PI sido excitado pelo laser azul de 488 nm no filtro 585/42 nm (FL2).

3.5.3.2 Avaliação da apoptose por externalização da fosfatidilserina (PS) e necrose por marcação com iodeto de propídio (PI)

Um dos primeiros sinais de mudanças morfológicas durante a apoptose é a externalização da PS, que em células saudáveis fica apenas na superfície interna da membrana celular ainda intacta (OUYANG et al., 2012). Dessa forma, quando há mudança nessa distribuição de PS, pode-se indicar que a célula está sofrendo um processo de apoptose e esse fator manifesta às células adjacentes atraindo-as para posterior fagocitose dos corpos apoptóticos (MARTIN et al., 1995). A anexina V associada a um fluorocromo, liga-se, dependentemente de Ca^{2+} à PS exposta na parte exterior da membrana celular ainda íntegra indicando apoptose na sua fase inicial. No entanto, quando a anexina V é colocada junto com um marcador de DNA, como o PI, é possível assim diferenciar células na fase mais tardia da apoptose, já que só penetram quando há dano na membrana da célula, sendo marcadas duplo-positivamente (VERMES et al., 1995; WANG et al., 2004). Por conseguinte, células não marcadas foram consideradas viáveis (AnexinaV-/PI-); células em apoptose inicial (AnexinaV+/PI-); células em necrose (AnexinaV-/PI+) e células em apoptose tardia (AnexinaV+/PI+).

Protocolo experimental

Posterior ao período de tratamento das células com o composto por 24h, as células foram lavadas com PBS e em seguida centrifugadas a 400g por 5 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi completamente removido e o pellet ressuspensionado na solução de 100 μ L do tampão de ligação e marcado com 1 μ L de AnexinaV-Alexafluor kit (*Invitrogen*, USA) e 100 μ M de PI, esperando o período de 30 minutos no escuro à 4° C. Passados os 30 minutos, foi adicionado mais 400 μ L do tampão de ligação, no qual as amostras foram levadas para a leitura em citometria de fluxo modelo FACSCalibur (BD Biosciences), sendo ambos PI e Alexafluor 488 excitados pelo laser azul 488 nm, e lidos nos filtros FL3 (670 nm) e FL1 (530/30 nm), respectivamente.

3.5.3.3 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

As EROs são produzidas pelas células durante seu metabolismo, principalmente na geração de energia dependente de oxigênio na mitocôndria. As EROs são instáveis eletronicamente, por isso possuem uma forte tendência a ser oxidado/reagir com outras moléculas presentes no citoplasma podendo até destruir sítios ativos de proteínas e danificar

organelas. Regularmente, as células possuem seus mecanismos para neutralizar as EROs presentes no citoplasma e evitar o estresse oxidativo, porém quando sua capacidade de neutralização fica limitada, os EROs acumulam gerando danos ao metabolismo celular podendo dessa forma induzir morte celular programada dependente de EROs (JACOBSON, 1996; THANNICKAL; FUNBURG, 2000).

A sonda molecular H₂-DCFH-DA é utilizada como indicador de EROs uma vez que quando penetra na membrana celular, o seu metabólito é oxidado pelas EROs presentes no citoplasma emitindo fluorescência passível de ser mensurada por citometria de fluxo. (KUBO et al., 2008).

Protocolo experimental

Depois de plaqueadas e tratadas com o composto por 24h, as células foram lavadas com PBS, centrifugadas a 400g por 5 minutos e retirado todo sobrenadante. As células foram ressuspendidas com 500µL em solução da sonda molecular H₂-DCFH-DA (10µM) por 30 minutos na ausência de luz a 37°C. Então, a fluorescência emitida pela sonda molecular nas células foi mensurada e analisada por citômetro de fluxo modelo FACSCalibur (BD Biosciences), sendo excitado pelo laser azul 488nm e detectados pelo filtro FL1 (530/30 nm).

3.5.3.4 Marcação de organelas vesiculares ácidas (AVOs) como indicador de autofagia

Durante o processo de morte celular por autofagia, porções do citoplasma e subpartes de organelas danificadas são sequestradas pelo retículo endoplasmático formando vesículas de membrana dupla, chamadas de autofagossomo, que posteriormente se fundem com o lisossomo formando o autofagolisossomo. Essas vesículas são consideradas organelas vesiculares ácidas (AVOs) (PAGLIN et al., 2001).

O composto Laranja de Acridina (AO) é um corante básico que consegue penetrar na membrana celular devido sua característica lipofílica. Uma vez que o AO penetra na célula, ela aceita prótons de substâncias com pH ácido tornando-se positivo em carga ficando impedido de passar por membranas celular lipídicas ficando assim retidas em compartimentos ácidos. Dessa forma, o AO que tem fluorescência verde em pH básico passa a emitir fluorescência vermelha/alaranjada quando em contato com vesículas ácidas, nesse caso as AVOs, que são produtos do processo autofágico. Nesse contexto, a AO serve como marcador de autofagia (TRAGANOS; DARZYNKIEWICZ, 1994; KANZAWA et al., 2003).

Protocolo experimental

Após o período de 24h de incubação com o composto, as células foram lavadas com PBS, centrifugadas a 400g por 5 minutos e retirado todo sobrenadante. O pellet foi ressuspendido com 500 μ L de solução de AO (1 μ g/mL) diluída em meio de cultura por 30 minutos em temperatura ambiente abrigado da luz. Então, as amostras tiveram suas fluorescências mensuradas e analisadas por citômetro de fluxo modelo FACS Calibur (BD Biosciences).

3.5.4 Análise dos dados em citometria de fluxo:

Para todos os experimentos feitos através da citometria de fluxo foi utilizado o equipamento de Citômetro FACS Calibur (BD Biosciences), que no momento da leitura/aquisição das amostras foi operado com o auxílio do programa *BD CellQuest Pro Software 6.0*. Cada experimento foi feito em duplicata para cada concentração e repetidos minimamente 2 vezes respeitando um $n \geq 2$. De cada amostra, foram lidos 10 mil eventos, considerando cada evento uma célula detectada pelo citômetro.

Utilizando o software *GraphPad Prism* na versão 6.0, os dados foram expressos como média \pm desvio padrão em seguida comparados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do pós-teste de Newman-Keuls, sendo que para ser considerada alguma diferença significativa é necessário o $p < 0,05$.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação do efeito citotóxico dos adutos de Heck

Afim de avaliar o potencial citotóxico dos 8 adutos de Heck derivados do ácido labdênico 16 (AH-1, AH-2, AH-3, AH-4, AH-5, AH-6, AH-7 e AH-8), foi empregado inicialmente o ensaio de redução de MTT em linhagem de leucemia monocítica aguda (Thp-1) como modelo para o “screening”. Então, os resultados do screening das moléculas em ensaio de MTT nos períodos de 24h e 72h estão demonstrados na Tabela 2.

Foi possível observar que 4 compostos apresentaram citotoxicidade nas concentrações testadas, sendo esses compostos: AH-2, AH-3, AH-7 e AH-8. A diminuição da viabilidade celular foi dependente de concentração e tempo de tratamento em Thp-1.

O composto AH-2 apresentou citotoxicidade no período de 24h com CI_{50} de $180 \pm 3,1\mu\text{M}$; e em 72h de $68,4 \pm 3,3\mu\text{M}$. Já o aduto AH-3 foi citotóxico apenas no período de tratamento de 72h com CI_{50} de $91,2 \pm 3,2\mu\text{M}$, sem atividade em 24h.

Se tratando do aduto de Heck AH-7, apresentou efeito em ambos os períodos de tratamento 24h e 72h, com CI_{50} de $177,8 \pm 3,1\mu\text{M}$ e $106 \pm 3,4\mu\text{M}$ respectivamente. Por fim, pode-se destacar o composto AH-8, que expressou o melhor resultado dentre todos os derivados testados em ambos os períodos de incubação, com CI_{50} de $68 \pm 3,2\mu\text{M}$ para 24h; e $32,7 \pm 3,2\mu\text{M}$.

Tabela 2: Efeito citotóxico dos adutos de Heck (AH) e do etoposídeo (Etop.) com 24h e 72h de tratamento sobre a linhagem Thp-1. Demonstrado pela média dos valores de CI_{50} (μM) \pm EPM. NT corresponde a não testados.

Linhagem AH	Thp-1	
	24h	72h
AH-1	NT	>200
AH-2	180,0 \pm 3,1	68,4 \pm 3,3
AH-3	>200	91,2 \pm 3,2
AH-4	NT	>200
AH-5	NT	>200
AH-6	NT	>200
AH-7	177,8 \pm 3,1	106,0 \pm 3,4
AH-8	68,0 \pm 3,2	32,7 \pm 3,2

Posteriormente, os 4 adutos que apresentaram citotoxicidade satisfatória foram utilizados nos ensaios de viabilidade celular por redução de MTT na linhagem leucêmica mais resistente K562 e na linhagem não-cancerígena HUVEC, gerando a Tabela 3.

Tabela 3: Efeito citotóxico dos adutos de Heck (AH) e do etoposídeo (Etop.) com 24h e 72h de tratamento sobre as linhagens K562 e HUVEC. Demonstrado pela média dos valores de CI_{50} (μM) \pm EPM. NT: não testados. ND: não se aplica.

Linhagens AH	HUVEC		K562		Índice de Seletividade (SI)	
	24h	72h	24h	72h	24h	72h
AH-2	>200	194,5 \pm 3,1	>200	168,9 \pm 3,9	ND	1,15
AH-3	NT	>200	NT	>200	ND	ND
AH-7	NT	>200	NT	>200	ND	ND
AH-8	194,2 \pm 3,0	100 \pm 3,0	97,85 \pm 3,9	54,58 \pm 3,4	1,98	1,83
Etop.	NT	NT	>50	NT	ND	ND

O composto AH-2 demonstrou efeito em 72h com CI_{50} de $168,9 \pm 3,9\mu M$ sobre K562; já sobre HUVEC, também em 72h, obteve CI_{50} de $194,5 \pm 3,1\mu M$. O aduto AH-8 por sua vez, também demonstrou ter efeito dependente de tempo e concentração tanto sobre HUVEC com CI_{50} de $194,2 \pm 3,0\mu M$ no tratamento em 24h e $100 \pm 3,0\mu M$ em 72h, quanto sobre K562 com CI_{50} de $97,85 \pm 3,9\mu M$ em 24h e $54,58 \pm 3,4\mu M$ em 72h. É possível destacar então que AH-8 possui atividade em ambos os tempos de tratamento, 24h e 72h, enquanto que AH-2 só mostrou atividade em 72h em ambas as linhagens.

Ainda na tabela 3, quanto ao SI, o composto AH-8 mostrou maior seletividade quando comparado com AH-2. AH-8 obteve SI de 1,98 para 24h e 1,83 para 72h, maior que em AH-2 com SI de 1,15 para 72h de tratamento e não aplicável para 24h já que não demonstrou efeito citotóxico em ambas as linhagens.

4.2 Avaliação do tipo de morte celular por AH-8 em leucemia mieloide crônica (K562)

Para avaliar os mecanismos de morte celular induzidos por adutos de Heck foram feitos diversos ensaios em citometria de fluxo para analisar diferentes parâmetros associados a morfologia celular que pudessem ajudar a caracterizar o tipo de morte celular causado.

Uma vez que a AH-8 obteve a menor CI_{50} e o maior SI de todos os adutos de Heck em todas as linhagens, mostrou-se a molécula com resultados mais promissores. Então, o composto AH-8 foi escolhido para dar continuidade aos estudos. Além disso, a linhagem K562 foi selecionada como modelo para a elucidação do mecanismo de morte celular ativado por AH-8 no período de 24h em diferentes concentrações (100, 50 e $25\mu M$).

4.2.1 A distribuição do ciclo celular de K562 é afetada por AH-8

A distribuição do ciclo celular foi avaliada pela análise de fluorescência de PI, diretamente proporcional a quantidade de DNA nas células, dando assim indiretamente a indicação da fase do ciclo que as células se encontram durante o tratamento de 24h em concentrações (100, 50 e $25\mu M$) diferentes de AH-8 comparados com o composto etoposídeo ($100\mu M$) (Tabela 4).

AH-8 atuou de forma concentração-dependente na distribuição do ciclo celular, e mostrou um aumento significativo da fração hipodiploide (subG1) (Figura 7) de $6,46\% \pm 0,68$ nas células sem tratamento para $35,85\% \pm 5,43$ na concentração de $100\mu M$ e conseqüentemente

diminuindo sua distribuição nas fases G1 (de $43,51\% \pm 0,36$ no controle para $27,45\% \pm 1,83$) e G2/M (de $25,56\% \pm 0,69$ no controle para $17,08\% \pm 1,15$). O etoposídeo, usado como controle positivo a $100\mu\text{M}$, causou efeito com o aumento significativo da porcentagem de células na fase G1.

Tabela 4: Efeito do composto AH-8 e do etoposídeo a $100\mu\text{M}$ (Etop. $100\mu\text{M}$) na distribuição do DNA ao longo do ciclo celular na linhagem K562. Valores expressos em porcentagem (%) \pm EPM de dois experimentos em duplicata com dados analisados por ANOVA seguido de pós-teste de Newman-Keuls, onde $**p < 0,01$ e $****p < 0,0001$.

Fase	Controle (%)	25 μM (%)	50 μM (%)	100 μM (%)	Etop.100 μM (%)
SubG1	$6,46 \pm 0,68$	$7,20 \pm 0,81$	$8,48 \pm 0,80$	$35,85 \pm 5,43****$	$12,98 \pm 0,05$
G1	$43,51 \pm 0,36$	$44,52 \pm 1,92$	$43,33 \pm 1,66$	$27,45 \pm 1,83****$	$20,60 \pm 1,54****$
S	$22,8 \pm 0,45$	$24,44 \pm 1,14$	$23,16 \pm 0,62$	$18,23 \pm 1,83$	$25,99 \pm 3,99$
G2/M	$25,56 \pm 0,69$	$24,11 \pm 1,48$	$21,86 \pm 1,79$	$17,08 \pm 1,15**$	$30,38 \pm 4,44$

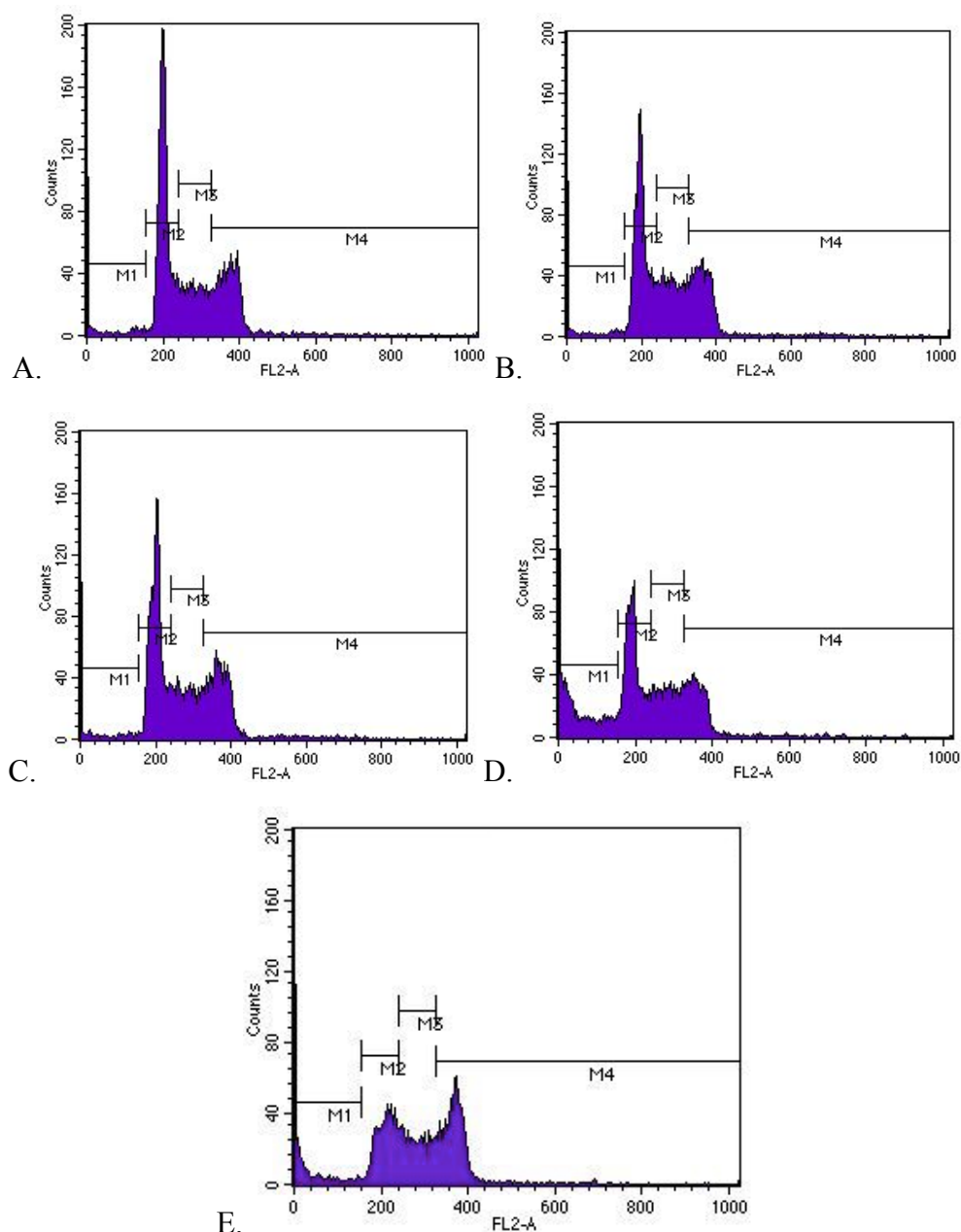


Figura 7: Histograma representativo da quantidade de DNA a partir do efeito do composto AH-8 ao longo do ciclo celular na linhagem K562. A) controle sem tratamento; B) AH-8 (25 μ M); C) AH-8 (50 μ M); D) AH-8 (100 μ M); e E) etoposídeo (100 μ M). A área sinalizada por M1, M2, M3 e M4 representam respectivamente: subG1, G1, S e G2/M.

4.2.2 AH-8 induz produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em K562

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são gerados através do metabolismo celular, majoritariamente mitocondrial. As células possuem mecanismos antioxidantes para diminuir os níveis de EROs no citoplasma, porém uma vez que seus níveis ficam demasiadamente elevados,

tais moléculas podem reagir com outros compostos causando alterações no metabolismo ou mesmo danos ao DNA, consequentemente induzindo PCD (JACOBSON, 1996; THANNICKAL; FUNBURG, 2000).

Afim de avaliar o papel do composto AH-8 na produção de EROs em K562 foi utilizado a sonda H₂DCFDA, que na presença de EROs no interior da célula se oxida e emite fluorescência que pode ser mensurada através da citometria de fluxo.

Foi então observado (Figura 9) que na máxima concentração testada (100µM) o composto AH-8 induziu produção de espécies reativas de oxigênio em $17,72 \pm 2,22\%$ em comparação com o grupo de células controle não tratadas. O controle positivo utilizado por sua vez, etoposídeo, obteve resultado inferior a AH-8 pois não foi capaz de induzir a produção de EROs na concentração de 100µM.

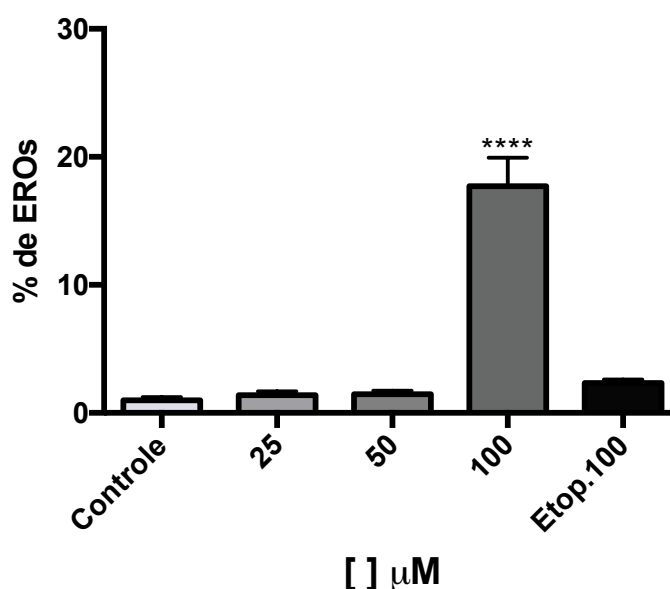


Figura 8: Gráfico da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pela linhagem K562 tratadas com AH-8 com período de incubação de 24h. Os dados estão expressos como média (%) ± EPM de dois experimentos em duplicata com dados analisados por ANOVA seguido de pós-teste de Newman-Keuls, onde ****p<0,0001.

4.2.3 Efeito do AH-8 na externalização da fosfatidilserina (PS)

A marcação dupla de anexina V e PI é utilizado na citometria de fluxo para identificar quais células estão viáveis, quais estão em processo de apoptose inicial ou tardia e quais estão em processo de necrose. A anexina V quando marcada em PS externalizado na membrana de

células e o PI intercala-se no DNA das células de membrana danificada. O composto AH-8 (Figura 8) não demonstrou aumento na marcação de anexina V/PI para nenhuma das concentrações testadas durante a incubação por 24h.

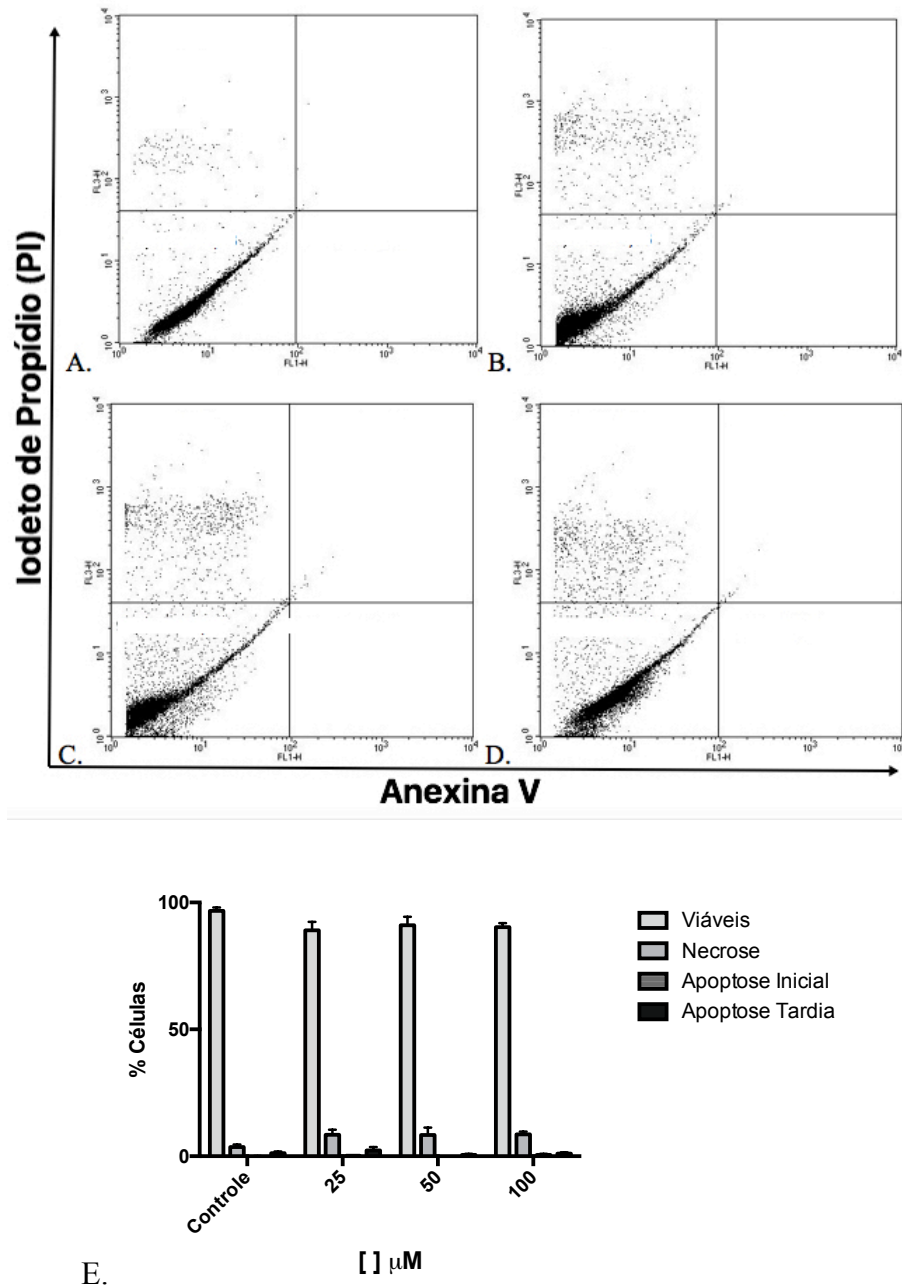


Figura 9: Gráficos de células (K562) marcadas com Anexina V e/ou PI após o tratamento com AH-8 por 24h. Os gráficos de ponto são representativos de A) controle sem tratamento; B) AH-8 (25 μ M); C) AH-8 (50 μ M); D) AH-8 (100 μ M); o gráfico de barras mostra E) a porcentagem de células em morte celular, no qual os dados estão expressos como média (%) \pm EPM de dois experimentos em duplicata com dados analisados por ANOVA seguido de pós-teste de Newman-Keuls.

4.2.4 Indução de autofagia por AH-8 em K562

Utilizando a marcação de AVOs por Laranja de Acridina foi possível observar que a partir da concentração de 50 μ M, o composto AH-8 já ativa os mecanismos de autofagia (Figura 10). A taxa de células apresentando perfil autofágico saiu de 3,91% \pm 1,1 no controle sem tratamento, para um aumento significativo com 14,58% \pm 1,7 em 50 μ M e 25,26% \pm 1,5 em 100 μ M. O etoposídeo obteve resultados similar a 50 μ M de AH-8, sendo o tratamento com 100 μ M capaz de gerar 13,26% \pm 1,88 de células com AVOs.

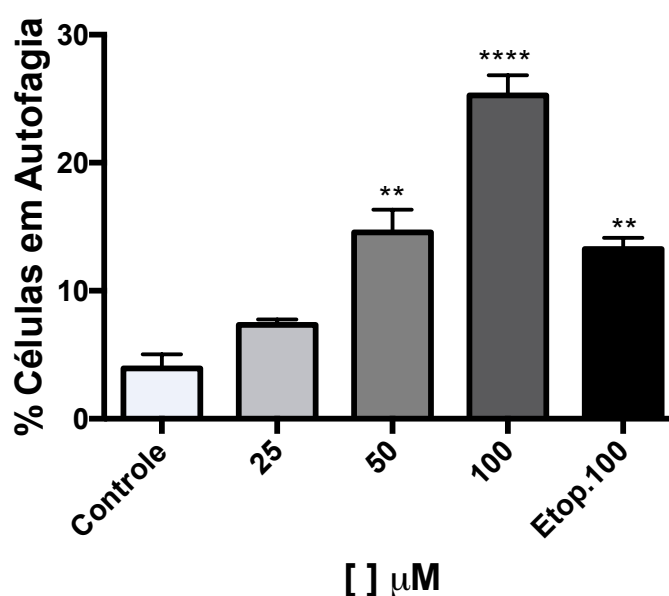


Figura 10: Gráfico das células K562 em processo de morte celular por autofagia marcadas com Laranja de Acridina induzidos por AH-8 no período de 24h. Os dados estão expressos como média (%) \pm EPM de dois experimentos em duplicata com dados analisados por ANOVA seguido de pós-teste de Newman-Keuls, onde ** $p < 0,01$; e **** $p < 0,0001$.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A organização mundial de saúde e o INCA reportam que nas últimas décadas vem crescendo ao longo dos anos o difundido índice de incidência e mortalidade do câncer (INCA, 2015; WHO, 2014). Visto que as terapias disponíveis não são totalmente seletivas e certos tipos de câncer, como a leucemia, podem oferecer resistência ação das drogas em fase de teste ou de uso clínico, ressalta-se que a busca de novos fármacos no tratamento dessa doença merece atenção (ROSE-INMAN; KUEHL, 2014). Nesse sentido, o estudo de moléculas inéditas utilizando linhagens celulares como modelo *in vitro* é o primeiro passo para determinar sua possível atividade anticâncer (ROGERO et al., 2003; MULLER, 2008). O presente trabalho se faz dessas afirmativas como premissas para sugerir uma possível nova alternativa de composto quimioterápico anticâncer com foco antileucêmico.

Como já é de uso extenso para testes *in vitro* de compostos antileucêmicos (LI et al., 2017), a linhagem de leucemia monocítica aguda (Thp-1) serviu como um modelo inicial para a avaliação da citotoxicidade dos 8 adutos de Heck propostos, no qual 4 deles demonstraram efeito citotóxico satisfatório. Em seguida, as linhagens de leucemia mieloide crônica (K562) e não cancerígena humana (HUVEC) também se mostraram importantes na avaliação do índice de seletividade dos adutos de Heck e posteriormente do tipo de morte celular induzido por AH-8 em K562.

Um grande problema das drogas citotóxicas utilizadas na clínica, sobretudo no tratamento do câncer, é que elas não são completamente seletivas, tendo em vista que tendem a alterar o funcionamento das células não-alvo, ou seja, células saudáveis (ANAZETTI et al., 2003; HE et al., 2014). O composto AH-8 teve efeito citotóxico mais atenuado na linhagem não-cancerígena HUVEC, em ambos períodos de incubação de 24h e 72h, quando comparada com a linhagens leucêmica K562. A CI_{50} de HUVEC foi em média a metade em comparação com a CI_{50} de K562 com índice de seletividade próximo a 2. Portanto, foi escolhido o composto AH-8 para avaliar o mecanismo de morte celular induzido.

Penthala et al. (2014) também utilizou produtos de Heck a partir de compostos naturais, como o partenolídeo e o melampomagnolídeo-B, para demonstrar a atividade antileucêmica em 60 linhagens diferentes com efeito na distribuição das fases do ciclo celular.

Os resultados obtidos e aqui descritos corroboram com outros estudos na literatura científica que mostram o potencial citotóxico e/ou antileucemia e anticâncer de produtos semissintéticos resultados da reação de Heck-Matsuda (SCHMEDA-HIRSCHMANN et al.,

2005; LAHLOU et al., 2007; KOUKOULITSA et al, 2008; KIM et al.; SCHRAMM et al., 2013; CORREIA JUNIOR et al., 2014).

Para melhor elucidar possíveis alterações no ciclo celular e o tipo de morte celular causada pelos adutos de Heck foi verificado o efeito do composto AH-8 na linhagem K562 considerando os dados de viabilidade celular e o valor da CI_{50} do período de incubação de 24h. Ademais, a linhagem K562 também serviu como modelo experimental adequado por apresentar características de diferentes estágios de maturação da linhagem mieloide, além da sua resistência a ação de quimioterápicos e à indução da apoptose (ASSEF et al., 2005; MARQUES et al., 2010).

Mudanças no controle do ciclo celular podem ter consequências na frequência da qual as células proliferam-se levando a algumas patologias, incluindo o câncer. (KAPLON; DAN; PEEPER, 2015). Para isso, foram realizados ensaios que avaliaram a alteração na distribuição do ciclo celular afetado pelo composto AH-8, demonstrando que o composto aumento a quantidade de DNA em subG1, diferentemente do etoposídeo (100 μ M) que causou retenção do ciclo na fase G1. Comumente, o aumento de subG1 é usado para representar células com seu DNA fragmentado, sendo assim relacionado à apoptose (ALIWAINI et al., 2013). No entanto, o padrão de alteração da distribuição do ciclo celular causado pelos compostos pode se alterar dependendo do tempo de incubação, da concentração utilizada e da linhagem celular exposta a droga (SABATINI et al., 2005; SCHON; HENNESEN; DARTSCH, 2009; YOO et al., 2012).

Outro parâmetro importante a ser avaliado é o estresse oxidativo, pois esse pode ser induzido por compostos, como o AH-8, e como consequência acarretar danos às organelas celulares, ao material genético, reagir com proteínas citosólicas, e em decorrência um distúrbio no funcionamento do metabolismo da célula. Dessa forma, EROs também possuem um papel importante no desencadeamento da morte celular (THANNICKAL; FUNBURG, 2000). Com o uso da sonda molecular que reage com EROs foi possível verificar que o composto AH-8 (100 μ M) induziu a produção de EROs em K562. Mishra et al. (2008) também demonstra quimioterápicos citotóxicos à K562 com mecanismos de morte celular mediados por EROs.

Para investigar mais profundamente o efeito do AH-8 no aumento de subG1 e indução de produção de EROs em K562 a indução de diferentes tipos de morte celular, foi realizado o ensaio de marcação da PS e do DNA através da anexina V e PI, respectivamente. Esse ensaio ajudou a elucidar se K562 estaria entrando em processo de morte celular por apoptose ou necrose (WANG et al., 2004). No entanto, o resultado foi negativo para todas as concentrações durante o tratamento de 24h, mostrando que o composto AH-8 não é capaz de induzir apoptose ou necrose nas concentrações testadas.

Os dados de avaliação da apoptose por externalização da PS e necrose por marcação com PI mostram que não houve indução de apoptose, nem de necrose provocado pelo composto AH-8, sugerindo que outro processo de morte celular possa estar envolvido. Foi então realizada a avaliação da formação de AVOs por meio da marcação por Laranja de Acridina (TRAGANOS; DARZYNKIEWICZ, 1994; KANZAWA et al., 2003). A marcação foi significativa e dependente de concentração, com aumento detectado já a partir de 50 μ M de AH-8. Esse resultado aponta a capacidade do aduto de Heck AH-8 provocar o processo de autofagia em K562. AH-8 foi capaz de induzir a formação de AVOs em níveis similares ao controle positivo etoposídeo (100 μ M), porém em concentração mais baixa (50 μ M).

Uma possível ligação do estresse oxidativo com a autofagia merece atenção, já que a produção de EROs também pode estar relacionado à ativação de proteínas supressora de tumores e na indução de vias de sinalização que provocam a morte celular (JIANG et al., 2015). Duan et al. (2011) demonstraram que a produção de EROs induzida por compostos, podem ativar morte celular por autofagia pela ativação da p53 via p38. Apesar disso, a regulação positiva da p53 por vezes induz autofagia, por outras vezes age como um bloqueador autofágico. Ademais, foi demonstrado que esse processo é dependente de alterações metabólicas e disfunções mitocondriais.

Outros compostos como a silibinina, citreoviridina e a saguinarina, são exemplos de moléculas com atividade anticâncer relatada que demonstraram induzir morte celular por autofagia, inclusive dependente de EROs, sugerindo que o estresse oxidativo pode ser essencial para a ativação desse tipo de morte celular (DUAN, et al., 2011; LIU et al.; 2014; PALLICHANKANDY et al.; JIANG et al., 2015).

Muitos trabalhos também discutem a importância da autofagia no tratamento do câncer. Como citado da literatura científica anteriormente, algumas abordagens induzem a via de morte celular por autofagia, mostrando sua ação como positiva frente ao tratamento do câncer (CHEN; KARANTZA, 2010; RODRIGUEZ-ROCHA, et al.; DUAN et al., 2011; ALIWAINI et al., 2013; LIU et al., 2014; LIN; BAEHRECKEJIANG; PALLICHANKANDY et al., 2015). No entanto, outros estudos demonstram que a autofagia pode aumentar a proliferação das células cancerígenas por atuarem como um agente de reparo aos danos sofridos pelos compostos utilizados e por vezes retardando ou inibindo outros processos de PCD (LEVINE; YUAN, 2005; ABEDIN et al., 2007; MAYCOTTE; THORBURN, 2011; ZHAI et al., 2013; FAN et al., 2015).

Rodriguez-Rocha et al. (2011) discutiram o papel dúbio da autofagia frente a danos no DNA e estresse oxidativo. Foi constatado que, eventualmente, os autofagossomos vão degradar componentes citosólicos, como proteínas e organelas danificadas, favorecendo assim a

sobrevivência celular e conseqüentemente beneficiando a progressão do câncer. Porém, em certas condições ainda não suficientemente entendidas, os danos vão desencadear na célula a morte celular por autofagia. Nesse contexto, os resultados do efeito do AH-8 em K562 demonstram que a indução de autofagia não atuou apenas como um modo de recuperação de danos celular, visto que há na mesma concentração uma redução da viabilidade celular demonstrado pelo ensaio de MTT, bem como o aumento de subG1 e produção de EROs, considerados critérios para indução de morte celular.

Diante dos resultados expostos, pode-se constatar que os adutos de Heck podem apresentar atividades citotóxicas. O composto AH-8 teve o melhor resultado de citotoxicidade com evidência de fragmentação de DNA, produção de EROs e ativação de morte celular por autofagia em K562.

Os dados obtidos no presente trabalho revelam o potencial antileucêmico do composto AH-8, que demonstra ser um candidato à tratamento da leucemia mieloide crônica. Entretanto, é necessário expandir o número de linhagens de câncer testadas além das utilizadas no presente trabalho afim de ampliar o entendimento e o alcance da droga a outras formas de leucemia e/ou câncer. Ensaio pré-clínicos *in vivo* também são imprescindíveis para compreender o funcionamento do AH-8 num sistema multicelular complexo.

CONCLUSÃO

5 CONCLUSÃO

- Os adutos de Heck AH-2, AH-3, AH-7 e AH-8 demonstraram citotoxicidade na linhagem Thp-1;
- O composto AH-8 mostrou-se ser o mais citotóxico dentre os testados, em 24h e 72h, para K562 e HUVEC e também teve a maior seletividade frente a HUVEC;
- O composto AH-8 causou dano significativo ao DNA e aumentou a fração subdiploide subG1 na linhagem K562;
- O composto AH-8 induziu a produção de espécies reativas de oxigênio em K562;
- Não houve detecção de apoptose ou necrose induzido por AH-8 em K562;
- O composto AH-8 provocou morte celular por autofagia na linhagem K562.

REFERÊNCIAS

ABEDIN, M. J. et al. Autophagy delays apoptotic death in breast cancer cells following DNA damage. **Cell Death and Differentiation**, v. 14, p. 500-510, 2006.

ALIWAINI, S. et al. A novel binuclear palladacycle complex inhibits melanoma growth in vitro and in vivo through apoptosis and autophagy **Biochemical Pharmacology**, v. 86, n. 12, p. 1650–1663, 2013.

ANAZETTI, M. C., et al. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL-60) and the human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology**, v. 188, n. 2–3, p. 261–274, 2003.

ASSEF, Y. A. et al. Ionic currents in multidrug resistant K562 human leukemia cells. **Leukemia Research**, v. 29, n. 9, p. 1039–1047, 2005.

AUWERX, J. The human leukemia cell line, THP-1: A multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. **Experientia**, v. 47, p. 22-31, 1991.

BALUNAS, M.; KINGHORN, A. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 431-441, 2005.

BERGMAN, P.; HARRIS, D. Radioresistance, chemoresistance, and apoptosis resistance: the past, present, and future. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 27, n. 1, p. 47–57, 1990.

BORK, P. et al. A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 11, p. 68–76, 1997.

CALABUIG, M. et al. Labdane diterpenes from *Cistus symphytifolius*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 9, p. 2255–2258, 1981.

CORREIA JUNIOR, C. B. et al. Cardiovascular effects of labdenic diterpene isolated from *Moldenhawera nutans* in conscious, spontaneously hypertensive rats. **Pharmaceutical biology**, v. 53, n. 4, p. 582–587, 2015.

COSTA-LOTUFO, L. et al. A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47–58, 2010.

COULIDIATI, T. H. Avaliação dos efeitos anticancerígenos dos 1,2,3-triazóis derivados do núcleo 1,4-naftoquinona em linhagens leucêmicas humanas. **Tese (pós-graduação em Farmacologia)**, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 2014.

COULIDIATI, T. H. et al. Distinct effects of novel naphthoquinone-based triazole in human leukemia cell lines. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 12, p. 1682–1695, 2015.

CHAN, F. et al. Programmed necrosis in the cross talk of cell death and inflammation. **Annual Review of Immunology**, v. 33, n. 1, p. 79–106, 2015.

CHEN, N.; KARANTZA, V. Autophagy as a therapeutic target in cancer. **Cancer Biology & Therapy**, v. 11, n. 2, p. 157–168, 2011.

CHO, Y. Perspectives on the therapeutic modulation of an alternative cell death, programmed necrosis (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 33, n. 6, p. 1401-1406, 2014.

DAGENAIS, M.; DOUGLAS, T.; SALEH, M. Role of programmed necrosis and cell death in intestinal inflammation. **Current opinion in gastroenterology**, v. 30, n. 6, p. 566–75, 2014.

DANTAS, B. B. Avaliação do efeito anticâncer de compostos sintéticos derivados do núcleo tetraidropirano. **Dissertação (pós-graduação em Farmacologia)**, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 2014.

DANTAS, B. B. et al. Effects of curine in HL-60 leukemia cells: cell cycle arrest and apoptosis induction. **Journal of Natural Medicines**, v. 69, n. 2, p. 218–223, 2015.

DAVID, J. P. et al. A bis-labdenic diterpene from *Moldenhawera nutans*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 443-447, 1998.

DOORN, W. V.; PAPINI, A. Ultrastructure of autophagy in plant cells: A review. **Autophagy**, v. 9, n. 12, p. 1922-36, 2013.

DUAN, W. et al. Silibinin activated ROS-p38-NF- κ B positive feedback and induced autophagic death in human fibrosarcoma HT1080 cells. **Journal of Asian natural products research**, v. 13, n. 1, p. 27–35, 2011.

EISENBRAND, G. et al. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 2–3, p. 193–236, 2002.

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

ERDLLENBRUCH, B. et al. Chemotherapeutic errors in oncology. **Medical and Pediatric Oncology**, v. 38, n. 5, p. 353–356, 2002.

ESTELLER, M. Epigenetics in cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, p. 1148–59, 2008.

FAHEINA-MARTINS, G. V. Avaliação do potencial citotóxico das lectinas de *Canavalia ensiformis*, *Canavalia brasiliensis* e *Cratylia floribunda*. **Dissertação (pós-graduação em Farmacologia)**, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 2009.

FERNANDEZ, M. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of sodium percarbonate: a comparison with bleaching agents commonly used in discoloured pulpless teeth. **International Endodontic Journal**, v. 43, n. 2, p. 102–108, 2010.

FYHR, A.; AKSELSON, R. Characteristics of medication errors with parenteral cytotoxic drugs. **European Journal of Cancer Care**, v. 21, n. 5, p. 606–613, 2012.

GREEN, D. R.; LLAMBI, F. Cell Death Signaling. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2015.

HA, J.; KIM, J. et al. Novel pharmacological modulator of autophagy: an updated patent review (2012-2015). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 26, n. 11, p. 1273–1289, 2016.

HALE, A. et al. Autophagy: Regulation and role in development. **Autophagy**, v. 9, n. 7, p. 951–972, 2013.

HE, L. et al. A cancer-targeted nanosystem for delivery of gold(III) complexes: enhanced selectivity and apoptosis-inducing efficacy of a gold(III) porphyrin complex. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 53, n. 46, p. 12532–12536, 2014.

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

IGNEY, F.; KRAMMER, P. Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 4, p. 277–288, 2002.

JACOBSON, M. Reactive oxygen species and programmed cell death. **Trends Biochem.Sci.**, v. 21, n. 3, p. 83–86, 1996.

JIANG, K. et al. Silibinin, a natural flavonoid, induces autophagy via ROS-dependent mitochondrial dysfunction and loss of ATP involving BNIP3 in human MCF7 breast cancer cells. **Oncology Reports**, v. 33, n. 6, p. 2711–2718, 2015.

JOHNSTONE, R. et al. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy defects in apoptosis underpin both tumorigenesis and chemotherapy. **Cell Press**, v. 108, p. 153-164, 2002.

KANZAWA, T. et al. Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide. **Cancer Research**, v. 63, n. 9, p. 2103–2108, 2003.

KAPLON, J.; DAM, L. V.; PEEPER, D. Two-way communication between the metabolic and cell cycle machineries: the molecular basis. **Cell Cycle**, v.14, n. 13, p. 2022-32, 2015.

KIM, T. H. et al. A new labdane diterpenoid with anti-inflammatory activity from *Thuja orientalis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, n. 3, p. 760–767, 2013.

KOUKOULITSA, C. et al. Comparative docking studies of labdane-type diterpenes with forskolin at the active site of adenylyl cyclase. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 17, p. 8237–8243, 2008.

KRAJEWSKI, S. et al. Bcl-2 Family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 60, p. 23-32, 1996.

KUBO, E. et al. TAT-mediated PRDX6 protein transduction protects against eye lens epithelial cell death and delays lens opacity. **AJP: Cell Physiology**, v. 294, n. 3, p. 842–855, 2008.

LAHLOU, S. et al. Mechanism underlying the cardiovascular effects of a labdenic diterpene isolated from *Moldenhawera nutans* in normotensive rats. **Vascular Pharmacology**, v. 46, n. 1, p. 60–66, 2007.

LEE, K. Novel antitumor agents from higher plants. **The Analyst**, v. 141, n. 3, p. 847–852, 2016.

LETAI, A. Cell Death and Cancer Therapy: Don't Forget to Kill the Cancer Cell. **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 22, p. 5015-20, 2015.

LEVINE, B.; YUAN, J. Autophagy in cell death: An innocent convict? **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 10, p. 2679-88, 2005.

LI, N. et al. Synergistic inhibitory effects of deferasitox in combination with decitabine on leukemia cell lines SKM-1, THP-1, and K562. **Oncotarget**, 2017.

LIN, L. BAEHRECKE, E. Autophagy, cell death, and cancer. **Molecular & Cellular Oncology**, v. 2, n. 3, 2015.

LIU, T.; BROUHA, B.; GROSSMAN, D. Rapid induction of mitochondrial events and caspase-independent apoptosis in Survivin-targeted melanoma cells. **Oncogene**, v. 23, n. 1, p. 39–48, 2004.

LIU, Y. et al. Citreoviridin induces ROS-dependent autophagic cell death in human liver HepG2 cells. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxicology**, v. 95, p. 30–37, 2015.

LIU, Y. et al. Mechanism of cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **Journal of Neurochemistry**, v. 69, n. 2, p. 581–593, 2002.

MARQUES, D. Relationships between multidrug resistance (MDR) and stem cell markers in human chronic myeloid leukemia cell lines. **Leukemia Research**, v. 34, n. 6, p. 757–762, 2010.

MARTIN, S. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. **Journal of Experimental Medicine**, v. 182, n. 5, p. 1545–1556, 1995.

MASSEY, A.; ZHANG, C.; CUERVO, A. Chaperone-mediated autophagy in aging and disease. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 73, n. 5, p. 205-235, 2006.

MAYCOTTE, P.; THORBURN, A. Autophagy and cancer therapy. **Cancer Biology and Therapy**, v. 11, n. 2, p. 127-37, 2011.

MENAKER, R.; CEPONIS, P.; JONES, N. Helicobacter pylori induces apoptosis of macrophages in association with alterations in the mitochondrial pathway helicobacter pylori induces apoptosis of macrophages in association with alterations in the mitochondrial pathway. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 5, p. 2889–2898, 2004.

MISHRA, M. et al. Aqueous extract of Rhodiola imbricata rhizome inhibits proliferation of an erythroleukemic cell line K-562 by inducing apoptosis and cell cycle arrest at G2/M phase. **Immunobiology**, v. 213, n. 2, p. 125–131, 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MUNOZ-GÁMEZ, J. A. et al. PARP-1 is involved in autophagy induced by DNA damage. **Autophagy**, v. 5, n. 1, p. 61-74, 2009.

NUNEZ, R. DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 3, n. 3, p. 67–70, 2001.

OOI, H.; MA, L. Modeling heterogeneous responsiveness of intrinsic apoptosis pathway. **BMC Systems Biology**, v. 7, n. 1, p. 65, 2013.

ORTHOLAND, J. GANESAN, A. Natural products and combinatorial chemistry: Back to the future. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 8, n. 3, p. 271-80, 2004.

PALLICHANKANDY, S. et al. ROS-dependent activation of autophagy is a critical mechanism for the induction of anti-glioma effect of sanguinarine. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 89, p. 708–720, 2015.

QUEIROZ, P. L.; LEWIS, G. P.; ALLKIN, R. A revision of the genus Moldenhawera Schrad. (Leguminosae-Ceasalpinioideae). **Kew Bulletin**, v. 54, n. 4, p. 817-852, 1999.

REFERENCIAS

RODRIGUEZ-ROCHA, H. et al. DNA damage and autophagy. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 711 n. 1-2, p. 158-166, 2011.

ROGERO, S. et al. Cytotoxicity due to corrosion of ear piercing studs. **Toxicology in Vitro**, v. 14, n. 6, p. 497–504, 2000.

ROGERO, S. et al. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317–320, 2003.

ROSE-INMAN, H.; KUEHL, D. Acute leukemia. **Emergency Medicine Clinics of North**, v. 32, n. 3, p. 579-96, 2014.

SABATINI, N. et al. JNK/p53 mediated cell death response in K562 exposed to etoposide-ionizing radiation combined treatment. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 95, p. 611-619, 2005.

SAELENS, X. et al. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. **Oncogene**, v. 23, n. 16, p. 2861–2874, 2004.

SAKATA, D.; YAO, C.; NARUMIYA, S. Prostaglandin E2, an immunoactivator. **Journal of pharmacological sciences**, v. 112, n. 1, p. 1–5, 2010.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. et al. Gastroprotective effect of the Mapuche crude drug *Araucaria araucana* resin and its main constituents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, n. 1–3, p. 271–276, 2005.

SCHMIDT, C.; PRZYBYLSKI, G. What can we learn from leukemia as for the process of lineage commitment in hematopoiesis? **International reviews of immunology**, v. 20, n. 1, p. 107–115, 2001.

SCHONN, I.; HENNESEN, J.; DARTSCH, D. C. Cellular responses to etoposide: cell death despite cell cycle arrest and repair of DNA damage. **Apoptosis**, v. 15, p. 162-172, 2009.

SCHRAMM, A. Phytochemical profiling of *Curcuma kwangsiensis* rhizome extract, and identification of labdane diterpenoids as positive GABAA receptor modulators. **Phytochemistry**, v. 96, p. 318–329, 2013.

SENTHILKUMAR, R. et al. Anticancer and multidrug-resistance reversing potential of traditional medicinal plants and their bioactive compounds in leukemia cell lines. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 12, n. 12, p. 0881–0894, 2014.

SILVA JUNIOR, E. A. Preparação de aril derivados hemissintéticos do ácido labd-8(17)-em-15-óico empregando a reação de Heck-Matsuda. **Dissertação (pós-graduação em Química)**, Universidade Federal da Paraíba, 2015.

SILVA, D. et al. Spectaline, cassine and semi-synthetic analogues as potential candidate drugs for the treatment of Alzheimer disease. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, 2010.

SNODIN, D. An EU perspective on the use of in vitro methods in regulatory pharmaceutical toxicology. **Toxicology Letters**, v. 127, n. 1-3, p. 161-168, 2002

STELLER, H. Mechanism and genes of cellular suicide. **Science**, v. 267, n. 5203, p. 1445–1449, 1995.

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current protocols in immunology**, v. 111, 2015.

THOMÉ, M. P. Nova abordagem para análise de autofagia com o marcador laranja de acridina. **Trabalho de conclusão de curso de Biomedicina**, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

VALE, A. E. et al. A new flavonol glycoside derivate from leaves of *Moldenhawera nutans*. **Z Naturforsch**, v. 60, p. 45-49, 2005

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

VISNJIC, D. et al. Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. **Blood**, v. 103, n. 9, p. 3258–3264, 2004.

WANG, Y. An alternative form of paraptosis-like cell death, triggered by TAJ/TROY and enhanced by PDCD5 overexpression. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 8, p. 1525–1532, 2004.

WIMAN, K.; ZHIVOTOVSKY, B. Understanding cell cycle and cell death regulation provides novel weapons against human diseases. **Journal of Internal Medicine**, V. 281, N. 5, P. 483-95, 2017.

YANG, Z. et al. Autophagy modulation for cancer therapy. **Cancer Biology and Therapy**, v. 11, n. 2, p. 169-76, 2011.

YOO, S. H. et al. Etoposide induces a mixed type of programmed cell death and overcomes the resistance conferred by Bcl-2 in Hep3B hepatoma cells. **International Journal of Oncology**, v. 41, p. 1443-1454, 2012.

YU, X.; CHEN, J. DNA damage-induced cell cycle checkpoint control requires CtIP, a phosphorylation-dependent binding partner of BRCA1 c-terminal domains DNA damage-induced cell cycle checkpoint control requires CtIP, a phosphorylation-dependent binding partner of BRCA1. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 21, p. 9478–9486, 2004.

ZUCCO, F. et al. Toxicology investigations with cell culture systems: 20 Years after. **Toxicology in Vitro**, v. 18, n. 2, p. 153-163, 2004.