UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

FRANCISCO WASHINGTON ARAÚJO BARROS

ESTUDO DO POTENCIAL ANTICÂNCER DE NOVOS DERIVADOS ACRIDÍNICOS SINTÉTICOS EM MODELOS EXPERIMENTAIS *IN VITRO*

FORTALEZA
2010

FRANCISCO WASHINGTON ARAÚJO BARROS

ESTUDO DO POTENCIAL ANTICÂNCER DE NOVOS DERIVADOS ACRIDÍNICOS SINTÉTICOS EM MODELOS EXPERIMENTAIS *IN VITRO*

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profª. Drª. Claudia do Ó Pessoa

FORTALEZA
2010

B277e Barros, Francisco Washington Araújo

Estudo do potencial anticâncer de novos derivados acridínicos sintéticos em modelos experimentais *in vitro* / Francisco Washington Araújo Barros. – Fortaleza, 2010.

139 f. : il.

Orientador: Profa. Dra. Claudia do Ó Pessoa

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza-Ce, 2010

1.Acridinas 2. Ensaios de Seleção de Medicamentos Antitumorais 3. DNA Topoisomerases Tipo I 4. Dano ao DNA 5. Apoptose I. Pessoa, Claudia do Ó (orient.) II. Título

CDD: 615.31

FRANCISCO WASHINGTON ARAÚJO BARROS

ESTUDO DO POTENCIAL ANTICÂNCER DE NOVOS DERIVADOS ACRIDÍNICOS SINTÉTICOS EM MODELOS EXPERIMENTAIS *IN VITRO*

Dissertação submetida à coordenação do programa de Pós-graduação em Farmacologia como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Farmacologia outorgado pela Universidade Federal do Ceará.

Aprovada em: 20 / 01 / 2010

BANCA EXAMINADORA

_____

Profa. Dra. Claudia do Ó Pessoa (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará

_____

Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta
Universidade Federal de Pernambuco

_____

Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior
Universidade Federal do Ceará

A Deus e a meus pais,
pela oportunidade de viver.

AGRADECIMENTOS

À professora **Cláudia Pessoa** que apostou no meu sucesso acadêmico e contribuiu com palavras e atitudes na realização deste trabalho. Sua forma valente de encarar as dificuldades da vida, bem como, sua perseverança para alcançar um sonho não serão esquecidas por mim;

À Drª. **Letícia Veras Costa-Lotufo**, por mostrar que é possível ser ótima mãe, ótimo cônjuge e brilhante pesquisadora simultaneamente;

À Drª. **Raquel Carvalho Montenegro**, a quem muito devo a minha primeira publicação científica. Parece bobagem, mas isso significou muito para mim;

Ao Dr. **Manoel Odorico de Moraes***,* por ter sido um dos pioneiros na pesquisa oncológica experimental na Universidade Federal do Ceará. Não apenas pioneiro, pois o CPDM é a prova de que ele vai continuar na ativa por muito mais tempo;

Ao Prof. Dr. **Ivan da Rocha Pitta**, por ter sintetizado e cedido para estudo as moléculas que foram objeto de análise do presente trabalho;

Aos professores **Hélio Nobre e Vanesca Frota**, por terem atendido prontamente o convite para fazer parte de minha banca de mestrado;

Aos professores **Jairo Diniz** e **Flávia Santos,** por terem participado do meu exame de qualificação contribuindo com orientações importantes concernentes à didática;

Ao, hoje, Prof. da Universidade Federal do Piauí, residente na cidade de Picos, **Paulo Michel**, por ter sido a pessoa que me acolheu no LOE e acompanhou durante toda a minha iniciação científica. Nunca esqueço suas palavras de sabedoria e paciência: “Tu é muito psicótico, nãh”;

Ao quase doutor **Bruno Coêlho Cavalcanti**, pelos inúmeros conselhos científicos e exemplo de dedicação à pesquisa. Nunca vi um cara pra publicar tanto. Só vendo!

Ao Prof. Dr. **Daniel Bezerra**, pelo pouco falar e muito fazer, o qual foi fundamental na realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. **Hemerson Iury**, a grande autarquia do LOE, ou ainda, o homem nanomolar (só quem tem substância com CI_{50} em nanomolar), pelo apoio em muitos momentos de dificuldade pessoal e acadêmica. Um exemplo de humildade e solidariedade.

Ao Dr. **Diego Veras**, atualmente na Bahia, pelo sempre disponível, paciente, esclarecedor, científico e completo modo de explicar e dirimir qualquer dúvida. Desde o funcionamento básico de uma pipeta automática até o mais profundo entendimento sobre a engenharia da citometria de fluxo. Esse cara sabe das coisas!

Ao casal de mestres do LOE **José Delano** e **Ana Jérsia**, pela troca de experiências científicas nos bastidores da realização deste trabalho. Ah, não posso esquecer. Obrigado por passar o arquivo em *word* da dissertação de vocês. Me ajudou bastante!

Aos Pós-Graduandos do Laboratório de Oncologia Experimental: **Adriana Carvalho, Elthon Gois, Patrícia Marçal, Zé Roberto, Kézia Lacerda, Carla Sombra, Cecília Carvalho, Kristiana Mousinho, Paula Jimenez, Felipe Rocha e Danilo Damasceno (Zé pequeno), pelo agradável convívio e ajuda constante**.

Aos alunos de Iniciação Científica: **Eveline, Paula, Daisy, Igor, Bruno, Vanessa, Venúcia e Rafael**, pela disponibilidade para ajudar nos experimentos e boa convivência no laboratório;

Às secretárias **Sheyla Prado** e **Adelânia Marinho**, pela maneira prestativa e dedicada em ajudar no dia-a-dia do LOE, desde um simples telefonema até conselhos sobre a vida. São as meninas da *Batcaverna.* Ei, depois eu pago as folhas da última impressão, viu?

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia: **Chiquinho (muito stress), Alana, Carlos, Haroldo, Íris e Flávia**. Em especial a **Aura Rhanes** e **Márcia Hermínia** pelo apoio fundamental em questões relacionadas a coordenação do programa de pós-graduação.

Aos técnicos: **Paulo de Castro, Maria de Fátima e Rogéria Montenegro**. Em especial a **Erivanda França** e **Silvana França**, pela ajuda permanente dentro do laboratório e pelos bons momentos de descontração. Quero aproveitar pra perguntar: Silvaninha, tem vaga na curva do MTT?

Aos grandes amigos da Igreja Betesda, **Emerson e Keiliane Melo, Edney e Rozana Melo, Tochinha, Israel, Idelito, Yumika, Daniel, Tom, Fiuza Wagner, Nayana, Vanessa e Titi**, pela forma como cuidam de mim e compartilham o amor de Cristo. Pense numa galera que ama de verdade!

A minha querida e amada esposa **Liliane Barros**, pelo apoio incondicional e amor sincero demonstrados em nosso relacionamento. Conhecer você mudou minha vida pra melhor!

Aos meus familiares por parte da esposa, **Helena e Luís Nepomuceno (sogros), Hélcio e Denise Santos (cunhada), Luís Eduardo (cunhado), Mirelle e Lara Nepomuceno**, pelo aconchego familiar indispensável para qualquer pessoa;

A minha querida mãe, **Maria da Conceição**, por me amar com toda sua força e enfrentar muitas dificuldades para que eu pudesse ser uma pessoa feliz e realizada.

Ao meu pai, **José Luís Barros**, que muito trabalhou e contribuiu com minha formação como pessoa e cidadão.

Aos meus irmãos, **Marcos Aurélio, Aleíne, Luciana, Denise, Camila e André**, com os quais cresci e me desenvolvi. Em especial a **Jonas Clei** que de forma sutil e substancial plantou em mim o desejo de estudar e seguir a carreira acadêmica.

A todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para a minha formação pessoal e acadêmica ou para a execução deste trabalho.

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições:

Banco do Nordeste do Brasil - BNB

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP

Fundação Cearense de Amparo a Pesquisa - FUNCAP

Instituto Claude Bernard - InCb

RESUMO

Estudo do potencial anticâncer de novos derivados acridínicos sintéticos em modelos experimentais *in vitro*. Dissertação de Mestrado. Autor: Francisco Washington Araújo Barros. Orientador: Drª. Claudia do Ó Pessoa. Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 2010.

Acridinas são moléculas policíclicas aromáticas planares que possuem a capacidade de intercalar no DNA nuclear. Muitos dos seus representantes apresentam propriedades antibacterianas, antiparasitárias e antitumorais. O presente estudo avaliou o potencial citotóxico de 22 novos compostos acridínicos em linhagens de células tumorais humanas. Dentre esses, quatro compostos [5-(acridin-9-il-metileno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona, AC4; 5-(acridin-9-il-metileno)-3-(4-bromo-benzil)-tiazolidina-2,4-diona, AC7; 5-(acridin-9-il-metileno)-3-(4-cloro-benzil)-tiazolidina-2,4-diona, AC10; e 5-(acridin-9-il-metileno)-3-(4-flúor-benzil)-tiazolidina-2,4-diona, AC23] foram ativos, especialmente em HCT-8 (cólon) e SF-296 (glioblastoma), com valores de CI_{50} variando de 2,3 a 5,3 µg/mL. Os compostos apresentaram seletividade para células tumorais, desde que não inibiram (IC_{50} > 25 µg/mL) a proliferação de células monocucleares de sangue periférico humano (CMSPH), bem como, não foram capazes de induzir dano ao DNA dessas células. Nenhum dos compostos mostrou atividade hemolítica contra eritrócitos de camundongos (EC_{50} > 200 µg/mL), o que sugere uma citotoxicidade por mecanismos mais específicos. A fim de determinar o mecanismo envolvido na citotoxicidade seletiva dos compostos, foi realizada uma seqüência de experimentos *in vitro*, usando a linhagem HCT-8 como modelo. As células foram tratadas em diferentes concentrações dos compostos (2,5; 5 e 10 µg/mL) por 12 e 24 horas. Todos os compostos foram capazes de reduzir a viabilidade (teste do azul de tripan) e a proliferação (ensaio do BrdU) de células HCT-8 após o tratamento. A indução de apoptose pelos derivados acridínicos foi determinada por citometria de fluxo (integridade da membrana, fragmentação do DNA internucleosomal e potencial transmembrânico) e por análise morfológica das alterações celulares (brometo de etídeo/laranja de acridina e hematoxilina/eosina). A análise por citometria de fluxo revelou que os compostos avaliados promoveram despolarização mitocondrial, o qual evidencia a ativação da apoptose pela via intrínseca nas células HCT-8. Na análise do *screening* em 3 diferentes linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, foi observado que a linhagem Top1Δ (sem topoisomerase I) mostrou moderada resistência aos compostos acridínicos testados na concentração de 50 µg/mL. Além disso, as acridinas inibiram parcialmente o relaxamento do DNA por topoisomerase I, sugerindo que os compostos AC4, AC7, AC10, AC23 tem o potencial antiproliferativo, em parte, relacionado a inibição da atividade catalítica desta enzima. Esses dados apontam o potencial anticâncer dos compostos testados.

Palavras-chave: Compostos Acridínicos. Citotoxicidade. Inibidor de Topoisomerase I. Dano ao DNA. Apoptose.

ABSTRACT

Study of the potential of new anticancer synthetic acridine derivatives in experimental models in vitro.
Dissertation. Author: Francisco Araujo Barros Washington. Advisor: Dr. Claudia do O Pessoa. Post-graduate in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, 2010.

Acridines are planar aromatic polycyclic molecules that have the ability to progress in nuclear DNA. Many of its representatives have antibacterial, antiparasitic and antitumor. This study evaluated the cytotoxic potential of 22 new acridine compounds in strains of human tumor cells. Among these, four compounds [5-(acridin-9-yl-methilene)-3-(4-methyl-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione, AC4; 5-(acridin-9-yl-methilene)-3-(4-bromine-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione, AC7; 5-(acridin-9-yl-methilene)-3-(4-chloro-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione, AC10; and 5-(acridin-9-yl-methilene)-3-(4-fluor-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione, AC23] were active, especially in HCT-8 (colon) and SF-296 (glioblastoma), with IC50 values ranging from 2.3 to 5.3 mg / mL. The compounds were selective for tumor cells, provided they do not inhibit (IC_{50} > 25 µg/mL) cell proliferation monocucleares human peripheral blood (CMSPH) and were not able to induce DNA damage to these cells. None of the compounds showed hemolytic activity against erythrocytes of mice (EC_{50} > 200 µg/mL), suggesting a cytotoxicity by more specific mechanisms. In order to determine the mechanism involved in the selective cytotoxicity of compounds was carried out a sequence of in vitro experiments, using the line HCT-8 as a model. The cells were treated in different concentrations of compounds (2.5, 5 and 10 µg/mL) for 12 and 24 hours. All compounds were able to reduce the viability test (trypan blue) and proliferation (BrdU assay) of HCT-8 cells after treatment. Induction of apoptosis by acridine derivatives was determined by flow cytometry (membrane integrity, DNA fragmentation and internucleosomal transmembrane potential) and morphological analysis of cellular changes (ethidium bromide/acridine orange, and hematoxylin-eosin). The analysis by flow cytometry showed that the compounds evaluated promoted mitochondrial depolarization, which shows the activation of apoptosis by intrinsic pathway in HCT-8 cells. In the analysis of screening in 3 different mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae*, it was observed that the line Top1Δ (without topoisomerase I) showed resistance to acridine compounds tested at a concentration of 50 µg/mL. In addition, the acridines partially inhibited the relaxation of DNA by topoisomerase I, suggesting that the compounds AC4, AC7, AC10, AC23 has the potential antiproliferative partly related to inhibition of catalytic activity of this enzyme. These data indicate the potential anticancer compounds tested.

Keywords: Acridine Compounds. Cytotoxicity. Topoisomerase I inhibitor. DNA Damage. Apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

1. Os marcos do câncer..... 22
2. Estimativa para 2010 dos tipos de câncer mais incidentes na população brasileira, sem pele não melanoma..... 24
3. Morte celular por apoptose..... 28
4. Esquema das vias intrínseca e extrínseca da apoptose..... 30
5. Ilustração comparativa entre apoptose e necrose..... 30
6. Núcleo fundamental característico da classe acridina..... 33
7. Modelo de intercalação de derivado acridínico (bolas verdes) no DNA. 33
8. Agentes intercalantes de DNA usados na clínica..... 34
9. Estrutura química de DACA..... 35
10. Estrutura dos novos compostos acridínicos..... 43
11. Esquema ilustrativo do teste em gotas..... 60
12. Padrão de dano ao DNA para o ensaio cometa..... 63
13. Efeitos dos compostos acridínicos (AC4-A, AC7-B, AC10-C e AC23-D) sobre a proliferação celular de células HCT-8 determinado pelo teste do azul de tripan após 12 horas de incubação..... 70
14. Efeitos dos compostos acridínicos (AC4-A, AC7-B, AC10-C e AC23-D) sobre a proliferação celular de células HCT-8 determinado pelo teste do azul de tripan após 24 horas de incubação..... 71
15. Efeitos dos compostos acridínicos (AC4-A, AC7-B, AC10-C e AC23-D) sobre a proliferação celular de células HCT-8 determinado por citometria de fluxo após 12 horas de incubação..... 72
16. Efeitos dos compostos acridínicos (AC4-A, AC7-B, AC10-C e AC23-D) sobre a proliferação celular de células HCT-8 determinado por citometria de fluxo após 24 horas de incubação..... 73
17. Efeitos dos compostos acridínicos (AC4-A, AC7-B, AC10-C e AC23-D) sobre a síntese de DNA HCT-8 determinado pelo ensaio do BrdU após 24 horas de incubação..... 75

18. Efeito do composto acridínico AC4 (2,5 µg/mL, D - 5 µg/mL, E -10 µg/mL, F) sobre a morfologia de células HCT-8 determinada por coloração com hematoxilina/eosina, após 12 horas de incubação..... 78
19. Efeito do composto acridínico AC4 (2,5 µg/mL, D - 5 µg/mL, E -10 µg/mL, F) sobre a morfologia de células HCT-8 determinada por coloração com hematoxilina/eosina, após 24 horas de incubação..... 79
20. Efeito do composto acridínico AC7 (2,5 µg/mL, D - 5 µg/mL, E -10 µg/mL, F) sobre a morfologia de células HCT-8 determinada por coloração com hematoxilina/eosina, após 12 horas de incubação..... 80
21. Efeito do composto acridínico AC7 (2,5 µg/mL, D - 5 µg/mL, E -10 µg/mL, F) sobre a morfologia de células HCT-8 determinada por coloração com hematoxilina/eosina, após 24 horas de incubação..... 81
22. Efeito do composto acridínico AC10 (2,5 µg/mL, D - 5 µg/mL, E -10 µg/mL, F) sobre a morfologia de células HCT-8 determinada por coloração com hematoxilina/eosina, após 12 horas de incubação..... 82
23. Efeito do composto acridínico AC10 (2,5 µg/mL, D - 5 µg/mL, E -10 µg/mL, F) sobre a morfologia de células HCT-8 determinada por coloração com hematoxilina/eosina, após 24 horas de incubação..... 83
24 Efeito do composto acridínico AC23 (2,5 µg/mL, D - 5 µg/mL, E -10 µg/mL, F) sobre a morfologia de células HCT-8 determinada por coloração com hematoxilina/eosina, após 12 horas de incubação..... 84
25 Efeito do composto acridínico AC10 (2,5 µg/mL, D - 5 µg/mL, E -10 µg/mL, F) sobre a morfologia de células HCT-8 determinada por coloração com hematoxilina/eosina, após 24 horas de incubação..... 85
26 Efeito do composto acridínico AC4 sobre a indução de morte celular de células HCT-8 determinado por coloração diferencial com Brometo de Etídeo/Laranja de Acridina, após 12 (A) e 24 (B) horas de incubação..... 86

27 Efeito do composto acridínico AC7 sobre a indução de morte celular de células HCT-8 determinada por coloração diferencial com Brometo de Etídeo/Laranja de Acridina, após 12 (A) e 24 (B) horas de incubação..... 87
28 Efeito do composto acridínico AC10 sobre a indução de morte celular de células HCT-8 determinada por coloração diferencial com Brometo de Etídeo/Laranja de Acridina, após 12 (A) e 24 (B) horas de incubação..... 88
29 Efeito do composto acridínico AC23 sobre a indução de morte celular de células HCT-8 determinada por coloração diferencial com Brometo de Etídeo/Laranja de Acridina, após 12 (A) e 24 (B) horas de incubação..... 89
30 Efeito dos compostos acridínicos (AC4-A, AC7-B, AC10-C e AC23-D) sobre a integridade da membrana citoplasmática de células HCT-8 determinado por citometria de fluxo, após 12 horas de incubação..... 90
31 Efeito dos compostos acridínicos (AC4-A, AC7-B, AC10-C e AC23-D) sobre a integridade da membrana citoplasmática de células HCT-8 determinado por citometria de fluxo, após 24 horas de incubação..... 91
32 Efeito do composto acridínico AC4 (2,5 µg/mL, D - 5 µg/mL, E -10 µg/mL, F) sobre a morfologia de células HCT-8 determinada por citometria de fluxo, após 12 horas de incubação..... 92
33 Efeito do composto acridínico AC4 (2,5 µg/mL, D - 5 µg/mL, E -10 µg/mL, F) sobre a morfologia de células HCT-8 determinada por citometria de fluxo, após 24 horas de incubação..... 93
34 Efeito do composto acridínico AC7 (2,5 µg/mL, D - 5 µg/mL, E -10 µg/mL, F) sobre a morfologia de células HCT-8 determinada por citometria de fluxo, após 12 horas de incubação..... 94
35 Efeito do composto acridínico AC7 (2,5 µg/mL, D - 5 µg/mL, E -10 µg/mL, F) sobre a morfologia de células HCT-8 determinada por citometria de fluxo, após 24 horas de incubação..... 95
36 Efeito do composto acridínico AC10 (2,5 µg/mL, D - 5 µg/mL, E -10 µg/mL, F) sobre a morfologia de células HCT-8 determinada por citometria de fluxo, após 12 horas de incubação..... 96

37 Efeito do composto acridínico AC10 (2,5 µg/mL, D - 5 µg/mL, E -10 µg/mL, F) sobre a morfologia de células HCT-8 determinada por citometria de fluxo, após 24 horas de incubação..... 97
38 Efeito do composto acridínico AC23 (2,5 µg/mL, D - 5 µg/mL, E -10 µg/mL, F) sobre a morfologia de células HCT-8 determinada por citometria de fluxo, após 12 horas de incubação..... 98
39 Efeito do composto acridínico AC23 (2,5 µg/mL, D - 5 µg/mL, E -10 µg/mL, F) sobre a morfologia de células HCT-8 determinada por citometria de fluxo, após 24 horas de incubação..... 99
40 Efeito dos compostos acridínicos (AC4-A, AC7-B, AC10-C e AC23-D) sobre o potencial transmembrânico mitocondrial células HCT-8 determinado por citometria de fluxo usando rodamina 123, após 12 horas de incubação..... 101
41 Efeito dos compostos acridínicos (AC4-A, AC7-B, AC10-C e AC23-D) sobre o potencial transmembrânico mitocondrial células HCT-8 determinado por citometria de fluxo usando rodamina 123, após 24 horas de incubação..... 102
42 Efeito dos compostos acridínicos (AC4, AC7, AC10 e AC23) sobre o crescimento celular de linhagem selvagem de levedura *Saccharomyces serevisiae* (BY-4741-WT) determinado pelo teste em gotas, após 24 horas de incubação..... 109
43 Efeito dos compostos acridínicos (AC4, AC7, AC10 e AC23) sobre o crescimento celular de linhagem mutante Top1Δ (sem topoisomerase I) de levedura *Saccharomyces serevisiae* (BY-4741-WT) determinado pelo teste em gotas, após 24 horas de incubação..... 110
44 Efeito dos compostos acridínicos (AC4, AC7, AC10 e AC23) sobre o crescimento celular de linhagem mutante Top3Δ (sem topoisomerase III) de levedura *Saccharomyces serevisiae* determinado pelo teste em gotas, após 24 horas de incubação..... 111
45 Efeito dos compostos acridínicos (AC4, AC7, AC10 e AC23) sobre o crescimento celular de linhagem mutante Top1/3Δ (sem topoisomerase I e III) de levedura *Saccharomyces serevisiae* determinado pelo teste em gotas, após 24 horas de incubação..... 112

46 Efeito dos compostos acridínicos (AC4, AC7, AC10 e AC23) sobre o relaxamento de DNA plasmidial superhelicoidizado (pRYG), por eletroforese horizontal em gel de agarose 1 %..... 114

LISTA DE TABELAS

1 Características dos diferentes tipos de morte celular..... 27

2 Linhagens tumorais humanas utilizadas nos ensaios de citotoxicidade *in vitro* por meio do teste do MTT..... 46

3 Linhagens celulares de levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas no teste em gotas..... 47

4 Atividade citotóxica dos compostos acridínicos em 3 linhagens tumorais humanas (SF-295, glioblastoma; HCT-8, cólon; MDAMB-435, melanoma) pelo teste do MTT em concentração única de 25 µg/mL, após 72 horas de incubação..... 66

5 Atividade citotóxica dos compostos acridínicos (AC4, AC7, AC10 e AC23) em linhagens tumorais humanas e em células saudáveis pelo teste do MTT e do alamar blue, após 72 horas de incubação..... 67

6 Efeito do composto acridínico AC4 sobre o conteúdo de DNA nuclear de células HCT-8 determinado por citometria de fluxo usando iodeto de propídeo, após 12 e 24 horas de incubação..... 104

7 Efeito do composto acridínico AC7 sobre o conteúdo de DNA nuclear de células HCT-8 determinado por citometria de fluxo usando iodeto de propídeo, após 12 e 24 horas de incubação..... 105

8 Efeito do composto acridínico AC10 sobre o conteúdo de DNA nuclear de células HCT-8 determinado por citometria de fluxo usando iodeto de propídeo, após 12 e 24 horas de incubação..... 106

9 Efeito do composto acridínico AC23 sobre o conteúdo de DNA nuclear de células HCT-8 determinado por citometria de fluxo usando iodeto de propídeo, após 12 e 24 horas de incubação..... 107

10 Avaliação do potencial genotóxico dos compostos acridínicos (AC4, AC7, AC10 e AC23) em CMSPH (células mononucleares de sangue periférico humano) pelo ensaio cometa, após 3 horas de incubação..... 115

11 Resumo dos resultados dos compostos acridínicos (AC4, AC7, AC10 e AC23) em modelos experimentais *in vitro*..... 128

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Analisys of Variance (Análise de variância)
BrdU	Bromodeoxiuridina
BE/LA	Brometo de Etídio/Laranja de Acridina
CMSPH	Células Mononucleares de Sangue Periférico Humano
DAB	Diaminobenzidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
E.P.M.	Erro Padrão da Média
EROs	Espécies reativas de Oxigênio
FADD	Domínio de morte associado ao Faz
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium
PBS	Phosphate Buffer Solution (Tampão Fosfato)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
U	Unidade
UV	Ultra-Violeta
YEL	1 % de extrato de levedura, 2 % de peptona e 2 % de glicose

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	21
1.1	Câncer	21
1.1.1	Considerações gerais	21
1.1.2	Epidemiologia do câncer	23
1.1.3	Tratamento do câncer	25
1.2	**Tipos de morte celular**	26
1.3	**Estratégias em busca de novas moléculas anticâncer**	31
1.4	**Classe acridina**	32
2	**OBJETIVOS**	36
2.1	**Objetivo geral**	36
2.2	**Objetivos específicos**	36
3	**MATERIAL E MÉTODOS**	37
3.1	**Material**	37
3.2	**Métodos**	43
3.2.1	Obtenção dos compostos acridínicos	43
3.2.2	Manutenção das células tumorais humanas em cultura	45
3.2.3	Obtenção de células monucleares de sangue periférico humano (CMSPH)	46
3.2.4	Manutenção das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*	47
3.2.5	Ensaio de citotoxicidade em células tumorais humanas - Teste do MTT	48
3.2.6	Ensaio de citotoxicidade em células normais - Teste do Alamar Blue	50
3.2.7	Determinação da atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos Swiss (*Mus musculus)*	51
3.2.8	Estudo do padrão de morte celular e do efeito sobre a progressão do ciclo celular	52
3.2.8.1	Determinação da viabilidade celular - Teste do Azul de Tripan	53
3.2.8.2	Análise morfológica - Coloração com Hematoxilina/Eosina	53
3.2.8.3	Análise morfológica - Coloração diferencial com Brometo de Etídeo/Laranja de Acridina	54

3.2.8.4 Avaliação da síntese de DNA - Ensaio do BrdU..... 55
3.2.8.5 Testes utilizando citometria de fluxo..... 57
3.2.9 Ensaio de sensibilidade de *Sacharomyces cerevisiae* - Teste em Gotas..... 60
3.2.10 Ensaio de relaxamento do DNA..... 61
3.2.11 Avaliação do potencial genotóxico - Ensaio Cometa..... 62
4 RESULTADOS..... 64
4.1 Avaliação da atividade citotóxica e hemolítica dos compostos acridínicos..... 64
4.2 Avaliação da viabilidade de células HCT-8 após tratamento com os compostos acridínicos..... 68
4.3 Avaliação do efeito dos compostos acridínicos sobre a síntese de DNA em células HCT-8..... 74
4.4 Avaliação da morfologia de células HCT-8 após tratamento com os compostos acridínicos..... 76
4.5 Avaliação da despolarização mitocondrial de células HCT-8 após tratamento com os compostos acridínicos..... 100
4.6 Avaliação do efeito dos compostos acridínicos sobre o conteúdo de DNA nuclear de células HCT-8..... 103
4.7 Avaliação do efeito dos compostos acridínicos sobre o crescimento celular de *Sacharomyces cerevisiae*..... 108
4.8 Avaliação do efeito dos compostos acridínicos sobre o relaxamento do DNA..... 113
4.9 Avaliação da genotoxicidade dos compostos acridínicos em CMSPH..... 115
5 DISCUSSÃO..... 116
6 CONCLUSÃO..... 127
REFERÊNCIAS..... 129

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

1.1.1 Considerações gerais

A descrição mais antiga do câncer foi descoberta no Egito e data de aproximadamente 1600 a.C.. O papiro encontrado continha a descrição de 8 casos de tumores ou úlceras de mama que foram tratados por cauterização. A origem da palavra câncer é creditada ao médico grego Hipócrates (460-370 a.C.), considerado o “pai da medicina”. No grego, a palavra escolhida por Hipócrates significa caranguejo e está associada a uma analogia entre o crescimento infiltrante do câncer e a forma como esse crustáceo se prende ao solo usando suas patas. Hipócrates também usou os termos carcinos e carcinoma para descrever tumores não-ulcerosos e ulcerosos, respectivamente (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2009).

Atualmente, o câncer é considerado uma doença complexa caracterizada pela instabilidade genética de células que tem a capacidade de se multiplicar descontroladamente. Segundo Hahn e Weinberg (2002), as alterações genéticas (mutações) envolvem a amplificação e/ou supra-expressão de oncogenes aliada a deleção e/ou silenciamento epigenético de genes supressores de tumor. Neste sentido, é possível dizer que as mutações no câncer promovem a reativação ou a modificação de programas celulares que coordenam processos relacionados a embriogênese e a homeostasia como: proliferação, migração, diferenciação e apoptose (LUO *et al*., 2009).

As células de câncer são diferentes das células saudáveis por apresentarem potencial proliferativo ilimitado, auto-suficiência para os sinais de crescimento e resistência aos sinais antiproliferativos e apoptóticos. Formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), invasão tecidual e capacidade de sofrer metástase são outras propriedades que podem ser acrescentadas (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Recentes trabalhos tem mostrado (**Figura 1**) a adição de outras características que são: fuga do sistema imune (KROEMER; POUYSSEGUR, 2008) e fenótipos de estresse (metabólico, proteotóxico, mitótico, oxidativo e de dano ao DNA) (LUO *et al*., 2009). Com esse perfil, as células cancerosas tornam-se menos especializadas

em suas funções e, aos poucos, substituem as células normais comprometendo o funcionamento dos órgãos e levando, quase sempre, o indivíduo à morte (DE ALMEIDA *et al*., 2005).

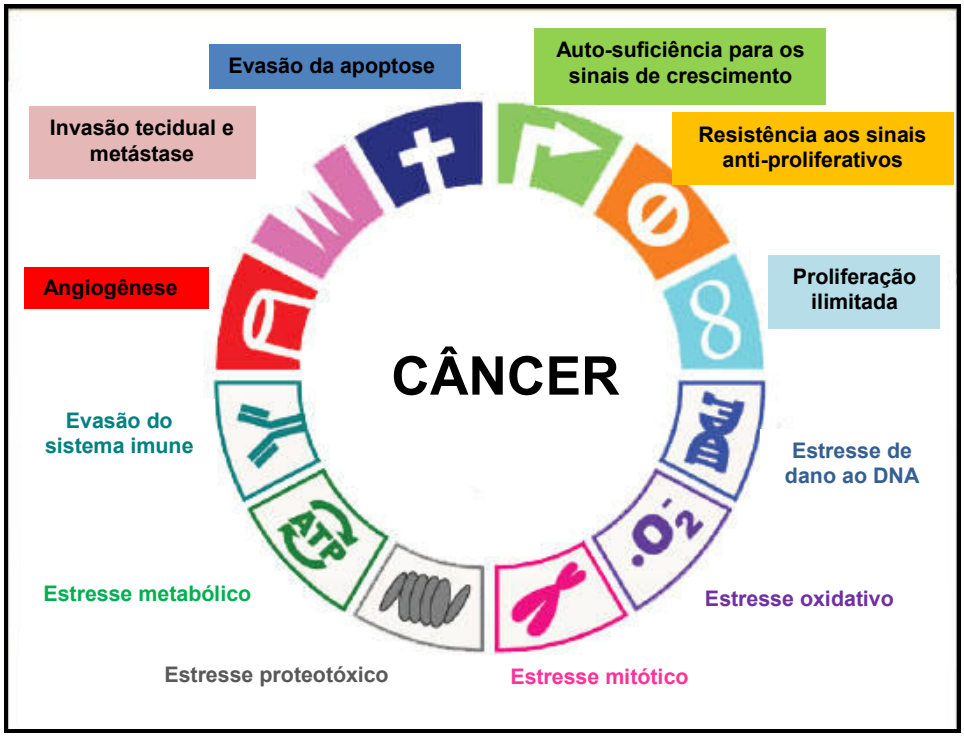


Figura 1 - Os marcos do câncer
Fonte: adaptado de Luo *et al*. (2009)

O acúmulo de mutações observado na célula de câncer é capaz de promover defeitos no ciclo celular por desregulação de quinases dependentes de ciclina (QDC). Normalmente, as QDCs são ativadas por ciclinas e coordenam o processo mitótico durante a divisão de uma célula. A progressão correta do ciclo celular é monitorada por pontos de checagem que detectam possíveis erros durante a síntese de DNA ou segregação cromossômica. No ponto de checagem, QDCs específicas são inibidas e o ciclo celular é parado momentaneamente para que o defeito no DNA, caso exista, seja reparado antes da formação das células-filhas. Quando o erro não pode ser reparado, existem duas opções: ou a célula torna-se senescente, ou sofre morte por apoptose. Em muitos tumores humanos, as QDCs da divisão celular encontram-se continuamente ativadas e, nessa condição, a célula de câncer prolifera indefinidamente e passa adiante suas mutações, bem como, acumula outras aberrações genéticas. Estas evidências demonstram, em parte, a

oncogênese molecular e comprovam a origem monoclonal do câncer (MALUMBRES; BARBACID, 2001; MALUMBRES; BARBACID, 2005; KASTAN; BARTEK, 2004; BARTEK *et al.,* 2004; MALUMBRES; BARBACID, 2009; LUO *et al*., 2009).

A transformação de uma célula saudável em célula cancerosa é, geralmente, um processo lento que ocorre em várias etapas. Este processo, conhecido como carcinogênese, pode ser iniciado espontaneamente, por fatores ambientais ou de forma hereditária. Dentre esses, a exposição a fatores ambientais (produtos químicos, radiação e vírus) é a causa mais comum de câncer, com destaque para a carcinogênese química. A carcinogênese química, que tem na poluição, no tabagismo e na dieta seus principais fatores de risco, pode ser didaticamente dividida em 4 etapas: iniciação, promoção, conversão maligna e progressão. Assim, tomar medidas preventivas individuais e coletivas é uma ótima forma de se evitar os efeitos maléficos do câncer (DOLL; PETO, 1981; REDDY *et al*., 2003; RIEGER, 2004).

1.1.2 Epidemiologia do câncer

Como exposto no tópico anterior, o câncer é uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado de células transformadas levando ao comprometimento do funcionamento dos órgãos.

Hoje, são conhecidos quase 200 tipos de câncer, correspondendo aos vários sistemas e células do corpo, os quais se diferenciam pela velocidade de multiplicação e a capacidade de invadir tecidos e órgãos, próximos ou distantes de onde se originaram (DE ALMEIDA *et al*., 2005).

Neste sentido, a vigilância, bem como a avaliação de seu desempenho, é um dos componentes fundamentais para o planejamento e o monitoramento da efetividade de programas de controle dos diversos tipos de câncer. O estabelecimento de medidas efetivas no controle do câncer necessita de informações de qualidade sobre sua distribuição de incidência e mortalidade, o que possibilita uma melhor compreensão sobre a doença e seus determinantes (INSTITUTO NACIONAL DO CANCER, 2008).

Em 2008, a Organização Mundial da Saúde estimou que ocorreriam 12,4 milhões de casos novos e 7,6 milhões de óbitos por câncer no mundo. Destes, os

mais incidentes foram o câncer de pulmão (1,52 milhões de casos novos), mama (1,29 milhões) e cólon e reto (1,15 milhões). Devido ao mau prognóstico, o câncer de pulmão foi a principal causa de morte (1,31 milhões), seguido pelo câncer de estômago (780 mil óbitos) e pelo câncer de fígado (699 mil óbitos). Para América do Sul, Central e Caribe, estimou-se em 2008 cerca de um milhão de casos novos de câncer e 589 mil óbitos. Em homens, o mais comum foi o câncer de próstata, seguido por pulmão, estômago e cólon e reto. Nas mulheres, o mais frequente foi o câncer de mama, seguido do colo do útero, cólon e reto, estômago e pulmão (WHO, 2008).

No Brasil, as estimativas, para o ano de 2010 (**Figura 2**), válidas para o ano de 2011, apontam para a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer, sendo 236.240 para o sexo masculino e 235.030 para o sexo feminino. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada para a América Latina (INCA, 2010).

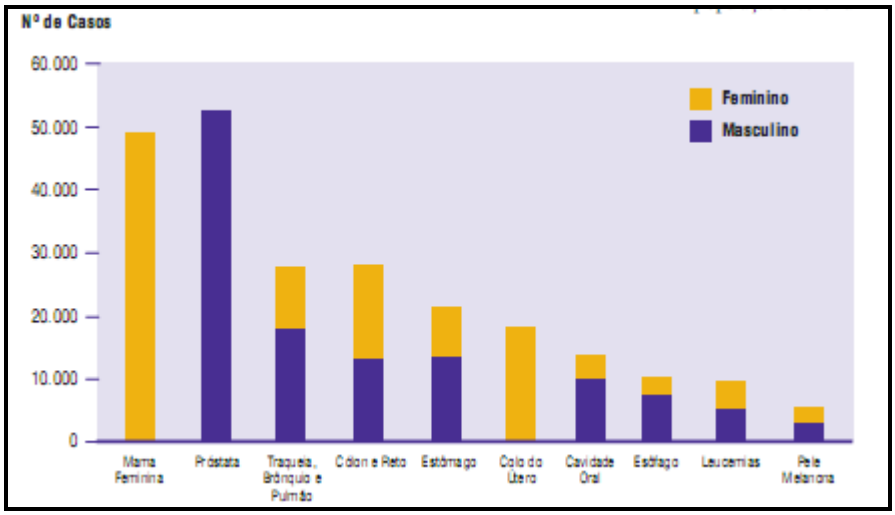


Figura 2 - Estimativa para 2010 dos tipos de câncer mais incidentes na população brasileira, sem pele não melanoma.

A distribuição dos casos novos de câncer segundo sua localização primária é bem heterogênea entre Estados e Capitais do País. As regiões Sul e Sudeste, de maneira geral, apresentam as maiores taxas, enquanto que as regiões Norte e

Nordeste mostram as menores taxas. Já as taxas da região Centro-Oeste apresentam um padrão intermediário (INCA, 2008).

Diante desse cenário, fica clara a necessidade de continuidade em investimentos no desenvolvimento de ações abrangentes para o controle do câncer, nos diferentes níveis de atuação como: na promoção da saúde, na detecção precoce, na assistência aos pacientes, na vigilância, na formação de recursos humanos, na comunicação e mobilização social, na pesquisa e na gestão do Sistema Único de Saúde (SUS).

1.1.3 Tratamento do câncer

A mortalidade em virtude do câncer ainda é inaceitavelmente alta. Apesar do avanço no conhecimento da doença e nas formas de tratamento, as estatísticas de mortalidade demonstram que continua sendo importante buscar novas formas de se controlar esse mal (REDDY *et al*., 2003).

Atualmente, o paciente com câncer é tratado a partir do uso combinado de várias abordagens terapêuticas. A cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia são a base do tratamento para vários tipos de câncer. A quimioterapia, que consiste no uso de medicamentos isolados ou combinados (poliquimioterapia), tem o objetivo de atingir a célula de câncer e interferir no seu desenvolvimento, crescimento, disseminação e/ou invasão tecidual. Neste sentido, a poliquimioterapia destaca-se por apresentar resultados mais eficientes e por diminuir o risco de resistência da célula tumoral ao tratamento. Além disso, o uso combinado de fármacos permite atuar em diferentes fases do ciclo celular (NICOLAOU *et al*., 1997; CARVALHO; TIRNAUER; PELLMAN, 2003; KUMMAR; ABBAS; FAUSTO, 2004; SOUZA *et al*., 2007).

Mais recentemente, têm-se usado a terapia de fotorradiação e a imunoterapia. Contudo, essas técnicas são de uso clínico superficial e adjuvante, respectivamente (DE ALMEIDA *et al.*, 2005).

Segundo Bode e Dong (2009), a prevenção, a detecção precoce e o tratamento constituem a estratégia mais completa para o controle do câncer.

1.2 Tipos de morte celular

Os organismos multicelulares tem na morte celular programada uma importante ferramenta fisiológica para auxiliar nos processos embrionários, pós-embrionários e na homeostasia. Por outro lado, a desregulação desse tipo de morte é responsável pelo surgimento de muitas doenças humanas como: isquemia crônica, neurodegenerativas, auto-imunes e câncer. Assim, o entendimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos na morte celular é bastante útil no desenvolvimento de novas terapias (KROEMER *et al.,* 2007).

A morte celular tem sido objeto de estudo de muitos pesquisadores. De acordo com o Comitê de Nomenclatura sobre Morte Celular (editores da revista *Cell Death and Differentiation*), considera-se que uma célula está morta quando as seguintes condições estão satisfeitas: (a) perda da integridade de membrana plasmática, (b) fragmentação nuclear e celular e (c) fagocitose. O comitê também estabelece que a morte celular pode ocorrer a partir de diferentes vias, como: apoptose, necrose, autofagia, catástrofe mitótica e senescência (KROEMER *et al.,* 2005).

A **tabela 1** mostra um resumo das características morfológicas e bioquímicas envolvidas em cinco categorias de morte celular, e abaixo segue uma descrição mais detalhada de cada processo.

Tabela 1 - Características dos diferentes tipos de morte celular.

	Apoptose	**Necrose**	**Autofagia**	**Catástrofe mitótica**	**Senescência**
Mudanças morfológicas					
Membrana celular	Íntegra; Formação de prolongamentos (Blebbs)	Ruptura	Formação de prolongamentos (Blebbs)	-	↑ Tamanho
Núcleo	Condensação da cromatina; Fragmentação nuclear; Fragmentação internucleossomal do DNA (DNA ladder)	Degradação maciça do DNA	Condensação parcial da cromatina; Sem DNA ladder	Múltiplos micronúcleos; Fragmentação nuclear	Focos heterocromáticos
Citoplasma	Fragmentação (formação de corpos apoptóticos)	Inchaço de organelas	↑ número de vesículas autofágicas	-	Granulosidade
Método de detecção	Marcação com anexina V, ensaio de fragmentação do DNA e ativação de caspase	Permeabilidade precoce a corantes e liberação de conteúdo intracelular	Localização de LC3	Visualização de células multinucleadas	Ativação da β-galactosidase
Liberação de conteúdo celular	Lisofosfatidilcolina	HMGB1, moléculas S100, metabólitos purínicos, proteínas de choque térmico, ácido úrico e HDGF	-	-	-
Resposta imunológica	Supressão; fagocitose por células vizinhas	Estimulação; crescimento celular e reparo tecidual	-	-	-

Abreviações: LC3, proteína associada a microtúbulo (cadeia leve 3); HMGB1, proteína de alta mobilidade grupo box 1; HDGF, fator de crescimento derivado de hepatoma.
Fonte: adaptado de Ricci e Zong (2006).

O termo apoptose foi estabelecido por Kerr e colaboradores em 1972. Desde então, um conjunto de características morfológicas tem sido apresentado para identificar esse padrão de morte celular. Redução do volume (picnose), condensação da cromatina, fragmentação do núcleo (cariorexis), manutenção da integridade das organelas e membrana citoplasmáticas, formação de prolongamentos da membrana plasmática (blebbs) e fragmentação celular (corpos apoptóticos) são as evidências marcantes de uma célula apoptótica (**Figura 3**) (KROEMER *et al.,* 2005).

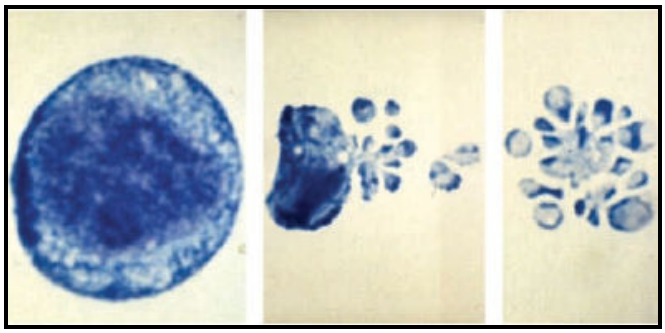


Figura 3 - Morte celular por apoptose
Fonte: Cotter (2009).

Em condições normais, os corpos apoptóticos formados são reconhecidos e fagocitados por macrófagos ou células vizinhas. O reconhecimento é baseado na externalização da fostatidilserina na membrana plasmática ou mediado por carboidratos e receptores de vitronectina. Neste ponto, a apoptose pode ser considerada um importante mecanismo de morte celular induzida por quimioterápico (DUVALL *et al*., 1985; SAVILL *et al*., 1990; FADOK *et al*., 1992; RICCI; ZONG, 2006).

Dos mecanismos conhecidos que conduzem a morte celular por apoptose, dois são bem estabelecidos: a via de sinalização intrínseca ou mitocondrial e a extrínseca (**Figura 4**). Ambos os processos contam com a participação imprescindível de proteases intracelulares conhecidas por caspases. Dentro da célula, as caspases encontram-se em sua forma inativa e precisam ser clivadas para realizar suas funções. Na cascata reacional da apoptose, existem as caspases iniciadores, que ativam outras caspases, e as efetoras, que executam as modificações estruturais observadas nesse padrão de morte celular. As caspases

iniciadoras podem ser do tipo 8, 9 e 10 e as caspases 3, 6 e 7 são consideradas efetoras (NAGATA, 1997; THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998; CORY; ADAMS, 2002; DANIAL; KORSMEYER, 2004; RICCI; ZONG, 2006).

A via intrínseca pode ser ativada por um sinal de estresse intracelular que inclui dano ao DNA (por radiação ionizante ou quimioterápico), espécies reativas de oxigênio (EROs), infecção viral ou ativação de oncogenes. Após o estímulo, os monômeros protéicos Bax e Bak (membros da família Bcl-2) são oligomerizados e ligam-se a membrana externa mitocondrial promovendo a liberação de vários fatores apoptóticos. Dentre eles, o citocromo-c tem a capacidade de ligar-se ao fator ativador de caspase 1 (apaf-1) e ativar a caspase 9 por clivagem. A caspase 9 ativada, por sua vez, promove a clivagem das caspases 3 e 7, tornando-as também ativas, que rapidamente cliva os substratos intracelulares (VERHAGEN *et al.*, 2000; DU *et al.,* 2000; WEI *et al.*, 2001).

A via extrínseca da apoptose é caracterizada pela ligação de agonistas ao domínio extracelular de receptores específicos da membrana plasmática, conhecidos como receptores de morte. Os agonistas envolvidos nesse processo são TNF-α, CD95-L e TRAIL. Quando os receptores de morte são ativados, a sua porção intracelular liga-se ao FADD (proteína que contém o domínio de morte celular associado ao Fas) e promove o recrutamento de caspase 8 e 10, as quais sofrem auto-clivagem e tornam-se ativas. Em células tipo I, essas caspases tem a capacidade de ativar as caspases efetores por si. Entretanto, em células tipo II, a ativação das caspases efetoras é realizada a partir de uma comunicação cruzada com a via intrínseca, intermediada pela proteína BID. A proteína BID é clivada pelas caspases 8 e 10 e promove a liberação mitocondrial de fatores pró-apoptóticos, como visto no parágrafo anterior (CHINNAIYAN *et al.,* 1995; KISCHKEL *et al.,* 1995; SCAFFIDI *et al.,* 1998; LI *et al.,* 1998; LUO *et al.,* 1998; LOCKSLEY *et al.*, 2001; LEBLANC; ASHKENAZI, 2003; PETER; KRAMMER, 2003; WAJANT *et al.,* 2003; DONEPUDI *et al.,* 2003; BOATRIGHT *et al.,* 2003).

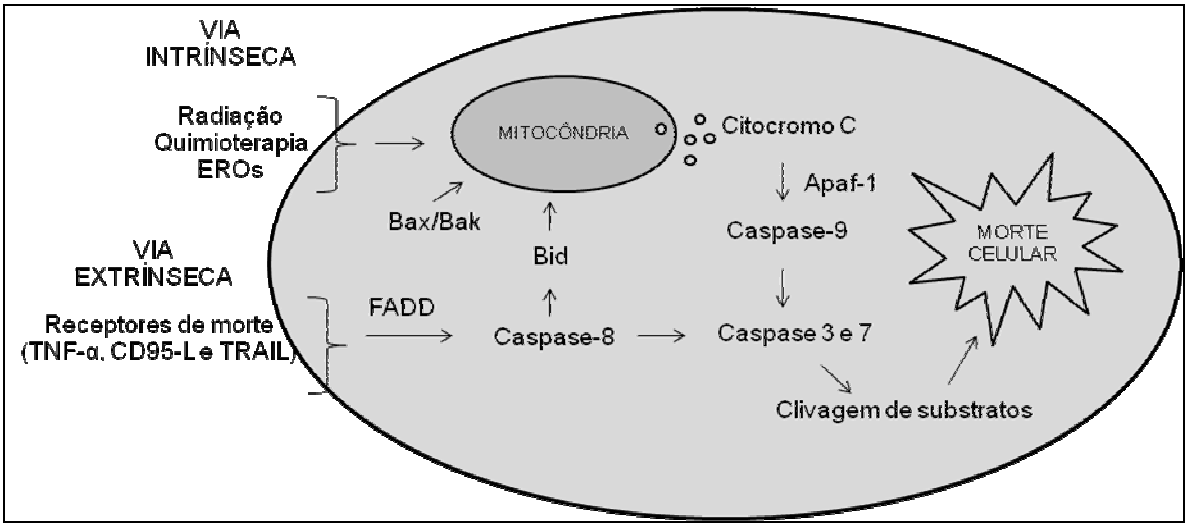


Figura 4 - Esquema das vias intrínseca e extrínseca da apoptose
Fonte: adaptado de Anazetti e Melo (2007).

Ao contrário da apoptose, a necrose não tem um mecanismo molecular bem esclarecido. A nível celular, a necrose é caracterizada pelo aumento do volume, ruptura da membrana plasmática, inchaço de algumas organelas citoplasmáticas e moderada condensação da cromatina (**Figura 5**). Dentre os fatores que podem causar esse tipo de morte celular estão a depleção energética, o desbalanço no fluxo de cálcio intracelular, a geração de EROs e a ativação de proteases não-apoptóticas (KROEMER *et al.,* 2005; RICCI; ZONG, 2006).

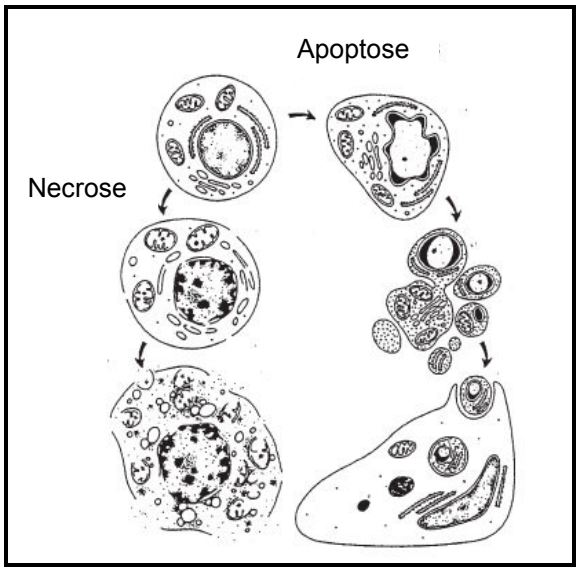


Figura 5 - Ilustração comparativa entre apoptose e necrose
Fonte: Kerr *et al*. (1995).

Muitos estudos tem mostrado a necrose como sendo um evento dissociado da apoptose. Contudo, existem evidências de que os corpos apoptóticos, quando não fagocitados por macrófagos, evoluem para um estado necrótico, conhecido como necrose secundária, e que despertam uma resposta inflamatória. Dessa forma, é possível observar morte celular por necrose a partir de um processo apoptótico inicial (WYLLIE *et al.*, 1980; MAJNO; JORIS, 1995; VAN CRUCHTEN; VAN DEN BROECK, 2002).

Por outro lado, a autofagia é caracterizada por uma intensa vacuolização autofágica do citoplasma e organelas celulares. A condensação da cromatina é muito tímida e o processo de morte pode ocorrer a partir de um estresse metabólico forte que resulta na degradação do conteúdo celular por autofagossomos. Já a catástrofe mitótica é um tipo de morte celular que apresenta como causa fundamental um processo mitótico defeituoso. Morfologicamente, a catástrofe mitótica é identificada pela presença de micronúcleos e multinúcleos (KROEMER *et al.,* 2005; RICCI; ZONG, 2006).

Por fim, a senescência consiste em um processo no qual a célula, após se dividir intensamente, entra num estágio de bloqueio do ciclo celular. Esse tipo de morte está relacionado com o encurtamento dos telômeros (estrutura cromossômica que se desgasta com as sucessivas divisões celulares) e é morfologicamente marcado pelo achatamento do citoplasma e aumento da granulosidade (DIMRI *et al.,* 1995; RICCI; ZONG, 2006).

A identificação do tipo de morte celular foi otimizada com o avanço da ciência e, hoje, conta com um número bastante grande de técnicas qualitativas e quantitativas. Dentre elas estão os métodos microscópicos (de luz, fluorescência e eletrônico) associados à coloração, a eletroforese e a citometria de fluxo (VAN CRUCHTEN; VAN DEN BROECK, 2002; TINARI *et al*., 2008).

1.3 Estratégias em busca de novas moléculas anticâncer

As estratégias para o desenvolvimento de novas drogas anti-câncer tem mudado ao longo dos anos. Os programas de *screening* começaram no início dos anos 50 no Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI-EUA), e consistiam no teste inicial de novos compostos, principalmente produtos naturais, em camundongos inoculados com leucemias L1210 e P388. Esse modelo foi

bastante questionado, uma vez que não era considerado representativo dos tumores humanos, na sua maioria tumores sólidos (SCHWARTSMANN; WORKMAN, 1993).

O modelo foi reconsiderado e, atualmente, os programas de *screening* do NCI-EUA incluem uma etapa inicial de testes *in vitro* em linhagens tumorais humanas utilizando técnicas automatizadas (High troughtput screening). Em seguida, os compostos selecionados são submetidos ao teste do Hollow Fiber antes de serem avaliados em modelos xenográficos de tumores humanos. O Hollow Fiber combinado ao modelo xenográfico constituem o modelo básico do teste antitumoral pré-clínico *in vivo.* Todo esse contexto acelerou a pesquisa de novas drogas anticâncer, levando a uma grande demanda por bibliotecas de novas e promissoras moléculas (NEWMAN *et al.,* 2003; CRAGG *et al.*, 2009).

Muitas companhias farmacêuticas são dotadas de estrutura capaz de realizar o *escreening* rápido de inúmeros compostos em relação a muitas atividades biológicas simultaneamente (citotoxicidade, antibacteriana, antiinflamatória e antiviral). Os testes são desenvolvidos com o mínimo de intervenção humana, sendo o trabalho realizado, em sua maioria, por sistemas robóticos acoplados a novas técnicas de fluorescência, ressonância magnética nuclear e de DNA. Os compostos testados são oriundos de 3 fontes principais: material natural (por exemplo, plantas, microorganismos e animais), síntese química regular e química combinatória (MANN, 2002; CRAGG *et al.*, 2009).

1.4 Classe acridina

A classe acridina é formada por compostos orgânicos que apresentam em sua estrutura química três anéis aromáticos condensados, com um átomo de nitrogênio no anel central (**Figura 6**). Esses compostos heterocíclicos são conhecidos desde o século XIX e possuem uma variedade de atividades biológicas (antibacteriana, antiparasitária e antitumoral). Em relação ao câncer, seus estudos foram iniciados durante a I Guerra Mundial e, desde então, o volume de informações nessa área tem aumentado consideravelmente (DENNY, 2002; PETRIKAITÈ *et al.*, 2007; DI GIORGIO *et al.,* 2007; BELMONT *et al.*, 2007).

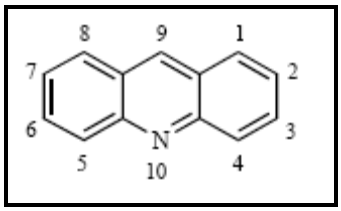


Figura 6 - Núcleo fundamental característico da classe acridina.

As propriedades anticâncer dos compostos acridínicos tem sido explicadas, nos últimos anos, a partir de sua estrutura aromática planar que possibilita interagir com o DNA celular e interferir com a atividade de enzimas importantes para o processo de replicação. Dentre os alvos moleculares estudados estão as topoisomerases I e II, a telomerase e proteínas-quinases (LERMAN, 1961; PALCHAUDHURI; HERGENROTHER, 2007; BELMONT *et al.*, 2007).

Muitos são os trabalhos que investigam a ação citotóxica de novos compostos acridínicos em células de câncer humano, bem como, seus prováveis mecanismos de ação. O efeito antiproliferativo tem sido observado em linhagens celulares de diferentes origens como leucemias, carcinoma de pulmão e carcinoma de cólon (BU *et al.*, 2002; SÁNCHEZ *et al.,* 2006; CHEN *et al.*, 2009). Neste sentido, a interação com o DNA nuclear está fortemente relacionada com o efeito citotóxico desses compostos. A imagem contida na **figura 7**, obtida por modelagem molecular, ilustra a intercalação de dois compostos acridínicos ao DNA celular (YANG *et al.*, 2005; BOUFFIER *et al*., 2006; CHILIN *et al.*, 2009).

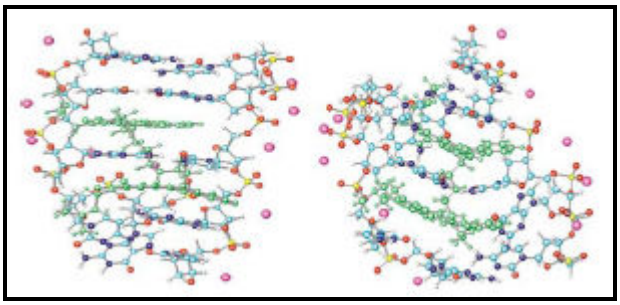


Figura 7 - Modelo de intercalação de derivado acridínico (marcação verde) no DNA. Fonte: Yang *et al.* (2005).

Como exemplo a ser citado, derivados da proflavina foram sintetizados por Kozurková *et al.* (2008), os quais demonstraram efeito citotóxico sobre duas linhagens celulares de câncer humano, HeLa (carcinoma epitelial cervical) e HCT-

116 (carcinoma de cólon), e forte ligação com o DNA celular por intercalação. Ainda neste trabalho, o ciclo celular apresentou mudanças importantes, como parada na fase S ou G2-M, após o tratamento com alguns dos compostos testados.

As enzimas topoisomerases I e II, importantes no processo de replicação celular, são alvos anticâncer de muitos derivados acridínicos seja por estabilização do complexo enzima-DNA, seja por inibição catalítica. Como conseqüência dessas ações, o DNA celular é fragmentado e o processo de morte celular programada, conhecido como apoptose, pode ser iniciado (BAGULEY *et al*., 1997; DENNY, 1997; OPPEGARD *et al*., 2009).

Muitos agentes intercalantes de DNA são utilizados na clínica no tratamento de doenças importantes. Nitracrina, amsacrina e proflavina são alguns desses agentes que pertencem a classe acridina e possuem, em comum, um cromóforo policíclico aromático planar (**Figura 8**) (SÁNCHEZ *et al.,* 2006).

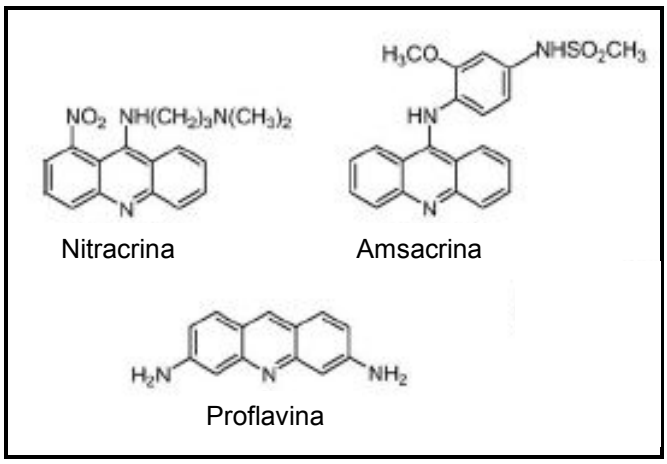


Figura 8 - Agentes intercalantes de DNA usados na clínica
Fonte: Sánchez *et al. (*2006).

A amsacrina (m-AMSA, 4'-(9-acridilamino)metanosulfon-*m*-anisidida) (**Figura 8**) é o representante mais promissor da classe acridina no tratamento do câncer. Seu mecanismo de ação tem sido explicado por intercalação ao DNA com conseqüente inibição catalítica da enzima topoisomerase II. Quando metabolizado, m-AMSA está associada com a produção de radicais livres que causam sérios danos ao DNA de células de câncer e, também, normais (BLASIAK *et al.*, 2003).

Usado na clínica desde 1976 por pacientes com leucemia, m-AMSA, entretanto, tem apresentado algumas dificuldades terapêuticas. Efeitos adversos,

resistência a droga e baixa biodisponibilidade têm fomentado a necessidade de se desenvolver novos derivados acridínicos que possam manter ou melhorar a eficácia clínica, superando as dificuldades citadas acima (SÁNCHEZ *et al.,* 2006; BELMONT *et al.*, 2007).

DACA, (N-(2-(dimetilamino)etil)acridina-4-carboxamida (**Figura 9**), é outro importante representante da classe acridina que de forma atípica tem a capacidade de inibir simultaneamente as enzimas topoisomerase I e II. Contudo, nos estudos de fase II, DACA não demonstrou eficácia significante em pacientes com câncer de pulmão e de coloretal (CAPONIGRO *et al.,* 2002; DITTRICHA *et al.*, 2003).

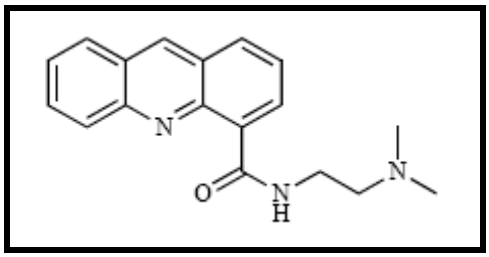


Figura 9 - Estrutura química de DACA

Neste sentido, o grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta, vinculado ao Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sintetizou e patenteou uma série de novos compostos acridínicos, os quais demonstraram forte efeito antitumoral em camundongos transplantados com sarcoma 180 (SILVA, 2003).

Em colaboração com outras instituições federais do país, este novo conjunto de moléculas foi o objeto de estudo do presente trabalho, no intuito de contribuir com a valorização e a aplicabilidade terapêutica dos compostos desenvolvidos.

Os experimentos deste trabalho foram realizados, em sua maioria, no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental vinculado ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Determinar o potencial anticâncer de 4 novos compostos acridínicos sintéticos: AC4, 5-(acridin-9-il-metileno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona; AC7, 5-(acridin-9-il-metileno)-3-(4-bromo-benzil)-tiazolidina-2,4-diona; AC10, 5-(acridin-9-il-metileno)-3-(4-cloro-benzil)-tiazolidina-2,4-diona; e AC23, 5-(acridin-9-il-metileno)-3-(4-flúor-benzil)-tiazolidina-2,4-diona; em modelos experimentais *in vitro*.

2.2 Específicos

Determinar a atividade e a seletividade citotóxica em linhagens tumorais humanas, bem como, em células saudáveis;

Determinar a atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos Swiss (*Mus musculus)*;

Avaliar o padrão de morte celular envolvido na atividade citotóxica, bem como, o efeito sobre a progressão do ciclo celular, usando células tumorais HCT-8 (cólon humano) como modelo;

Identificar a sensibilidade *in vitro* de linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* para as enzimas topoisomerase I, II e III, pelo teste em gotas;

Determinar a ação sobre a atividade catalítica da enzima topoisomerase I, por eletroforese em gel;

Avaliar a genotoxicidade em células mononucleares de sangue periférico humano pelo teste do cometa.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Soluções, reagentes e fármacos

Ácido Acético	-	Vetec®
Ácido Clorídrico	-	Vetec®
Álcool Etílico	-	Vetec®
Agarose 1 %	0,5 g de agarose Água deionizada q. s. p. 50 mL	FMC - Bioproducts®
Agarose LMP 1,5 %	1,5 g de agarose PBS q. s. p. 100 mL	Gibco®
Agarose NMP 0,5 %	0,5 g de agarose PBS q. s. p. 100 mL	Gibco®
Anticorpo anti-BrdU	1 µL de anticorpo anti-BrdU BSA 5 % q.s.p. 500 µL de solução	Sigma® Dako®
Anticorpo biotinilidado anti-imunoglobulina de camundongo	1 µL de anticorpo anti-imunoglobulina BSA 5 % q.s.p. 100 µL de solução	Sigma®
Azul de tripan 10%	10 mg de azul de tripan PBS q.s.p. 100 mL de solução	Sigma® -

BrdU 10mM	-	Sigma®
Brometo de Etídio 100 µg/mL	1mg de brometo de etídeo PBS q.s.p 10 mL de solução	Sigma® -
Camptotecina	-	TopoGEN®
Citrato de Sódio	-	Grupo Química®
Cloreto de Sódio (NaCl)	-	Labsynth®
Diaminobenzidina (DAB)	5 µL de DAB 1 mL de Tris-HCl (Tris 0,05M) pH= 7,6 2 µL de H_2O_2	Immunotech® Proquímios® Proquímios®
Dimetilsulfóxido (DMSO)	-	Vetec®
Doxorrubicina – fornecida pelo Instituto do Câncer do Ceará – ICC	-	Zodiac®
EDTA	-	Qeel®
Eosina 0,5%	0,5 g de Eosina 80 mL de Álcool etílico 0,5 mL de Ácido acético 20 mL de H_2O	Doles® -

Estreptavidina – peroxidase	1 µL de Estreptavidina – peroxidase	Sigma®
	BSA 5 % q.s.p. 100 µL de solução	Dako®
Ficoll	-	Sigma®
Fitohemaglutinina	-	Sigma®
Formaldeído 10 %	100 mL de formaldeído H_2O q. s. p. 1 L	Dinâmica®
Hematoxilina 0,1%	0,5 g de Hematoxilina 10 mL de Glicerina 25 g de Sulfato de alumínio 0,1 g de Iodeto de potássio H_2O q.s.p. 500 mL de solução	Doles® Labsynth® Labsynth® Labsynth® -
Hidróxido de Sódio (NaOH)	-	Vetec®
Iodeto de propídeo 50 µg/mL	1 mg de iodeto de propídeo PBS q.s.p. 50 mL	Boehringer®
Laranja de Acridina	1 g de laranja de acridina (100 µg/mL) H_2O q.s.p. 10 mL de solução	Fluka®
		-

Meio de cultura de células RPMI 1640	Diluído em água deionizada e esterelizada, filtrado em filtro millipore (0,22 µm) e complementado com SBF 10 %, 1 % de glutamina, 1 % de antibióticos, 1 % de bicarbonato de sódio (0,75 %) e 25 mM de HEPES	Cultilab®
MTT	20 mg de MTT PBS q.s.p. 100 mL de solução	Sigma® -
N-Lauroylsarcosine	-	Sigma®
Penicilina – estreptomicina	Penicilina 10.000 U.I./mL Estreptomicina 10 mg/mL	Cultilab® Cultilab®
Ringer-lactato	Cloreto de Sódio = 0,600g Cloreto de Potássio = 0,030g Cloreto de Cálcio $2H_2O$ = 0,020g Lactato de Sódio = 0,30g Água q. s. p. 100 mL	Laboratórios Biosintética®
Sulfato de Gentamicina	-	Gentamicin Novafarma®
Solução de Eletroforese	EDTA 1mM, NaOH 300 mM, pH > 13	-
Solução de Lise	NaCl 2,5M, EDTA 100mM Tris 10mM, N-Lauroyl sarcosine 1% pH = 10, Triton X-100 1 %, DMSO 10 %	-

Solução de Neutralização	Tris 0,4 M, pH = 7,5	
Solução desnaturante (para análise de incorporação de BrdU)	Formamida 70 % 2x SSC (pH entre 6,5 e 7,5 a 70 °C)	Vetec®
Soro fetal bovino	-	Cultilab®
Solução salina (para hemólise)	8,5 g de Cloreto de sódio (0,85 %) 1,11 g de Cloreto de cálcio (10 mM) H_2O q.s.p 1 L de solução	Labsynth® Reagen® -
SSC 10X	Cloreto de sódio 1,5 M Citrato de sódio 0,15 M H_2O	-
Tampão de corrida 50 X (TAE)	242 g de TRIS 57,1 mL de ácido acético glacial 100 mL de EDTA 0,5 M	-
Tampão fosfato (PBS)	8,766 g de Cloreto de sódio 2,14 g de NaHPO4.7H_2O 0,276 g de NaHPO4.H_20 H_20 q.s.p. 1 L de solução (pH = 7,2)	Labsynth® Labsynth® Labsynth® -
Tampão Tris (TBS) 10X	Cloreto de sódio 1,5 M Tris 0,5 M (pH= 7,6) H_2O	Labsynth® Proquímios® -

Topoisomerase I Drug Screeening Kit	-	TopoGEN®
Tripsina 0,25%	50 mL de Tripsina 2,5 % 0,125 g de EDTA 450 mL de PBS	Cultilab® Proquímios® -
Triton X -100	-	Isofar®
Xilol 10 %	100 mL de formaldeído H_2O q. s. p. 1 L	Dinâmica®
5- Fluorouracil	2,5 mg/1 mL	ICN Farmacêutica®

Equipamentos

Agitador de placa, MLW Modelo Thys 2®
Agitador de tubo, Donner AD 8850®
Banho-maria, DELLTA Modelo 105Di®
Centrífuga Centimicro, FANEN Modelo 212®
Centrífuga Excelsa Baby, I FANEN Modelo 206®
Centrífuga de placas, Eppendorf Modelo Centrifuge 5403®
Centrífuga de lâminas, Shandon Southern Cytospin®
Citômetro de fluxo, Guava EasyCyte mini®
Deonizador de água Milli-Q, Milipore®
Espectrofotômetro de placa DTX-880, Beckman Coulter®
Fluxo laminar, VECO®
Incubadora de células, (CO_2 Water-Jacket Incubator) NUAIRE TS Autoflow®
High Throughput Screening (HTS)/Laboratory Automation Workstation, Biomek 3000, Beckman
Coulter®
Máquina fotográfica digital, Olympus C-7070®

Microondas, Panasonic®
Microscópio óptico, Metrimpex Hungary/PZO-Labimex Modelo Studar lab®
Microscópio óptico de inversão, Nikon Diaphot®
Microscópio de fluorescência, Olympus®
Micrótomo, Slee Mainz®
pHmetro, Micronal B474®
Pipetas automáticas, Gilson®
Sistema de Eletroforese Horizontal mini Submarine, Amersham Biosciences®
Sistema de Fotodocumentação, Kodak®

Material biológico

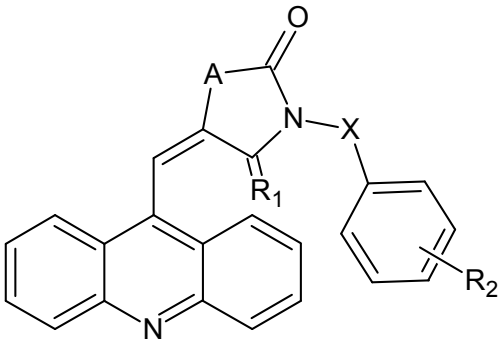
Linhagens celulares de câncer humano mantidas em cultura (**Tabela 2**);
Células mononucleares de sangue periférico humano isoladas de voluntários sadios;
Linhagens selvagem e mutantes (deficientes para as enzimas topoisomerase I, Top1Δ, topoisomerase III, Top3Δ, e topoisomerase I e III, Top1/3Δ) da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção dos compostos acridínicos

Os vinte e dois novos compostos acridínicos estudados neste trabalho foram sintetizados no Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta.

A estrutura química desse novo conjunto de moléculas está representada na **figura 10**.



Código	A	X	R_1	R_2
AC4	S	CH_2	O	4-CH_3
AC6	S	CH_2	O	4-NO_2
AC7	S	CH_2	O	4-Br
AC8	S	CH_2CO	O	4-NO_2
AC10	S	CH_2	O	4-Cl
AC12	S	CH_2CO	O	4-fenil
AC15	S	CH_2CO	O	4-F
AC16	S	CH_2CO	O	4-Br
AC23	S	CH_2	O	4-F
AC25	S	CH_2	O	2-Cl
AC26	NH	CH_2	S	4-Cl
AC27	NH	CH_2	S	4-NO_2
AC28	NH	CH_2	S	H
AC30	S	CH_2	O	4-fenil
AC34	S	CH_2	O	3-Cl
AC99	S	CH_2	S	4-CH_3
AC100	NH	CH_2	S	2-Cl
AC109	S	CH_2	O	2-NO_2
AC119	S	CH_2	S	4-Cl
AC124	NH	CH_2	S	4-F
AC128	NH	CH_2	S	2-NO_2
AC129	S	CH_2	S	2-Cl

Figura 10 - Estrutura química dos novos compostos acridínicos.

As amostras foram dissolvidas em DMSO puro e estéril na concentração estoque de 5 mg/mL, e devidamente acondicionadas até o momento do uso.

3.2.2 Manutenção das células tumorais humanas em cultura

Neste estudo foram utilizadas 16 linhagens celulares tumorais humanas, cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (**Tabela 2**).

As células foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm^3, volume de 250 mL), e mantidas com os meios RPMI 1640 ou DMEM, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5 % de CO_2 a 37 ºC. Diariamente, acompanhava-se o crescimento celular com a utilização de microscópio de inversão. O meio foi trocado sempre que o crescimento celular atingia confluência necessária para renovação de nutrientes. Para a manutenção de células aderidas utilizou-se tripsina (0,25%) para que as células soltassem das paredes das garrafas (PESSOA, 2000).

Tabela 2 - Linhagens tumorais humanas utilizadas no ensaio de citotoxicidade *in vitro* por meio do teste do MTT.

Linhagem Celular	Tipo Histológico
HL-60	Leucemia promielocítica humana
K-562	Leucemia mielocítica crônica humana
CEM	Leucemia linfocítica humana
HCT-8	Carcinoma de cólon humano
HCT-15	Carcinoma de cólon humano
SW-620	Carcinoma de cólon humano
COLO-205	Carcinoma de cólon humano
MDAMB-231	Carcinoma de mama humano
HS-578-T	Carcinoma de mama humano
MX-1	Carcinoma de mama humano
PC-3	Carcinoma de próstata humano
DU-145	Carcinoma de próstata humano
SF-295	Glioblastoma humano
OVCAR-8	Carcinoma de ovário humano
UACC-62	Melanoma humano
MDAMB-435	Melanoma humano

3.2.3 Obtenção de células mononucleares de sangue periférico humano (CMSPH)

As células mononucleares de sangue periférico humano (linfócitos e monócitos) foram obtidas de voluntários saudáveis. A coleta do sangue foi realizada em frascos heparinizados por profissionais capacitados, nas dependências da Unidade de Farmacologia Clínica da Universidade Federal do Ceará (UNIFAC-UFC), utilizando seringas esterilizadas e descartáveis com volume de 5 mL. O material obtido foi imediatamente transportado para o Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC.

CMSPH foram isoladas a partir de 3 mL de sangue acrescidos de 5 mL de PBS. As etapas até o isolamento incluíram a adição de 3 mL de Ficoll, seguida por 30 minutos de centrifugação a 1000 rpm. A suspensão de células presente na região

intermediária entre as hemácias e o plasma foi, então, transferida para outro tubo, ao qual foi acrescido PBS até o volume de 11 mL, sendo centrifugado por 20 minutos a 10 G. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi ressuspendido em meio completo (RPMI 1640 acrescido de 20% de soro fetal bovino, 1 % de antibiótico (penicilina-estreptominica) e 4% de fitohemaglutinina) e contado em câmera de Newbauer para posterior diluição e plaqueamento.

3.2.4 Manutenção das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

As linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas neste trabalho encontram-se descritas na **tabela 3**, e foram disponibilizadas pelo Prof. Dr. J. A. P. Henriques da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

As células de levedura foram cultivadas em meio YEL (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose) e mantidas sob agitação orbital de 180 rpm a 28 °C. Após 3 dias, quando a cultura atingia a fase estacionária, as células foram contadas e diluídas na concentração de 0,5 x 10^7 células/mL. Essa suspensão foi novamente submetida a agitação orbital de 180 rpm a 28 °C por 2 horas. Após esse tempo, obtinha-se uma cultura de células em fase exponencial de crescimento, a qual foi utilizada no teste em gotas.

Tabela 3 - Linhagens celulares de levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas no teste em gotas.

Linhagem	Característica
BY-4741-WT	Selvagem
Top1Δ	Sem topoisomerase I
Top3Δ	Sem topoisomerase III
Top1/3Δ	Sem topoisomerase I e III ou apenas topoisomerase II

3.2.5 Ensaio de citotoxicidade em células tumorais humanas - Teste do MTT

Princípio do teste

A avaliação do efeito citotóxico dos compostos testes em células tumorais humanas foi realizada pelo Teste do MTT após 72 h de incubação. Este é um ensaio quantitativo *in vitro* que foi desenvolvido por Mosmann em 1983 para estimar a proliferação e a sobrevivência celular. É definido na literatura como apropriado para estimar a citotoxicidade (PESSOA *et al.*, 2000; COSTA-LOTUFO *et al.*, 2004; BEZERRA *et al.*, 2005; BEZERRA *et al.,* 2008) e baseia-se na capacidade da succinato desidrogenase, uma enzima do Ciclo de Krebs ativa em mitocôndrias de células viáveis, em converter o sal de tetrazolium (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, ou MTT), que é hidrossolúvel e de cor amarelada, em cristais de formazan, que são de cor púrpura. Essa técnica tem a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula, sendo assim, bastante útil para avaliar a citotoxicidade.

Procedimento experimental

Inicialmente, os 22 novos compostos acridínicos foram testadas em concentração única (25 μg/mL) para avaliação do potencial citotóxico utilizando 3 linhagens celulares de tumores sólidos (HCT-8, SF-295 e MDA-MB-435). Nesse *screening* inicial, foram consideradas ativas, e, portanto, selecionadas, as amostras que apresentaram percentual de inibição do crescimento celular maior ou igual a 90% em pelo menos uma das linhagens testadas.

Em seguida, os compostos selecionados foram testados em um painel de linhagens celulares de diferentes origens (**Tabela 2**) para a determinação de suas CI_{50} (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular), como descrito a seguir.

As células foram distribuídas em placas de 96 poços numa densidade de 0,3 x 10^6 células/mL, para células em suspensão, e 0,7 x 10^5 células/mL, para células aderidas. Após 24 h de incubação, os compostos acridínicos (0,09 a 25 μg/mL) dissolvidos em DMSO foram adicionados a cada poço, utilizando o HTS (*high-*

throughput screening), e as placas incubadas por 72 horas. A doxorrubicina e a amsacrina foram utilizadas como controle positivo com concentrações variando de 0,003 a 0,25 µg/mL. O controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (1500 rpm/15 min), e o sobrenadante foi descartado. Cada cavidade recebeu 200 µL da solução de MTT (0,5 mg/mL em meio RPMI 1640) e a placa reincubada por 3 horas, em estufa a 37 ºC e a 5% CO_2. Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (3000 rpm/10 min), o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado foi ressuspendido em 150 µL de DMSO. Para a quantificação do sal reduzido nas células vivas, as absorbâncias foram lidas com o auxílio do espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 595 nm (MOSMANN *et al*., 1983).

Análise dos dados

No screening inicial, as amostras em duplicata foram testadas em concentração única e a porcentagem de inibição do crescimento (%IC) foi determinada de maneira relativa ao controle negativo. Foram selecionadas as amostras com %IC > 90 % em pelo menos uma das linhagens tumorais testadas. Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de 2 experimentos independentes utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

Os compostos selecionados foram testados em diluições seriadas, em duplicata ou triplicata. Foi registrada a porcentagem de inibição x log da concentração e determinadas suas CI_{50} (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) a partir de regressão não-linear, utilizando, também, o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

3.2.6 Ensaio de citotoxicidade em células saudáveis - Teste do Alamar Blue

Princípio do teste

O teste do alamar blue foi realizado utilizando células mononucleares de sangue periférico humano (CMSPH), que inclui linfócitos e monócitos, após 72 h de incubação. O alamar blue, recentemente identificado como resazurina (O'BRIEN *et al.,* 2000), é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox. Como acontece com os sais de tetrazólio, o alamar blue é reduzido em células em proliferação. A forma oxidada é azul (não fluorescente/célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável). A redução do alamar blue reflete a proliferação celular. Este método foi inicialmente utilizado para indicar crescimento e/ou viabilidade celular no monitoramento de proliferação de linfócitos (AHMED *et al.,* 1994) e atualmente apresenta várias aplicações.

Procedimento experimental

Inicialmente, as CMSPH foram distribuídas em placas de 96 cavidades (3 x 10^4 células/mL). Após 24 h de incubação, os compostos acridínicos (0,09 a 25 µg/mL) dissolvidos em DMSO foram adicionados em cada poço, utilizando o HTS, e incubadas por 72 h. A amsacrina e a doxorrubicina (0,09 a 25 µg/mL) foram utilizadas como controle positivo. O controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO. Vinte e quatro horas antes do final do período de incubação, 10 µL da solução estoque (0,312 mg/mL) de alamar blue (resazurina) foram adicionados a cada poço. As absorbâncias foram mesuradas nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado) utilizando uma leitora de placa (AHMED *et al.,* 1994).

Análise dos dados

A proliferação celular foi calculada utilizando a seguinte fórmula: % proliferação = $A_{LW} – (A_{HW} \times R_0) \times 100$. Onde, A_{LW} e A_{HW} são as absorbâncias no menor e maior comprimento de onda, respectivamente. O R_0 foi calculado utilizando a seguinte fórmula: $R_0=AO_{LW}/AO_{HW}$. Onde, AO_{LW} e AO_{HW} são as absorbâncias do

meio adicionado ao alamar blue subtraído das absorbâncias do meio isolado nos comprimentos de onda menor e maior, respectivamente. A substância foi testada em diluição seriada, em duplicata ou triplicata. Foi registrada a porcentagem de inibição x log da concentração e determinado suas CI_{50} e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

3.2.7 Determinação da atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos Swiss (*Mus musculus)*

Princípio do teste

Segundo Costa-Lotufo *et al.* (2002), este ensaio permite avaliar o potencial dos compostos testes em causar danos à membrana plasmática da célula, seja pela formação de poros ou pela ruptura total da mesma.

Procedimento experimental

O sangue foi coletado de camundongos *Swiss* (*Mus musculus*) por via orbital e diluído em 30 volumes de solução salina (NaCl 0,85% + $CaCl_2$ 10mM). Os eritrócitos foram lavados 2 vezes em solução salina por centrifugação (1500 rpm / 5 min) para redução da contaminação plasmática e ressuspendidos em solução salina para se obter uma suspensão de eritrócitos (SE) a 2%. Esses experimentos foram realizados em multiplacas com 96 poços, com a concentração dos compostos testes variando de 1,56 a 200 µg/mL. Cada poço da 1ª fileira recebeu 100 µL da solução salina. Na 2ª, os poços receberam 80µL da solução salina e 20 µL do veículo de diluição da substância teste, neste caso, DMSO 10%. Aos poços da 3ª fileira, foram adicionados 180µL de solução salina e 20 µL da substância teste em solução (1mg/mL). Da 4ª fileira em diante os poços receberam 100 µl da solução salina, excetuando-se os da última fileira, que receberam 80 µL de solução salina e 20 µL de triton X-100 1% (controle positivo). As diluições foram feitas da 3ª à 11ª cavidade, retirando-se 100µL da solução da cavidade anterior e transferindo para a seguinte de modo que as concentrações sejam sempre diluídas pela metade. Em seguida,

100μL da suspensão de eritrócitos 2% foram plaqueados em todos os poços. Após incubação de 1 h sob agitação constante à temperatura ambiente (26 ± 2°C), as amostras foram centrifugadas (5000 rpm/ 3min) e o sobrenadante foi analisado em espectrofotômetro de placa a 540 nm.

Análise dos dados

A atividade da substância foi determinada de maneira relativa ao valor dos controles positivo e negativo. Foi registrada a porcentagem do efeito x log da concentração e determinadas suas CE_{50} (concentração média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) a partir de regressão não-linear, utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

3.2.8 Estudo do padrão de morte celular e do efeito sobre a progressão do ciclo celular

Nesta etapa do estudo, células de câncer de cólon humano (HCT-8) foram utilizadas como modelo. Em cada experimento, as células foram plaqueadas na densidade de 7 x 10^4 células/mL e incubadas com os compostos acridínicos em diferentes concentrações (2,5 μg/mL, 5 μg/mL e 10 μg/mL) por 12h e 24h. As concentrações testadas foram determinadas a partir da CI_{50} obtida pelo teste do MTT em células HCT-8. A doxorrubicina (0,3 μg/mL) e a amsacrina (0,3 μg/mL) foram usadas como controle positivo e o controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO) utilizado para dissolver as substâncias, o qual foi mantido abaixo de 1%.

3.2.8.1 Determinação da viabilidade celular - Teste do Azul de Tripan

Princípio do teste

O teste do azul de tripan permite quantificar separadamente as células viáveis e as não viáveis após a incubação com os compostos testes. O teste baseia-se na capacidade que o corante azul de tripan tem de penetrar em todas as células. Entretanto, apenas as células viáveis conseguem bombear o corante para fora, sendo possível, observar uma marcação azulada para as células não viáveis, que perderam essa capacidade.

O teste do azul de tripan foi realizado antes de cada experimento desta etapa do estudo para verificar a viabilidade celular.

Procedimento Experimental

As células HCT-8 foram distribuídas em placas de 24 poços e incubadas com os compostos testes por 12 h e 24 h. Após a incubação, 10 µL do azul de tripan foram adicionados a 90 µL da suspensão de células em tubo eppendorf. As células viáveis e não viáveis foram diferenciadas e contadas em câmara de Newbauer.

Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de n experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p<0,05$).

3.2.8.2 Análise morfológica - Coloração com Hematoxilina/Eosina

Princípio do teste

A coloração utilizada neste experimento permite verificar alterações morfológicas citoplasmáticas, nucleares e de membrana celular. O teste baseia-se na capacidade que a hematoxilina tem de marcar o núcleo celular em azul, por ser

um corante alcalino, aliada a afinidade da eosina pelo citoplasma, por ser um corante ácido, conferindo-lhe uma coloração rósea.

Procedimento Experimental

As células HCT-8 foram distribuídas em placas de 24 poços e incubadas com os compostos testes por 12 h e 24 h. Para observar a morfologia, 50 µL da suspensão de células foram adicionados à centrífuga de lâmina (cytospin) para promover sua adesão. Após a adesão das células na lâmina, a fixação foi feita com metanol por 1 minuto, seguida de coloração com hematoxilina, e depois com eosina.

Análise dos dados

As lâminas contendo as células coradas foram levadas ao microscópio óptico para avaliação das suas características morfológicas e comparadas com o controle negativo. O registro das alterações celulares foi feito por fotografia.

3.2.8.3 Análise morfológica - Coloração diferencial com Brometo de Etídio/Laranja de Acridina

Princípio do teste

O método de coloração pelo brometo de etídio/laranja de acridina (MCGAHON e*t al.,* 1995) permite diferenciar células viáveis daquelas em processo de morte por apoptose ou necrose. Este método baseia-se na revelação diferencial das células por fluorescência. A laranja de acridina (LA) é capaz de atravessar membranas intactas e intercala-se ao DNA celular conferindo aparência verde ao núcleo. O brometo de etídio (BE), por sua vez, só consegue intercalar ao DNA e marcar o núcleo em vermelho se a membrana celular estiver danificada. Dessa maneira, as células viáveis, que tem a membrana íntegra, apresentam núcleo uniformemente corado de verde pela LA. As células em apoptose (membrana ainda íntegra) apresentam manchas verdes brilhantes (condensação da cromatina e fragmentação nuclear) e não são marcadas por BE. Na apoptose, observam-se, também, alterações na membrana celular em decorrência da formação de corpos

apoptóticos. O BE é incorporado majoritariamente por células necróticas (membrana danificada) e apresentam, portanto, núcleo corado de vermelho (KUMMAR *et. al*. 2004).

Procedimento Experimental

As células HCT-8 foram distribuídas em placas de 24 poços e incubadas com os compostos testes por 12 h e 24 h. Após a incubação, a suspensão de células foi transferida para tubo eppendorf e centrifugada por 5 min em baixa rotação. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em 20 µL de solução de PBS. Em seguida, 1 µL da solução de BE:LA foi adicionado ao tubo, e uma alíquota dessas células foi transferida para uma lâmina. A lâmina foi montada com lamínula para contagem em microscópio de fluorescência. Foram contadas 300 células de cada amostra para a quantificação percentual dos eventos celulares (viáveis, apoptóticas e necróticas). As lâminas foram fotografadas para o registro visual dos efeitos.

Análise dos Dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de 3 experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p<0,05$).

3.2.8.4 Avaliação da síntese de DNA - Ensaio do BrdU

Princípio do teste

Este ensaio permite avaliar o efeito sobre a síntese de DNA celular. O ensaio baseia-se na capacidade que a bromodeoxiuridina (BrdU) tem de ser incorporado ao núcleo de células que estão sintetizando DNA. A incorporação ocorre porque o BrdU é uma base nitrogenada análoga a Timina. A detecção do BrdU incorporado é realizada por técnicas de imunocitoquímica.

Procedimento Experimental

As células HCT-8 foram distribuídas em placas de 24 poços e incubadas com os compostos testes por 24 h. O BrDU foi adicionado 3 h antes do término do período de incubação, para que fosse incorporado ao DNA das células em mitose. Três horas após a adição do BrdU (0,01 μM) na cultura de células, lâminas para cada amostra foram preparadas e postas para secar por 2 h. Após o período de secagem, as lâminas foram fixadas em metanol por 1 minuto. As células foram lavadas com tampão Tris (TBS) e incubadas em solução desnaturante por 90 minutos a 60 ºC e pH 7,4. Após uma segunda lavagem com TBS, as células foram circuladas com caneta hidrofóbica e incubadas com o anticorpo primário em câmara úmida, na geladeira por uma noite. As células foram incubadas com anticorpo secundário biotinilado por 20 minutos e, em seguida, com a solução de estreptavidina-fluoresceína por mais 20 minutos. O cromógeno diaminobenzidina (DAB) foi adicionado por 1-5 minutos e, o excesso removido com água destilada. A contracoloração das células foi realizada com hematoxilina de Hanks (0,1 %) para posterior observação e contagem ao microscópio óptico. Duzenta células foram contadas diferenciando-as em positivas para proliferação, núcleo corado pelo DAB (cor marrom), e negativas, núcleo corado com hematoxilina (cor azul).

Análise dos dados

Os dados foram transformados em porcentagem e analisados a partir da média e do erro padrão da média de 3 experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p<0,05$).

3.2.8.5 Testes utilizando citometria de fluxo

a) Determinação da integridade de membrana e viabilidade celular

Princípio do teste

A análise da integridade da membrana plasmática é uma importante ferramenta para estudar o tipo de morte celular, visto que, apenas na necrose, a membrana plasmática está precocemente alterada. O teste baseia-se na capacidade do iodeto de propídeo (IP), que é hidrofílico, de penetrar apenas em células cuja membrana esteja rompida. Após a ligação ao DNA, o IP emite alta fluorescência quando é excitado pelo laser de argônio (488 nm). A célula com membrana íntegra emite, portanto, baixa fluorescência.

Neste experimento, também é possível avaliar aspectos morfológicos como volume e granulosidade, que foram também utilizados como parâmetros na determinação da viabilidade celular (MACKLIS; MADISON, 1990). O teste baseia-se no desvio frontal e lateral da luz incidida sobre as células. O desvio frontal determina o volume celular e o lateral mede a granulosidade.

Procedimento experimental

As células HCT-8 foram distribuídas em placas de 24 poços e incubadas com os compostos testes por 12 h e 24 h. Uma alíquota de 50 µL foi recolhida da suspensão de células e diluída com a solução de IP (2 µg/mL em PBS). Após 5 minutos na ausência de luz a 37 ºC, as células (cinco mil eventos) foram analisadas por citometria de fluxo (MILITÃO *et al.,* 2006).

Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média ± E.P.M. de 3 experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p<0,05$).

b) Determinação do potencial transmembrânico da mitocôndria

Princípio do teste

A mitocôndria está envolvida na via intrínseca da apoptose. Nesse processo, membros da família Bcl-2 ligam-se a membrana externa da mitocôndria formando um poro que permite a saída de vários fatores apoptóticos (p. ex. citocromo c) e de íons H^+, causando despolarização mitocondrial. Assim, o teste baseia-se na marcação de mitocôndrias com potencial transmembrânico normal pela rodamina 123, um corante fluorescente que tem elevada afinidade por prótons (nucleofílico). As células viáveis emitirão alta fluorescência verde devido à maior quantidade de rodamina 123 ligada às cargas positivas internas, enquanto que as mitocôndrias despolarizadas terão menor afinidade pelo corante, gerando eventos que emitirão menor fluorescência. Deste modo, este ensaio foi utilizado para investigar a ativação da via apoptótica intrínseca a partir do potencial transmembrânico mitocondrial (MARCHETTI *et al.,* 1996).

Procedimento experimental

As células HCT-8 foram distribuídas em placas de 24 poços e incubadas com os compostos testes por 12 h e 24 h. Uma alíquota de 50 µL foi recolhida da suspensão de células e diluída com a solução de rodamina 123 (1 µg/mL em PBS). Após 15 minutos na ausência de luz e a 37 ºC, as células foram centrifugadas e o precipitado ressuspendido em PBS. O material foi reincubado por 30 minutos e, então, analisado (cinco mil eventos) por citometria de fluxo (MILITÃO *et al.,* 2006).

Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média ± E.P.M. de 3 experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p<0,05$).

c) Determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula

Princípio do teste

Este ensaio foi realizado com o intuito de determinar o conteúdo de DNA nuclear das células. O teste baseia-se na capacidade do corante IP em ligar-se ao DNA celular e emitir fluorescência vermelha em intensidade proporcional ao seu conteúdo. Assim, as diferentes fases do ciclo celular (G_0/G_1, S e G_2/M) podem ser determinadas a partir do seu conteúdo de DNA. Quando a célula apresenta cromatina condensada e/ou DNA fragmentado (sub-G1), a quantidade de IP incorporada é menor, e, portanto emitirá baixa fluorescência.

Procedimento experimental

As células HCT-8 foram distribuídas em placas de 24 poços e incubadas com os compostos testes por 12 h e 24 h. Uma alíquota de 50 µL foi recolhida da suspensão de células e diluída com a solução de lise contendo IP (0,1% de citrato de sódio, 0,1 % de triton X-100 e 2 µg/mL iodeto de propídeo em PBS). Após 30 minutos na ausência de luz e a 37 ºC, o material (cinco mil eventos) foi analisado por citometria de fluxo (MILITÃO *et al.,* 2006).

Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média ± E.P.M. de 3 experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p<0,05$).

3.2.9 Ensaio de sensibilidade de *Saccharomyces cerevisiae* - Teste em Gostas

Princípio do teste

Este ensaio permite avaliar qualitativamente o crescimento de células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na presença dos compostos testes. O uso de linhagens mutantes para as enzimas topoisomerase I e III permite sugerir se o efeito inibitório do crescimento está relacionado com algumas dessas enzimas.

Procedimento Experimental

As células de levedura em crescimento exponencial foram contadas em câmara de Newbauer e diluídas com meio YEL a uma concentração de 2 x 10^5 células/mL. Os compostos acridínicos foram adicionados (50 e 100 µg/mL) e 4 novas diluições 1:10 foram realizadas. Em seguida, gotas de 3 µL de cada diluição foram adicionadas em placas de Petry contendo meio YEPD (YEL + Ágar). Após 3-4 dias de crescimento a 28 °C, as placas foram fotografadas para registro dos resultados. Amsacrina (50 e 100 µg/mL) foi utilizada como controle positivo (**Figura 11**).

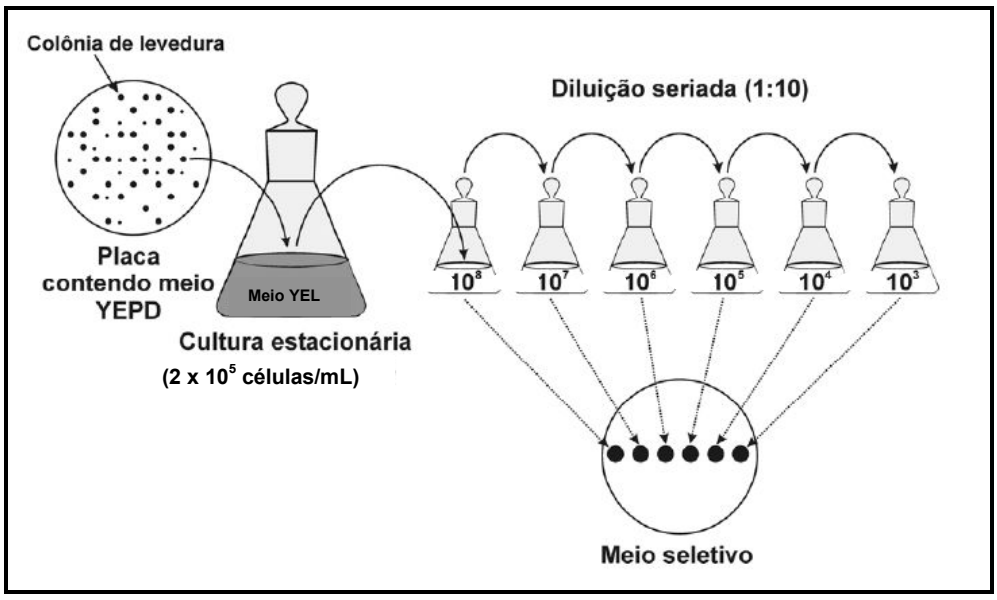


Figura 11 - Esquema ilustrativo do teste em gotas

Análise dos dados

As imagens obtidas foram avaliadas visualmente quanto ao efeito inibitório do crescimento celular.

3.2.10 Ensaio de Relaxamento do DNA

Princípio do teste

Este ensaio permite avaliar o potencial inibitório dos compostos testes sobre a atividade catalítica da enzima topoisomerase I (Topo I). O teste baseia-se na capacidade da enzima topo I de promover relaxamento de DNA superhelicoidizado, o qual apresenta padrão de corrida eletroforética diferenciado.

Procedimento Experimental

A ação inibitória dos compostos acridínicos sobre a enzima Topoisomerase I humana (Topoisomerase I Drug Screening Kit, TopoGEN, Inc., Columbus, USA) foi avaliada de acordo com Bezerra *et al*. (2007). Um microlitro (250 ng) de DNA plasmidial superhelicoidizado (pRYG, uma derivação do pUC 19) foi incubado com a Topo I (4 U) a 37 ºC por 30 min no tampão de relaxamento (Tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,9, EDTA 1 mM, NaCl 0,15 M, BSA 0,1 %, espermidina, 0,1 mM e glicerol 5 %) na presença de 50 e 100 μM dos compostos acridínicos, para um volume final de 20 μL. A droga Camptotecina (0,1 mM) foi usada como controle positivo. A parada da reação foi feita adicionando 2 μL de SDS 10 % (para facilitar o bloqueio da enzima no complexo de clivagem) e 50 μg/mL de proteinase K (para digerir ligações protéicas). As amostras foram misturadas ao tampão de amostra contendo o corante azul de bromofenol (0,25 %). Em seguida, as amostras foram aplicadas no gel de agarose 1 % e a corrida eletroforética foi realizada a 80 V (volts) for 120 min à temperatura ambiente. A revelação do gel foi feita com brometo de etídio e, imediatamente fotografado sob luz ultravioleta.

Análise dos dados

As imagens obtidas foram avaliadas quanto ao padrão de corrida eletroforética das amostras e comparadas com os controles positivo e negativo.

3.2.11 Avaliação do potencial genotóxico - Ensaio Cometa

Princípio do teste

O ensaio cometa ou SCGE (*Single Cell Gel Electrophoresis Assay*) foi desenvolvido por Singh *et al.* (1988) para detectar quebra simples e dupla na molécula de DNA induzida por compostos com potencial genotóxico, tais como agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes. Este ensaio é muito utilizado em estudos de genética toxicológica como biomonitoramento ambiental e populacional. Entretanto, seus resultados são utilizados como um indicativo e não como um teste mutagênico. O teste pode ser realizado com células animais ou vegetais, tanto *in vitro* como *in vivo* (FAIRBAIRN *et al.,* 1995; ANDERSON *et al.,* 1994; SILVA *et al.,* 2003).

Procedimento Experimental

Inicialmente, células de sangue periférico humano (3 X 10^6 células/mL) foram incubadas por 3 h, em tubos falcon, com os compostos acridínicos em diferentes concentrações (2,5 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL). Em seguida, 20 µL da suspensão de células (~10^6 células/mL) foram dissolvidos em 0,75 % de agarose de baixo ponto de fusão e imediatamente espalhada sobre uma lâmina pré-tratada com 1,5 % de agarose de ponto de fusão normal. As células foram, então, colocadas em solução de lise por pelo menos 1 h a 4 ºC. Em seguida, as lâminas foram dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese e preenchida com tampão de corrida em pH ~ 13 (HARTMANN; SPEIT, 1997; SINGH; SINGH, 2002). A eletroforese foi conduzida em baixa luminosidade por 20 minutos, usando 14 V e uma corrente de 12 mA (0,5 V/cm). Após a corrida eletroforética, as lâminas foram retiradas e mergulhadas na solução de neutralização por 5 minutos. As células foram contadas

em microscópio de fluorescência após coloração com brometo de etídeo. A análise foi realizada de acordo com o padrão de escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa (BURLINSON *et al.*, 2007; HARTMANN; SPEIT, 1997; TICE *et al.,* 2000). Foram contados 50 cometas/lâmina e classificados, de acordo com a percentagem de DNA na cauda do cometa, indicando o grau de quebra do DNA, de acordo com a **figura 12**. Onde, 0 = sem danos (<5%), 1 = baixo nível de danos (5-20%), 2 = médio nível de danos (20-40%), 3 = alto nível de danos (40-95%) e 4 = dano total (95%). A doxorrubicina (0,3 µg/mL) e a amsacrina (0,3 µg/mL) foram usadas como controle positivo e o controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO) utilizado para dissolver as substâncias, o qual foi mantido abaixo de 1%.

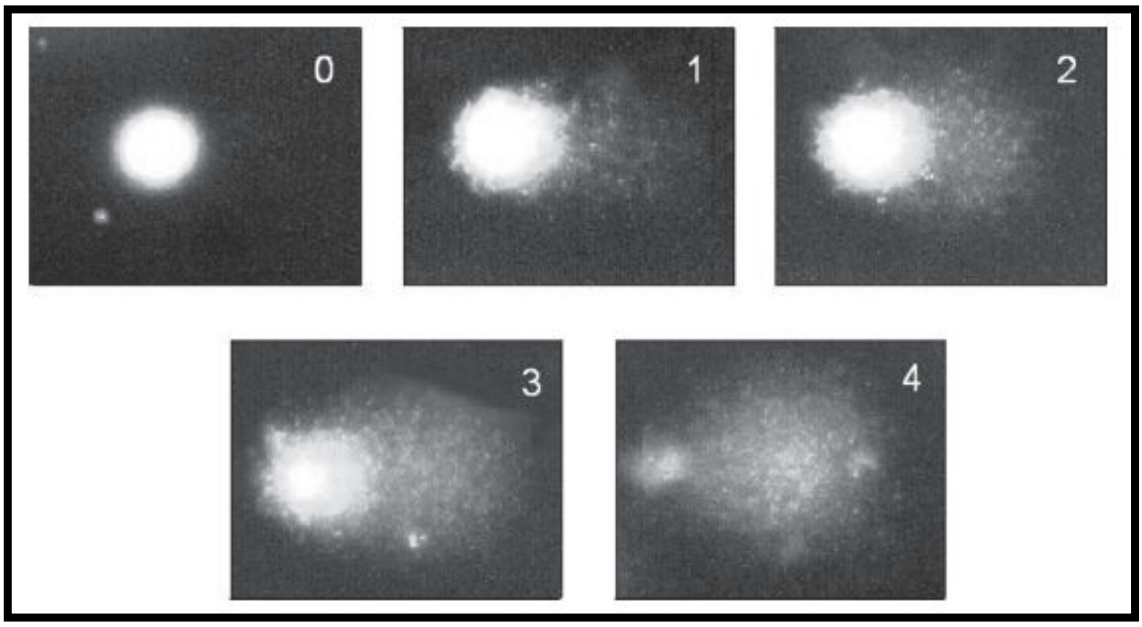


Figura 12 - Padrão de dano ao DNA para o ensaio cometa
Fonte: Collins (2004).

Análise dos dados

Foi calculado o índice (ID) de dano no DNA, o qual foi obtido pela seguinte fórmula: ID = 400 - ∑ Escores. Os dados foram analisados a partir da média ± E.P.M. de 3 experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença

significativa entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p<0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da atividade citotóxica e hemolítica dos compostos acridínicos

A avaliação da citotoxicidade dos compostos acridínicos foi realizada pelo teste do MTT, para as células tumorais humanas, e pelo teste do alamar blue, para CMSPH, após 72 horas de incubação.

A análise do *screening* inicial (**Tabela 4**) demonstrou que dentre os 22 novos compostos sintéticos testados, 4 apresentaram percentual de inibição do crescimento celular (%IC) maior que 90 %, em pelo menos uma linhagem tumoral utilizada.

Esses compostos foram: AC4, 5-(acridin-9-il-metileno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona; AC7, 5-(acridin-9-il-metileno)-3-(4-bromo-benzil)-tiazolidina-2,4-diona; AC10, 5-(acridin-9-il-metileno)-3-(4-cloro-benzil)-tiazolidina-2,4-diona; e AC23, 5-(acridin-9-il-metileno)-3-(4-flúor-benzil)-tiazolidina-2,4-diona). O %IC do composto AC4 em SF-295, HCT-8 e MDAMB-435 foi de 82,3 ± 2,5 %; 90,7 ± 0,4 % e 54,6 ± 3,4 %, respectivamente. Já o composto AC7, nas mesmas linhagens tumorais, demonstrou %IC de 83,8 ± 0,4 %; 98 ± 0,6 % e 60,2 ± 1,0 % respectivamente. A substância AC10, por sua vez, apresentou %IC de 90,7 ± 2,1 %; 93,9 ± 0,9 % e 47,1 ± 2,6 %, na mesma ordem das linhagens testadas. Por fim, o composto AC23 inibiu o crescimento celular em 92,8 ± 2,8 %; 93,3 ± 3,4 % e 85,4 ± 4,5 % respectivamente.

Em seguida, AC4, AC7, AC10 e AC23 foram selecionados para a determinação de suas CI_{50} (concentração capaz de inibir 50 % do crescimento celular) em um painel de 16 linhagens celulares tumorais humanas de diferentes tipos histológicos. A citotoxicidade das amostras também foi avaliada em células mononucleares de sangue periférico humano (CMSPH), com o intuito de verificar o efeito sobre o crescimento de células saudáveis (**Tabela 5**).

Os resultados indicam que os quatros compostos testados apresentaram maior citotoxicidade em HCT-8 e SF-295, com valores de CI_{50} (IC 95%) variando de 2,3 (1,8-3,0) a 5,3 (4,5-6,3) µg/mL e 2,3 (1,8-2,9) a 3,4 (2,8-4,1) µg/mL, respectivamente. Por outro lado, os compostos não foram ativos (> 25 µg/mL) contra

leucemias (HL-60, K-562 e CEM) e carcinoma de mama (HS-578-T, MX-1 e MDAMB-231). Não havendo diferença entres os mesmos.

Em células mononucleares de sangue periférico humano (CMSPH), o valor de CI_{50} encontrado para todos os compostos acridínicos testados foi de > 25 µg/mL. Doxorrubicina e amsacrina, usadas como controle positivo, apresentaram elevada citotoxicidade em todas as linhagens celulares testadas com CI_{50} (IC 95%) variando de 0,002 (0,001-0,004) a 1,8 (1,0-1,9) µg/mL e 0,03 (0,01-0,09) a 8,5 (6,8-9,9), respectivamente.

Em relação ao teste hemolítico utilizando eritrócitos de camundongos Swiss (*Mus musculus*), os novos compostos acridínicos não foram capazes de causar lise das hemácias nas concetrações testadas até 200 µg/mL.

A partir dos dados de citotoxicidade, a linhagem tumoral HCT-8 (cólon humano) foi escolhida como modelo para a continuidade do estudo, por ter apresentado quimioseletividade frente aos compostos testados. As concentrações utilizadas no decorrer do estudo foram 2,5 µg/mL; 5 µg/mL e 10 µg/mL, com base na CI_{50} identificada para HCT-8. Por sua vez, os controles positivos, doxorrubicina e amsacrina, foram testados na concentração de 0,3 µg/mL.

Tabela 4 - Atividade citotóxica dos compostos acridínicos em 3 linhagens tumorais humanas (SF-295, glioblastoma; HCT-8, cólon; MDAM-435, melanoma) pelo teste do MTT em concentração única de 25 µg/mL, após 72 h de incubação.

Substância	SF-295		HCT-8		MDAMB-435	
	%IC	DP	%IC	DP	%IC	DP
AC4	82,35	2,52	90,74	0,41	54,57	3,38
AC6	62,87	3,34	69,76	5,49	30,34	3,19
AC7	83,82	0,44	98,04	0,57	60,18	1,04
AC8	40,98	4,29	57,81	2,05	14,39	4,94
AC10	90,73	2,14	93,87	0,90	47,12	2,60
AC12	6,30	7,94	17,58	10,58	4,60	5,40
AC15	45,57	15,44	71,96	4,02	40,46	1,24
AC16	41,70	9,83	68,31	7,21	39,35	2,80
AC23	92,82	2,84	93,35	3,44	85,42	4,49
AC25	60,86	5,55	83,15	0,82	42,25	8,32
AC26	0,55	3,85	2,80	13,61	0,00	5,66
AC27	36,84	7,38	34,34	4,10	19,36	1,17
AC28	20,30	1,64	26,11	5,74	0,00	0,39
AC30	0,00	0,82	7,67	0,98	8,88	4,29
AC34	41,87	1,01	54,51	2,95	21,47	4,81
AC99	53,29	1,89	44,95	1,39	10,90	0,00
AC100	44,91	2,90	46,39	1,64	22,67	3,51
AC109	24,85	2,40	62,92	11,56	11,45	3,12
AC119	65,77	1,13	62,86	1,15	49,79	0,65
AC124	18,47	2,33	12,77	0,82	0,00	0,52
AC128	25,16	2,21	13,35	5,74	27,59	3,19
AC129	67,64	2,14	78,45	0,57	68,95	0,60

A tabela apresenta o percentual de inibição do crescimento celular (%IC) dos compostos acridínicos com seu respectivo desvio padrão (DP) da média referente a dois experimentos independentes realizados em triplicata.

Tabela 5 - Atividade citotóxica dos compostos acridínicos (**AC4**, **AC7**, **AC10** e **AC23**) em linhagens tumorais humanas e em células saudáveis pelo teste do MTT e do alamar blue, após 72h de incubação.

Linhagens	AC4	AC7	AC10	AC23	Amsacrina	Doxorrubicina
	CI_{50} - µg/mL (µM) IC 95 %					
Células tumorais						
HL-60	>25 (60,90)	>25 (52,59)	>25 (58,02)	>25 (60,32)	0,03 (0,08) 0,01-0,09	0,02 (0,03) 0,01-0,02
K-562	>25 (60,90)	>25 (52,59)	>25 (58,02)	>25 (60,32)	n.d.*	0,14 (0,24) 0,09-0,22
CEM	>25 (60,90)	>25 (52,59)	>25 (58,02)	>25 (60,32)	n.d.	0,02 (0,03) 0,01-0,02
HCT-8	3,04 (7,41) 2,41-3,81	5,29 (11,13) 4,47-6,26	3,58 (8,31) 2,98-4,3	2,33 (5,62) 1,82-2,99	0,10 (0,25) 0,03-0,32	0,04 (0,07) 0,03-0,05
HCT-15	11,96 (29,14) 7,52-19,04	9,41 (19,80) 4,91-18,03	9,27 (21,51) 6,56-13,10	24,03 (57,98) 13,38-43,17	0,12 (0,31) 0.09-1.69	0,20 (0,37) 0,15-0,27
SW-620	11,00 (26,80) 6,71-18,04	16,86 (35,47) 11,24-23,27	8,67 (20,12) 5,75-13,08	12,95 (31,25) 7,17-19,37	0,13 (0,33) 0,09-0,20	0,28 (0,52) 0,18-0,44
COLO-205	19,05 (46,41) 8,58-42,30	>25 (52,59)	2,73 (6,34) 1,80-4,13	9,52 (22,97) 5,52-16,40	0,44 (1,12) 0,39-2,04	0,89 (1,64) 0,17-1,12
HS-578-T	>25 (60,90)	n.d.	>25 (58,02)	n.d.	n.d.	0,01 (0,02) 0,01-0,02
MX-1	>25 (60,90)	n.d.	>25 (58,02)	n.d.	n.d.	0,002 (0,003) 0,001-0,004
MDAMB-231	>25 (60,90)	n.d.	>25 (58,02)	n.d.	n.d.	n.d.
PC-3	7,25 (17,66) 5,52-9,52	4,07 (8,56) 2,44-6,78	5,61 (13,02) 3,69-8,52	11,22 (27,07) 6,07-20,75	1,28 (3,25) 0,51-3,20	0,13 (0,24) 0,09-0,19
DU-145	>25 (60,90)	n.d.	4,08 (9,47) 3,46-4,82	n.d.	0,10 (0,25) 0,06-0,18	0,21 (0,39) 0,07-0,61
SF-295	3,2 (7,79) 2,59-3,98	3,41 (7,17) 2,83-4,1	2,51 (5,82) 1,76-2,83	2,32 (5,60) 1,82-2,95	0,18 (0,46) 0,08-0,43	0,16 (0,27) 0,13-0,23
OVCAR-8	8,07 (19,66) 5,56-11,70	17,68 (37,19) 13,39-23,35	2,46 (5,71) 1,75-3,46	3,86 (9,31) 2,63-5,67	0,53 (1,35) 0,30-0,94	1,36 (2,50) 0,98-1,89
UACC-62	8,64 (21,05) 5,29-14,11	24,10 (50,70) 17,84-32,56	12,51 (29,03) 8,35-18,74	3,92 (9,46) 2,74-5,60	n.d.	n.d.
MDAMB-435	6,4 (15,59) 4,98-8,22	12,31 (25,90) 10,2-14,86	9,55 (22,16) 7,7-11,84	5,84 (14,09) 4,86-7,01	n.d.	0,47 (0,81) 0,34-0,65
Células saudáveis						
CMSPH	>25 (60,90)	>25 (52,59)	>25 (58,02)	>25 (60,32)	8,53 (21,68) 6,83-9,88	0,97 (1,78) 0,52-1,80

A tabela apresenta os valores de CI_{50} (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular) em µg/mL (µM) e o intervalo de confiança de 95% (IC 95%). Os dados foram obtidos de três experimentos independentes realizados em duplicata pelo teste do MTT. O resultado para CMSPH (células mononucleadas de sangue periférico humano) foi obtido pelo teste do alamar blue. Amsacrina e doxorrubicina foram usadas como controle positivo. * n.d. = não determinado.

4.2 Avaliação da viabilidade de células HCT-8 após tratamento com os compostos acridínicos

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste do azul de tripan e por citometria de fluxo após 12 e 24 horas de incubação com os compostos acridínicos.

A análise da viabilidade pelo teste do azul de tripan demonstrou que AC4, AC7, AC10 e AC23, após 12 horas de incubação, não foram capazes de alterar a viabilidade celular nas concentrações testadas (**Figura 13**). Entretanto, após 24 horas de exposição, ocorreu uma redução significativa ($P < 0,05$) do número de células viáveis para todos os compostos principalmente nas concentrações de 5 e 10 μg/mL. As amostras AC4, AC10, AC7 e AC23, na concentração de 2,5 μg/mL, promoveram redução da viabilidade celular em 57 %, 4 % (não significante), 32 % e 31 %, respectivamente. Na concentração de 2,5 μg/mL, o composto AC7 não foi capaz de alterar a viabilidade celular. Na concentração de 5 μg/mL, todos os compostos diminuíram significativamente o número de células viáveis em 81 %, 43 %, 60 % e 64 % para AC4, AC7, AC10 e AC23, respectivamente. Já na concentração de 10 μg/mL das mesmas amostras, a redução observada foi de 83 %, 78 %, 59 % e 86 %. Doxorrubicina e amsacrina, na concentração de 0,3 μg/mL, promoveram redução da viabilidade celular em 55 % e 70 %, respectivamente (**Figura 14**).

Na análise da viabilidade pela citometria de fluxo, foram consideradas viáveis as células com padrão morfológico de volume e granulosidade normais (Observar gráfico **A** da **figura 32**). Após 12 horas de incubação, os compostos acridínicos foram capazes de reduzir de maneira significante ($P < 0,05$) a viabilidade celular em todas as concentrações testadas. Na concentração de 2,5 μg/mL, AC4, AC7, AC10 e AC23 reduziram o número de células viáveis em 34 %, 21 %, 34 % e 23 %, respectivamente. Na concentração de 5 μg/mL, a redução observada para os mesmos compostos foi de 35 %, 22 %, 41 % e 15 %. Na concentração de 10 μg/mL, as amostras diminuíram a viabilidade celular em 34 %, 19 %, 28 % e 15 %, respectivamente (**Figura 15**).

Após 24 horas de tratamento com os compostos acridínicos, a redução da viabilidade também foi significante ($P < 0,05$) nas concentrações testadas e de forma

mais intensa. Na concentração de 2,5 μg/mL, as substâncias AC4, AC7, AC10 e AC23 reduziram o número de células viáveis em 56 %, 47 %, 33 % e 24 %, respectivamente. Na presença de 5 μg/mL das mesmas substâncias, a redução observada foi de 72 %, 42 %, 36 % e 40 %, nessa ordem. Já na concentração de 10 μg/mL, os compostos diminuíram a viabilidade em 74 %, 44 %, 45 % e 43 %, respectivamente. Doxorrubicina (0,3 μg/mL) e amsacrina (0,3 μg/mL) reduziram a viabilidade celular em 32 % e 14 %, no tempo de exposição de 12 horas, e em 51 % e 49 %, no tempo de exposição de 24 horas, respectivamente (**Figura 16**).

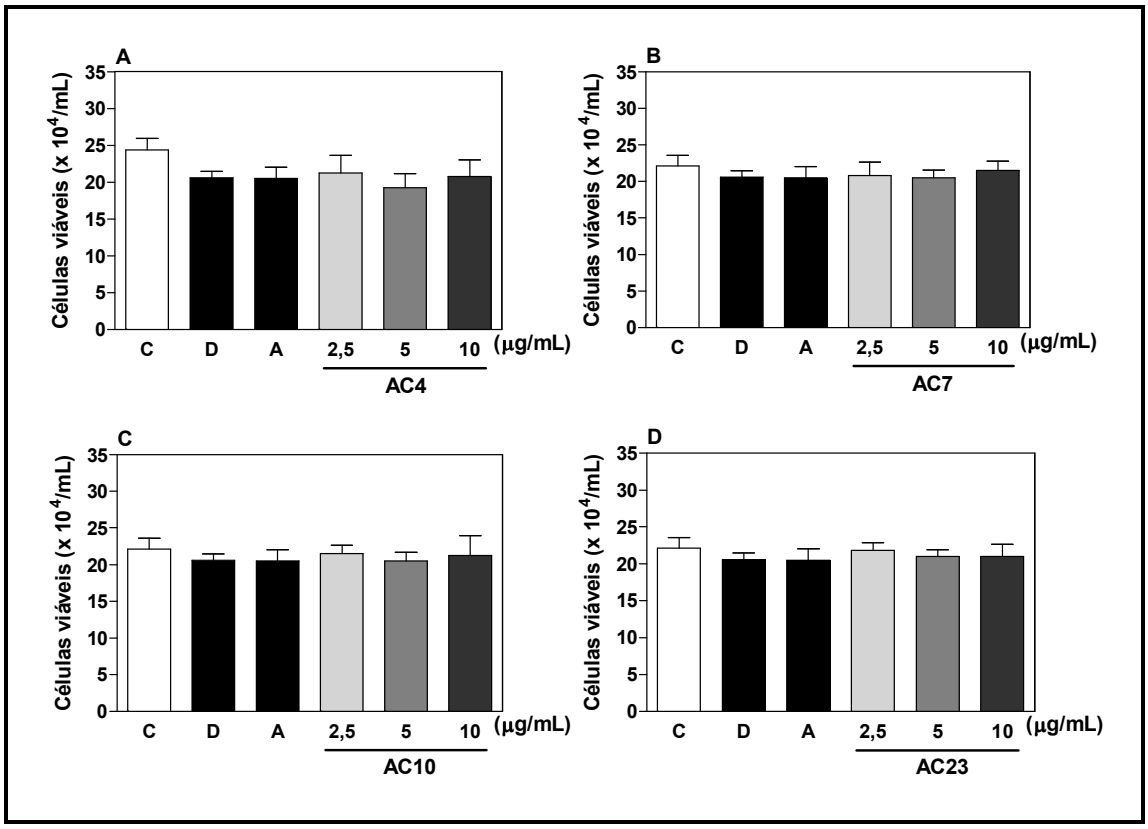


Figura 13 - Efeito dos compostos acridínicos (AC4 – **A**, AC7 – **B**, AC10 – **C** e AC23 – **D**) sobre a proliferação de células HCT-8 determinado pelo teste do azul de tripan, após **12** horas de incubação.

Controle negativo, doxorrubicina e amsacrina estão representados por C, D e A, respectivamente. Os gráficos apresentam os valores correspondentes à média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. *, $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls.

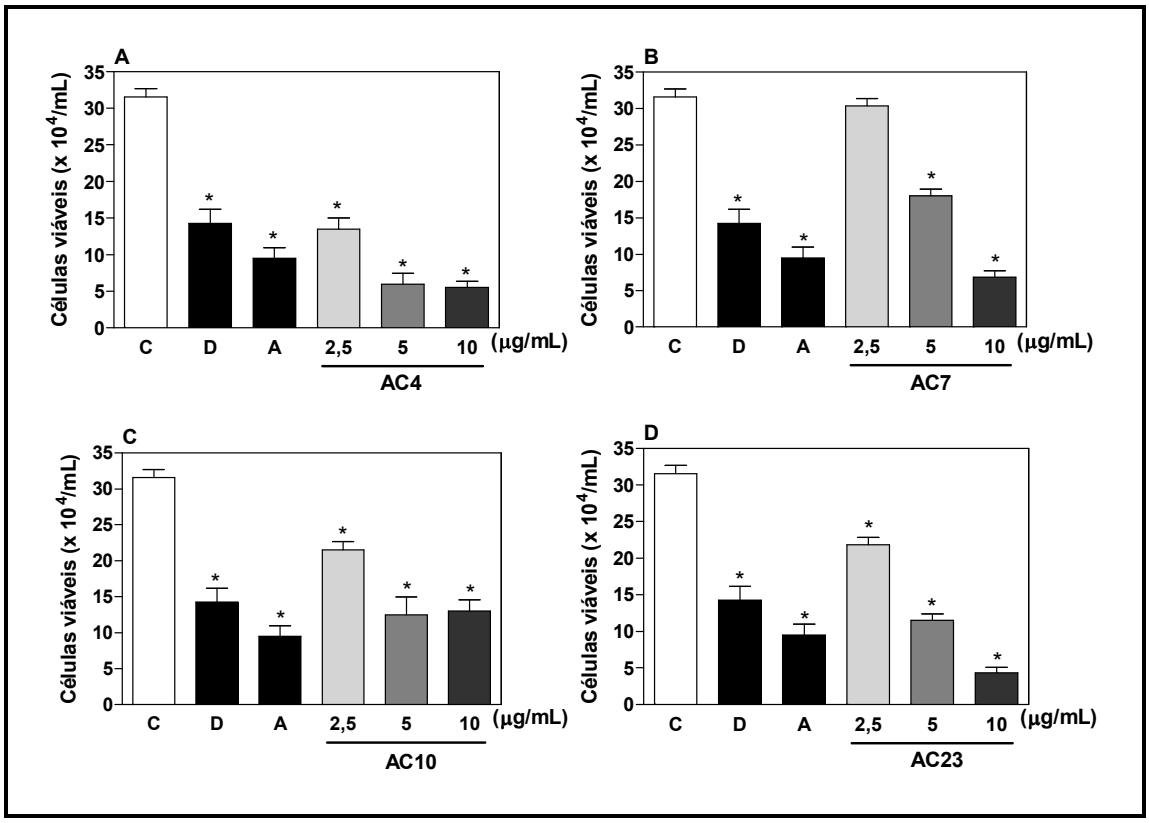


Figura 14 - Efeito dos compostos acridínicos (AC4 – **A**, AC7 – **B**, AC10 – **C** e AC23 – **D**) sobre a proliferação de células HCT-8 determinado pelo teste do azul de tripan, após **24** horas de incubação.

Controle negativo, doxorrubicina e amsacrina estão representados por C, D e A, respectivamente. Os gráficos apresentam os valores correspondentes à média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. *, $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls.

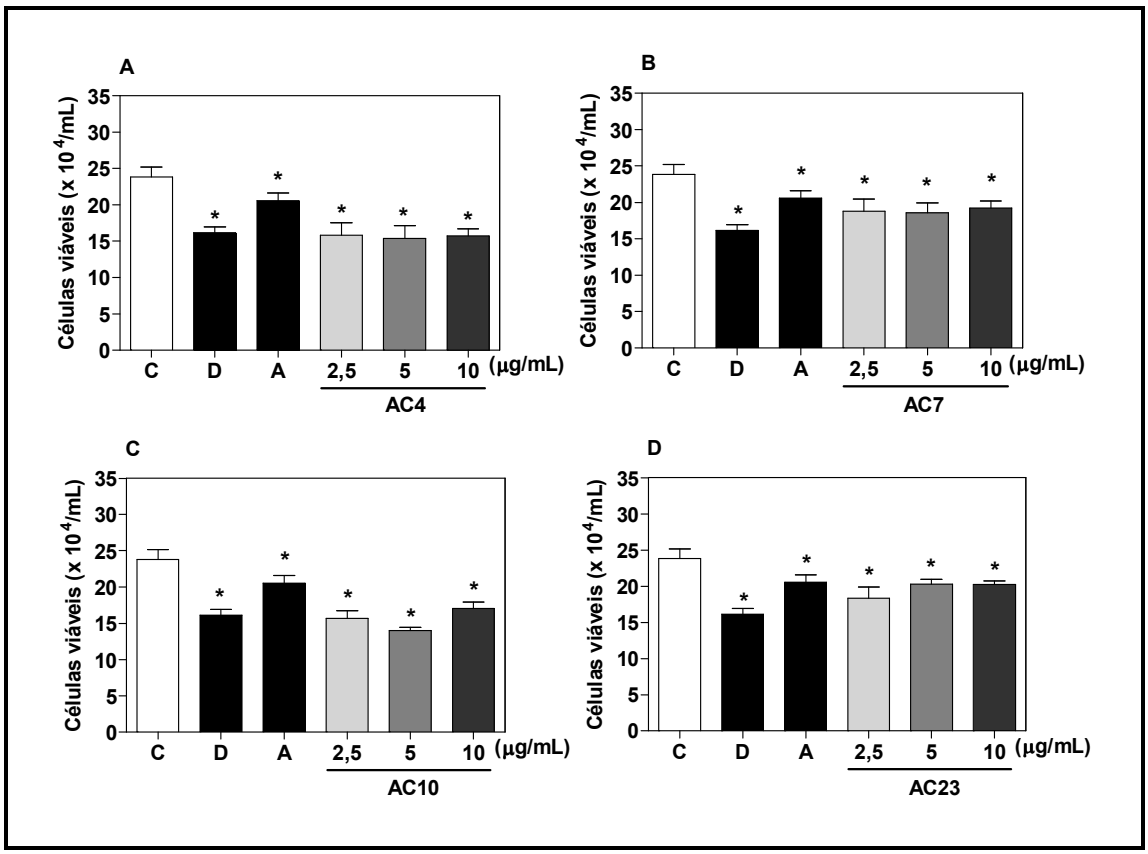


Figura 15 - Efeito dos compostos acridínicos (AC4 – **A**, AC7 – **B**, AC10 – **C** e AC23 – **D**) sobre a proliferação de células HCT-8 determinado por citometria de fluxo, após **12** horas de incubação.

Controle negativo, doxorrubicina e amsacrina estão representados por C, D e A, respectivamente. Os gráficos apresentam os valores correspondentes à média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. *, $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls.

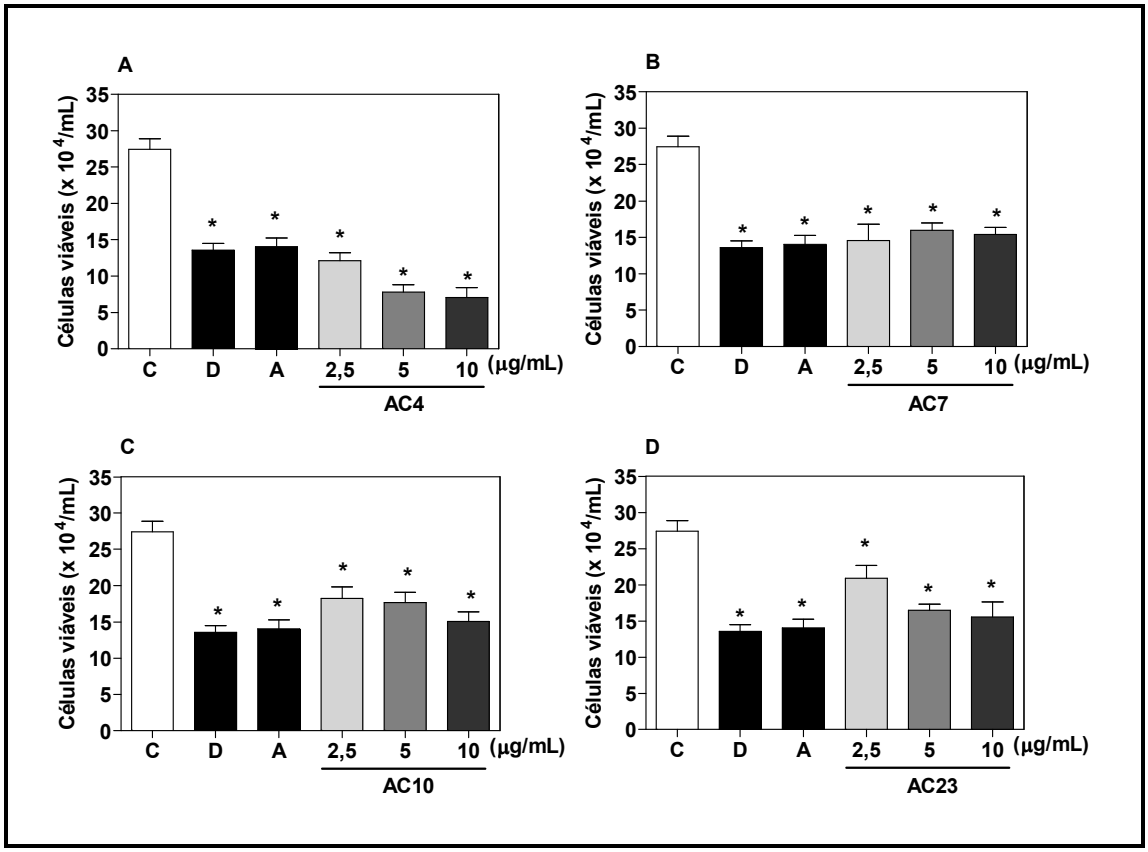


Figura 16 - Efeito dos compostos acridínicos (AC4 – **A**, AC7 – **B**, AC10 – **C** e AC23 – **D**) sobre a proliferação de células HCT-8 determinado por citometria de fluxo, após **24** horas de incubação.

Controle negativo, doxorrubicina e amsacrina estão representados por C, D e A, respectivamente. Os gráficos apresentam os valores correspondentes à média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. *, $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls.

4.3 Avaliação do efeito dos compostos acridínicos sobre a síntese de DNA em células HCT-8

O efeito dos compostos acridínicos sobre a síntese de DNA em células HCT-8 foi avaliado pelo ensaio do BrdU após 24 h de tratamento. A capacidade proliferativa das células foi determinada pela incorporação de BrdU no DNA, a qual foi expressa em percentual de células BrdU positivas.

As substâncias testadas reduziram de forma significativa ($P < 0,05$) o número de células BrdU positivas em todas as concentrações (2,5 ; 5 e 10 µg/mL). Na concentração de 2,5 µg/mL, os compostos acridínicos AC4, AC7, AC10 e AC23 inibiram a síntese de DNA em 19 %, 13,7 %, 27 % e 31 %, respectivamente. Na concentração de 5 µg/mL, a inibição para os mesmos compostos foi de 59,9 %, 50,2 %, 72,7 % e 60,7 %, respectivamente. Na concentração de 10 µg/mL, o efeito inibitório determinado foi de 96 %, 85,2 %, 86 % e 79,1 %, respectivamente. Doxorrubicina e amsacrina, na concentração de 0,3 µg/mL, inibiram a síntese de DNA em 44,2 % e 53,4 %, respectivamente (**Figura 17**).

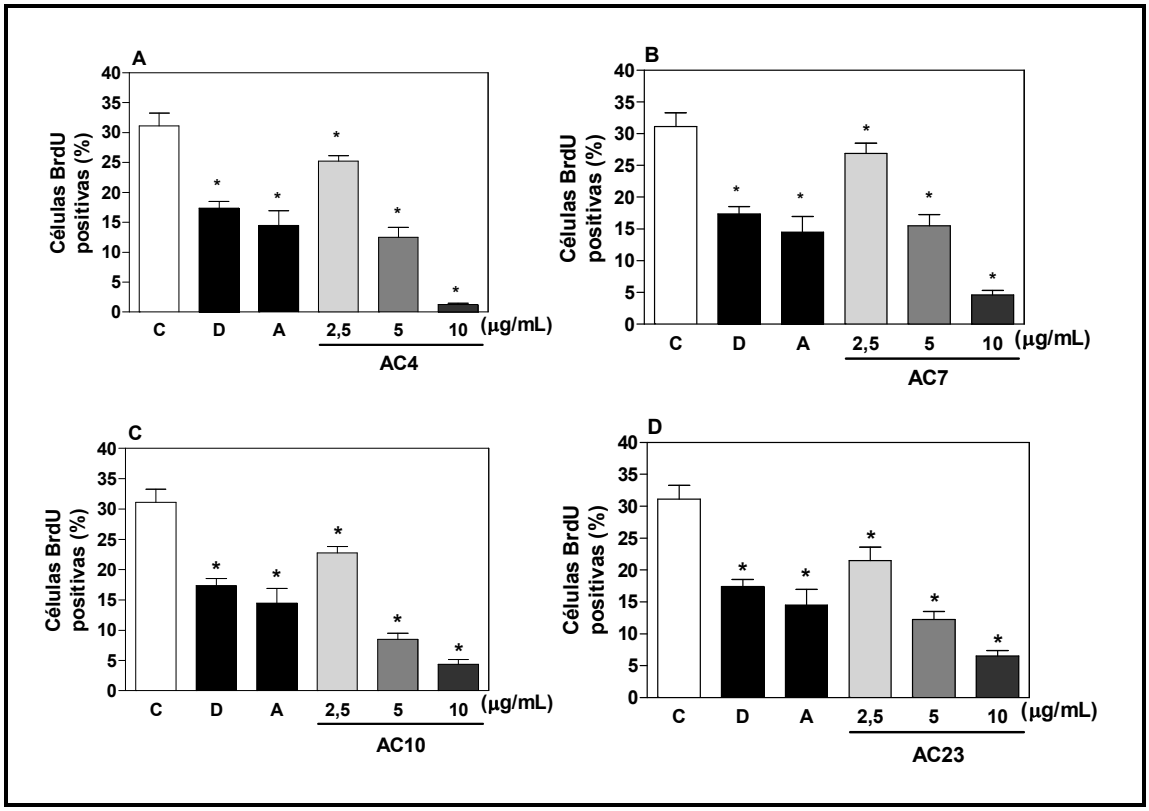


Figura 17 - Efeito dos compostos acridínicos (AC4 – **A**, AC7 – **B**, AC10 – **C** e AC23 – **D**) sobre a síntese de DNA de células HCT-8 determinado pelo ensaio do BrdU, após **24** horas de incubação.

O controle negativo, doxorrubicina e amsacrina estão representados por C, D e A, respectivamente. Os gráficos apresentam os valores correspondentes à média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. *, $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls.

4.4 Avaliação da morfologia de células HCT-8 após tratamento com os compostos acridínicos

A morfologia de células HCT-8 foi avaliada por métodos de coloração (hematoxilina/eosina e brometo de etídeo/acridina laranja) e por citometria de fluxo após 12 e 24 horas de incubação com os compostos acridínicos.

A análise morfológica da coloração com hematoxilina/eosina permitiu observar que as células não-tratadas, tanto em 12 como em 24 horas, apresentaram núcleos volumosos e citoplasma homogêneo. Já as células tratadas com os compostos acridínicos exibiram redução do volume celular (⟶), formação de blebb (⋯⋯▸), corpo apoptótico (— ▸), fragmentação do DNA nuclear (– –▸) e alguns restos celulares (– · ▸), característicos de morte celular por indução de apoptose. Os efeitos foram mais intensos com o aumento da concentração testada (2,5; 5 e 10 μg/mL) e do tempo de exposição às amostras (12 e 24 horas). Doxorrubicina e amsacrina, na concentração de 0,3 μg/mL, promoveram alterações morfológicas típicas de apoptose apenas no tempo de 24 horas (**Figuras 18-25**).

Na análise morfológica por microscopia de fluorescência utilizando os corantes brometo de etídeo/laranja de acridina, foi possível observar um aumento significativo ($P < 0,05$) de células apoptóticas, após 12 horas de incubação, apenas na concentração de 10 μg/mL para todos os compostos acridínicos testados. O percentual de células apoptóticas encontrado nessa concentração para AC4, AC7, AC10 e AC23 foi de 10,7 ± 1,6 %; 12 ± 2,2 %; 10,2 ± 1,7 % e 10,7 ± 1,9 %; respectivamente. Após 24 horas de exposição, a indução de apoptose ocorreu de maneira significativa nas concentrações de 5 e 10 μg/mL. Na concentração de 5 μg/mL, o número de células apoptóticas encontrado para AC4, AC7, AC10 e AC23 foi de 7,9 ± 3,8 %; 12,4 ± 0,5 %; 9,7 ± 3,7 % e 13,4 ± 1,1 %; respectivamente. Na concentração de 10 μg/mL, obedecendo a mesma ordem das substâncias, os valores de células apoptóticas foram de 14,8 ± 3,6 %; 19,8 ± 1,9 %; 18,7 ± 3,7 % e 19,8 ± 1,9 %. O aumento de células apoptóticas foi acompanhado de redução significativa ($P < 0,05$) do número de células viáveis. Além disso, não houve alteração significativa no número de células necróticas em nenhuma das amostras testadas. Doxorrubicina e amsacrina induziram morte por apoptose apenas no

tempo de 24 horas. O controle negativo apresentou ocasionais células apoptóticas e raras células necróticas (**Figuras 26-29**).

Na avaliação da integridade da membrana citoplasmática por citometria de fluxo foi observado que após 12 horas de incubação e apenas na concentração de 10 µg/mL houve redução significativa ($P < 0,05$) para todos os compostos testados (**Figura 30**). Após 24 horas de tratamento, a integridade da membrana citoplasmática foi diminuída, também de forma significante ($P < 0,05$), nas concentrações de 5 µg/mL e 10 µg/mL (**Figuras 31**). Por outro lado, doxorrubicina e amsacrina não foram capazes de alterar a integridade da membrana citoplasmática.

A complementação do estudo morfológico foi estabelecida pela análise do volume e da granulosidade celular por citometria de fluxo. A análise qualitativa do resultado foi feita a partir de gráficos de dispersão representativos dos eventos celulares. Após 12 horas de incubação com os compostos acridínicos em diferentes concentrações (2,5; 5 e 10 µg/mL), foi observado um aumento gradual do número de células com padrão apoptótico (menor volume, FSC, e menor granulosidade, SSC) quando comparado com o controle negativo (**Figuras 32, 34, 36 e 38**). Após 24 horas de tratamento, ocorreu um aumento ainda maior da população de células apoptóticas para os mesmos compostos (**Figura 33, 35, 37 e 39**). O tratamento com doxorrubicina e amsacrina, também apresentou padrão celular típico de apoptose.

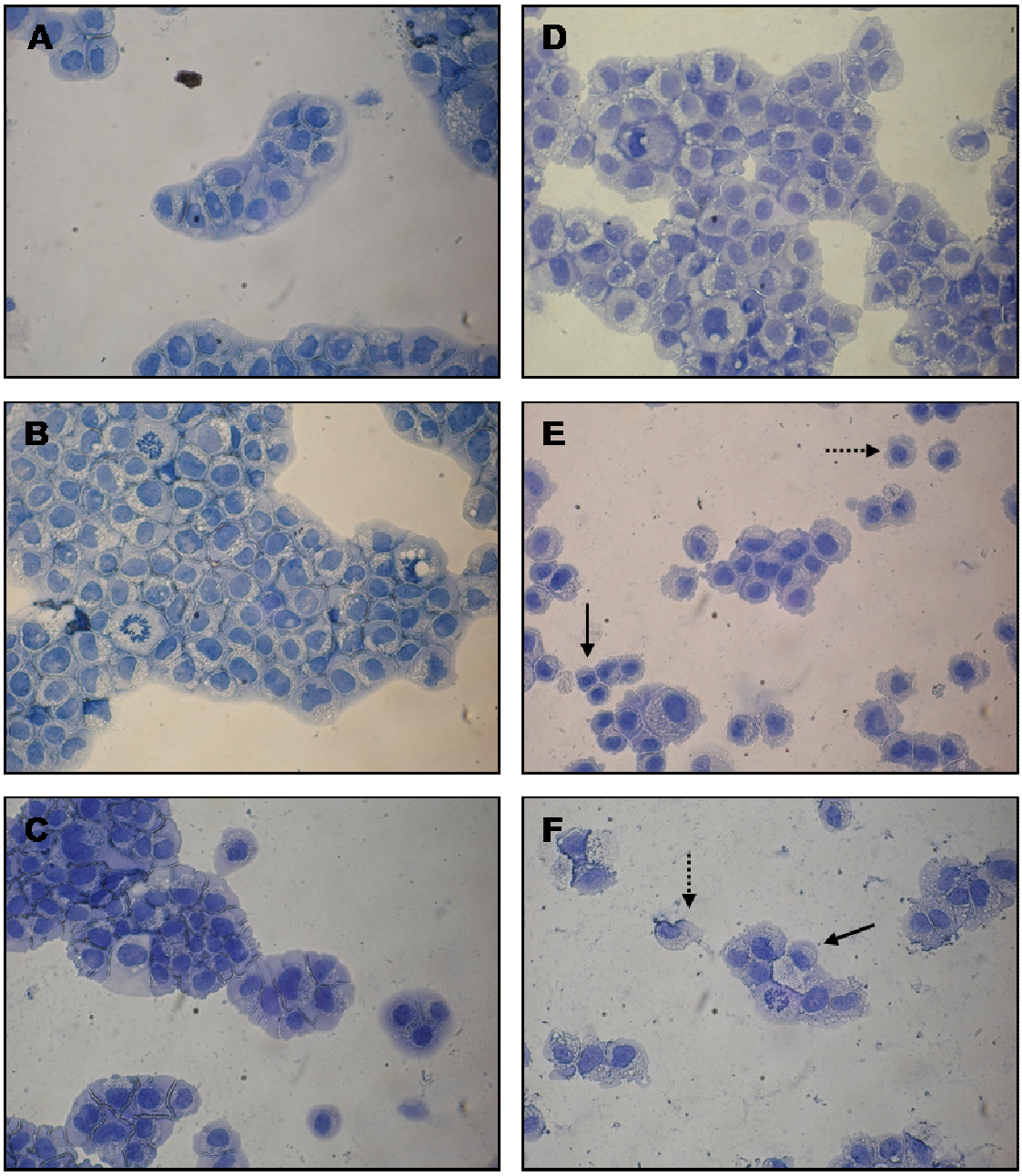


Figura 18 - Efeito do composto acridínico **AC4** (2,5 µg/mL, **D** – 5 µg/mL, **E** - 10 µg/mL, **F**) sobre a morfologia de células HCT-8 determinado por coloração diferencial por Hematoxilina/Eosina, após **12** horas de incubação.

O controle negativo, a doxorrubicina e a amsacrina estão representados nos quadros (**A**), (**B**) e (**C**), respectivamente. As lâminas foram analisadas por microscopia óptica (x400). As setas indicam os aspectos apoptóticos observados: redução do volume (⟶), formação de *blebb* (⋯▸), corpo apoptótico (—▸), fragmentação nuclear (– –▸) e restos celulares (– · ▸).

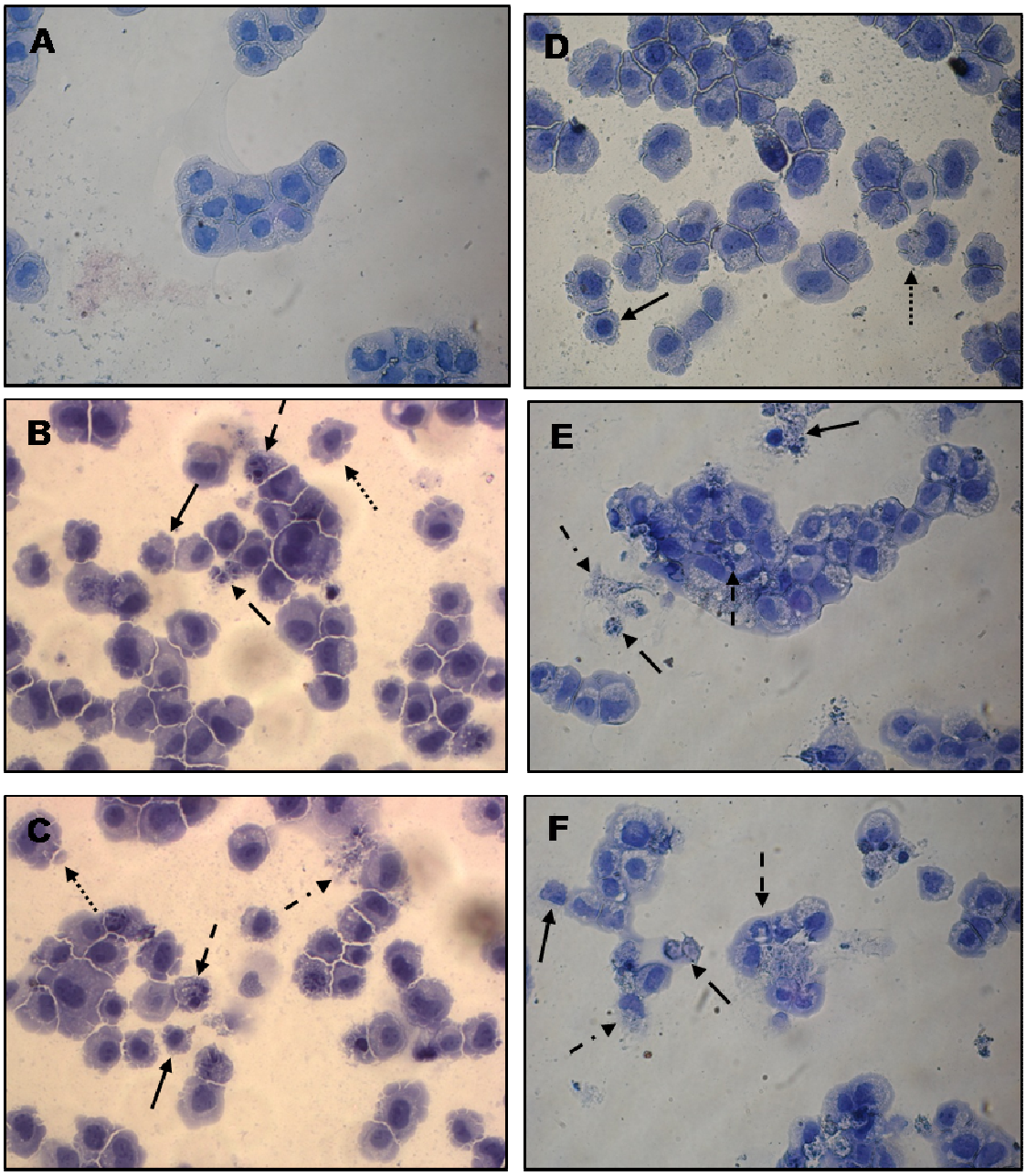


Figura 19 - Efeito do composto acridínico **AC4** (2,5 µg/mL, **D** – 5 µg/mL, **E** - 10 µg/mL, **F**) sobre a morfologia de células HCT-8 determinado por coloração diferencial por Hematoxilina/Eosina, após **24** horas de incubação.

O controle negativo, a doxorrubicina e a amsacrina estão representados nos quadros (**A**), (**B**) e (**C**), respectivamente. As lâminas foram analisadas por microscopia óptica (x400). As setas indicam os aspectos apoptóticos observados: redução do volume (⟶), formação de *blebb* (⋯⋯▸), corpo apoptótico (—▸), fragmentação nuclear (– –▸) e restos celulares (– · ▸).

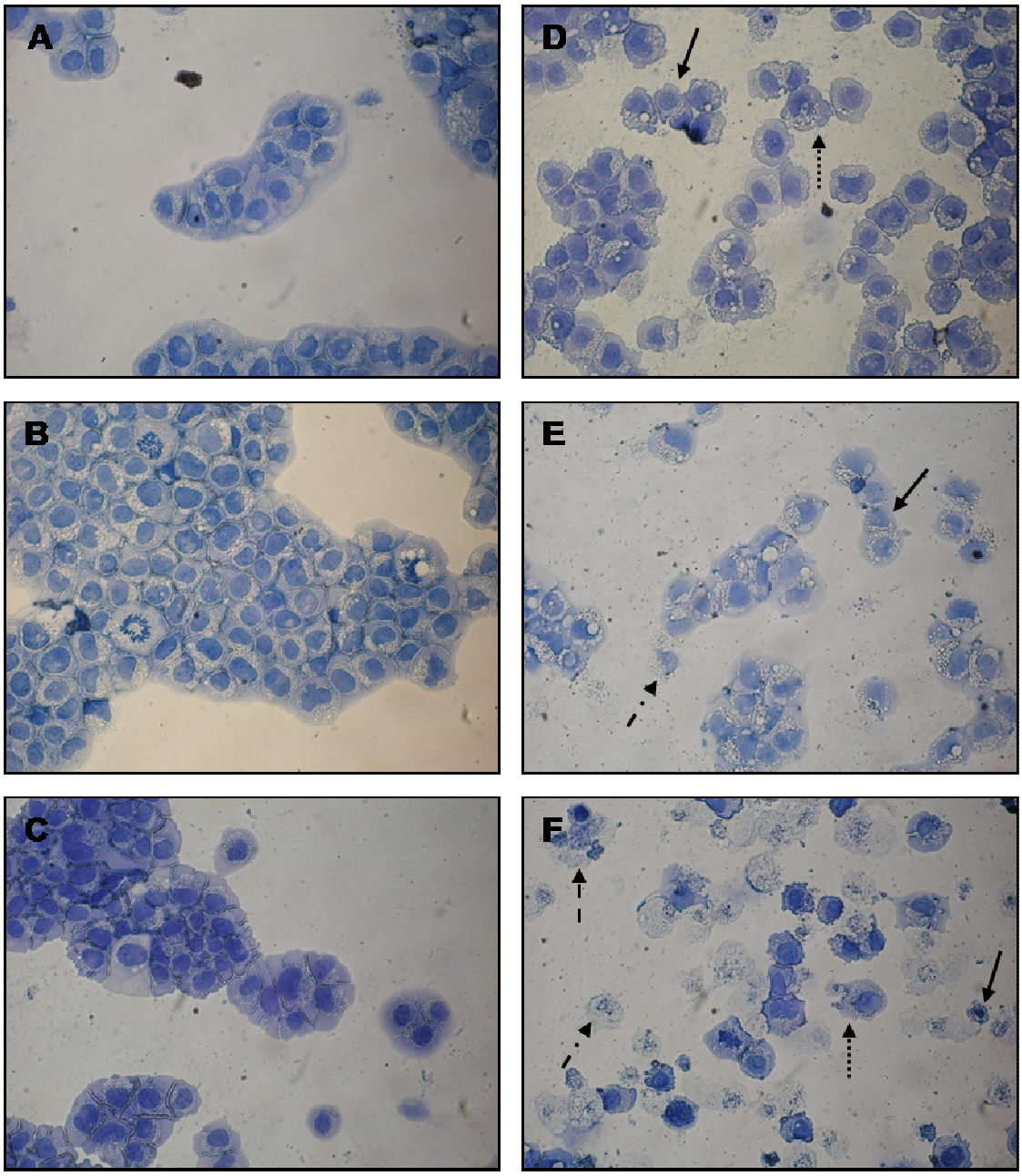


Figura 20 - Efeito do composto acridínico **AC7** (2,5 µg/mL, **D** – 5 µg/mL, **E** - 10 µg/mL, **F**) sobre a morfologia de células HCT-8 determinado por coloração diferencial por Hematoxilina/Eosina, após **12** horas de incubação.

O controle negativo, a doxorrubicina e a amsacrina estão representados nos quadros (**A**), (**B**) e (**C**), respectivamente. As lâminas foram analisadas por microscopia óptica (x400). As setas indicam os aspectos apoptóticos observados: redução do volume (⟶), formação de *blebb* (⋯⋯►), corpo apoptótico (—►), fragmentação nuclear (– –►) e restos celulares (– · ►).

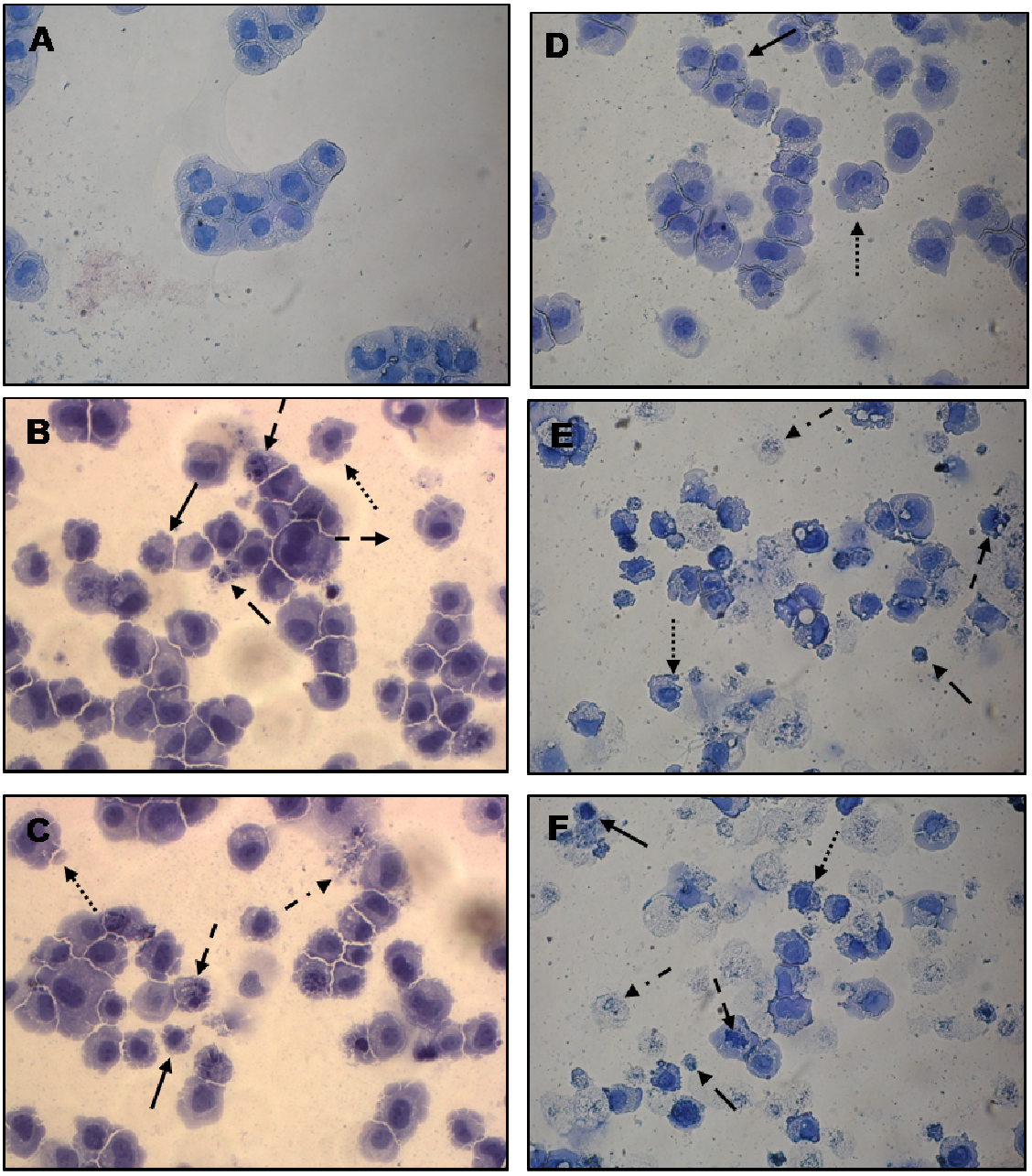


Figura 21 - Efeito do composto acridínico **AC7** (2,5 µg/mL, **D** – 5 µg/mL, **E** - 10 µg/mL, **F**) sobre a morfologia de células HCT-8 determinado por coloração diferencial por Hematoxilina/Eosina, após **24** horas de incubação.

O controle negativo, a doxorrubicina e a amsacrina estão representados nos quadros (**A**), (**B**) e (**C**), respectivamente. As lâminas foram analisadas por microscopia óptica (x400). As setas indicam os aspectos apoptóticos observados: redução do volume (⟶), formação de *blebb* (⋯⟶), corpo apoptótico (—⟶), fragmentação nuclear (– –⟶) e restos celulares (– · ⟶).

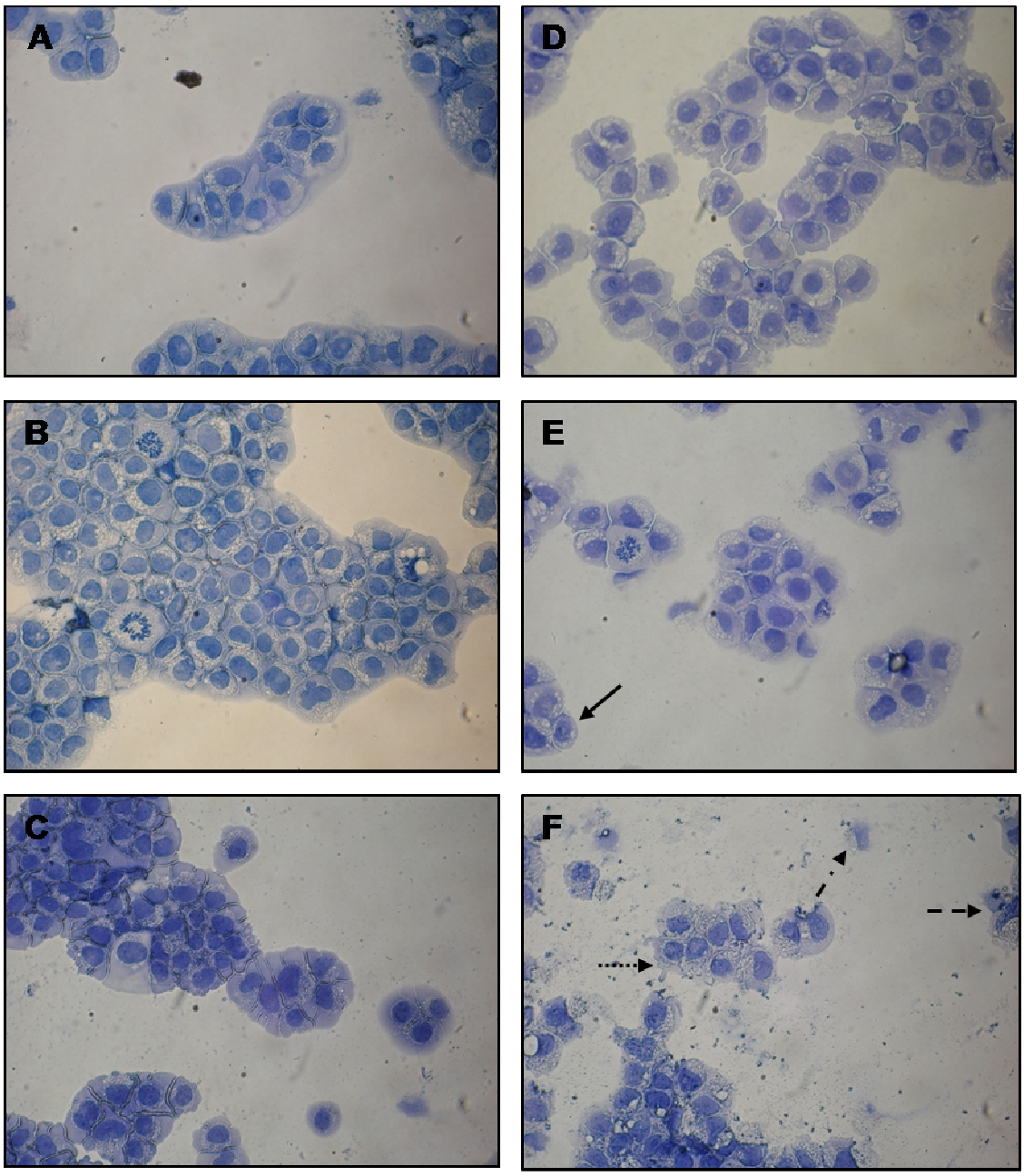


Figura 22 - Efeito do composto acridínico **AC10** (2,5 µg/mL, **D** – 5 µg/mL, **E** - 10 µg/mL, **F**) sobre a morfologia de células HCT-8 determinado por coloração diferencial por Hematoxilina/Eosina, após **12** horas de incubação.

O controle negativo, a doxorrubicina e a amsacrina estão representados nos quadros (**A**), (**B**) e (**C**), respectivamente. As lâminas foram analisadas por microscopia óptica (x400). As setas indicam os aspectos apoptóticos observados: redução do volume (⟶), formação de *blebb* (⋯⟶), corpo apoptótico (—⟶), fragmentação nuclear (– –⟶) e restos celulares (– · ⟶).

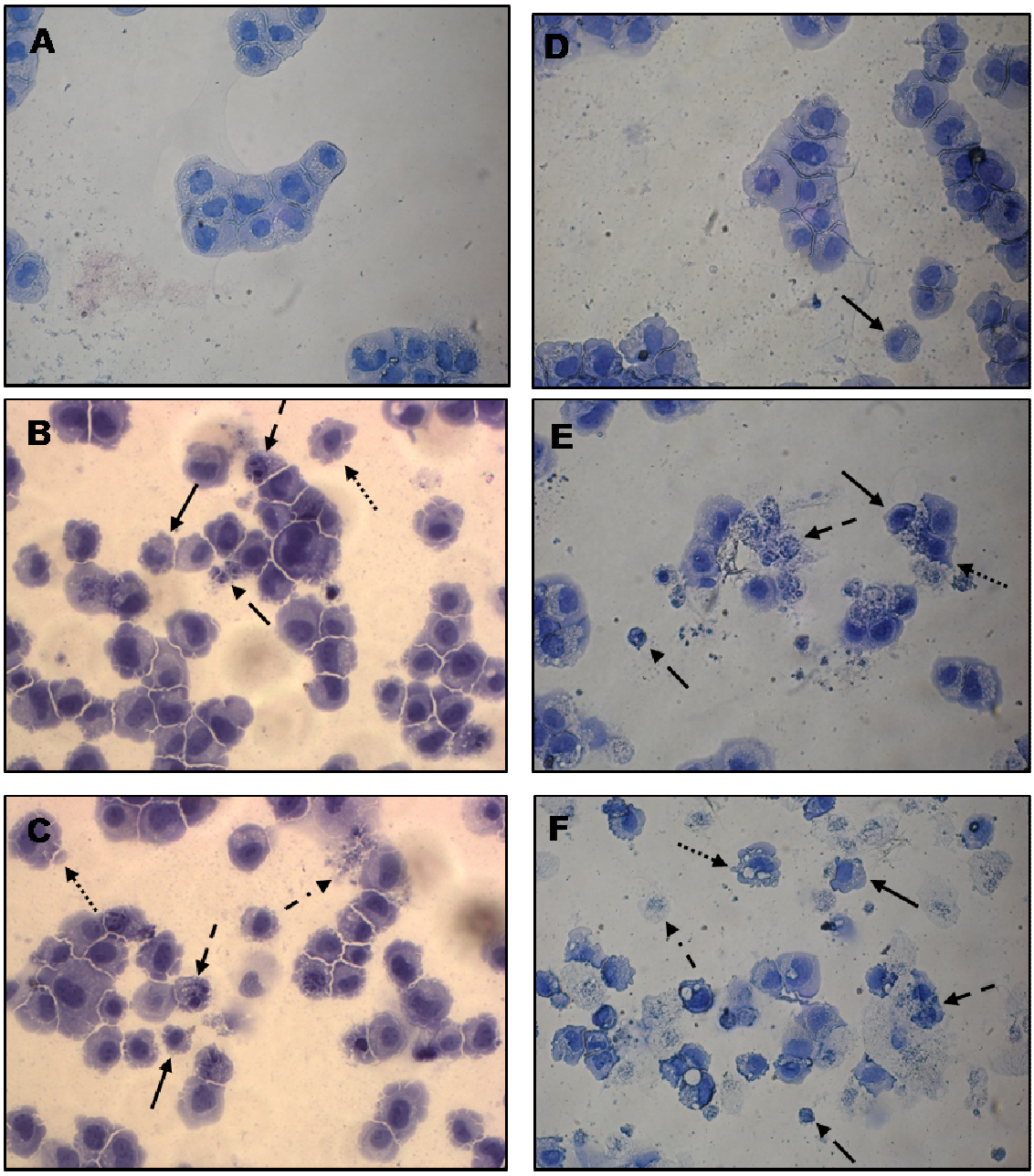


Figura 23 - Efeito do composto acridínico **AC10** (2,5 µg/mL, **D** – 5 µg/mL, **E** - 10 µg/mL, **F**) sobre a morfologia de células HCT-8 determinado por coloração diferencial por Hematoxilina/Eosina, após **24** horas de incubação.

O controle negativo, a doxorrubicina e a amsacrina estão representados nos quadros (**A**), (**B**) e (**C**), respectivamente. As lâminas foram analisadas por microscopia óptica (x400). As setas indicam os aspectos apoptóticos observados: redução do volume (⟶), formação de *blebb* (⋯▸), corpo apoptótico (—▸), fragmentação nuclear (– –▸) e restos celulares (– · ▸).

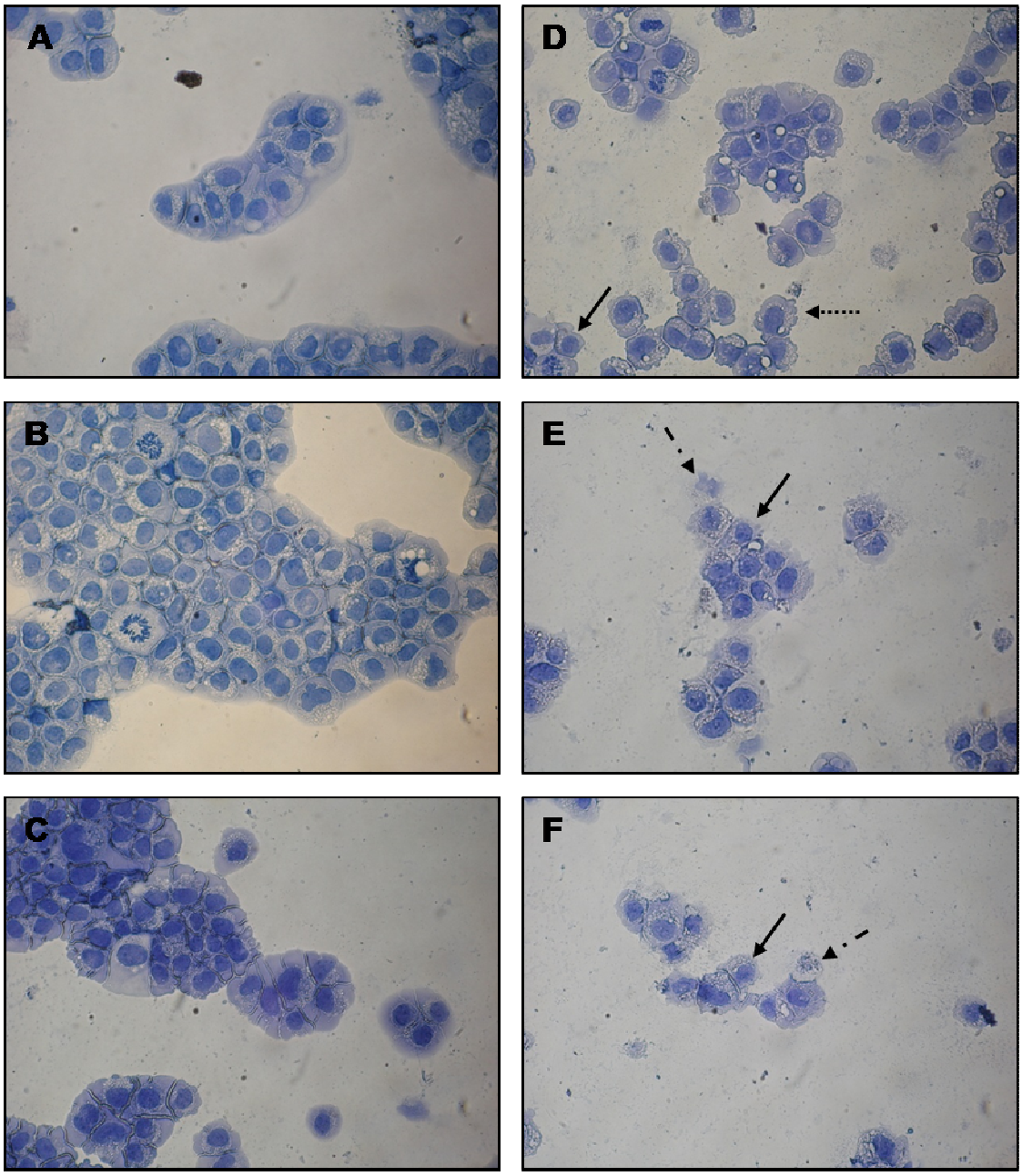


Figura 24 - Efeito do composto acridínico **AC23** (2,5 µg/mL, **D** – 5 µg/mL, **E** - 10 µg/mL, **F**) sobre a morfologia de células HCT-8 determinado por coloração diferencial por Hematoxilina/Eosina, após **12** horas de incubação.

O controle negativo, a doxorrubicina e a amsacrina estão representados nos quadros (**A**), (**B**) e (**C**), respectivamente. As lâminas foram analisadas por microscopia óptica (x400). As setas indicam os aspectos apoptóticos observados: redução do volume (⟶), formação de *blebb* (⋯⋯▸), corpo apoptótico (⟶), fragmentação nuclear (– ⟶) e restos celulares (– · ▸).

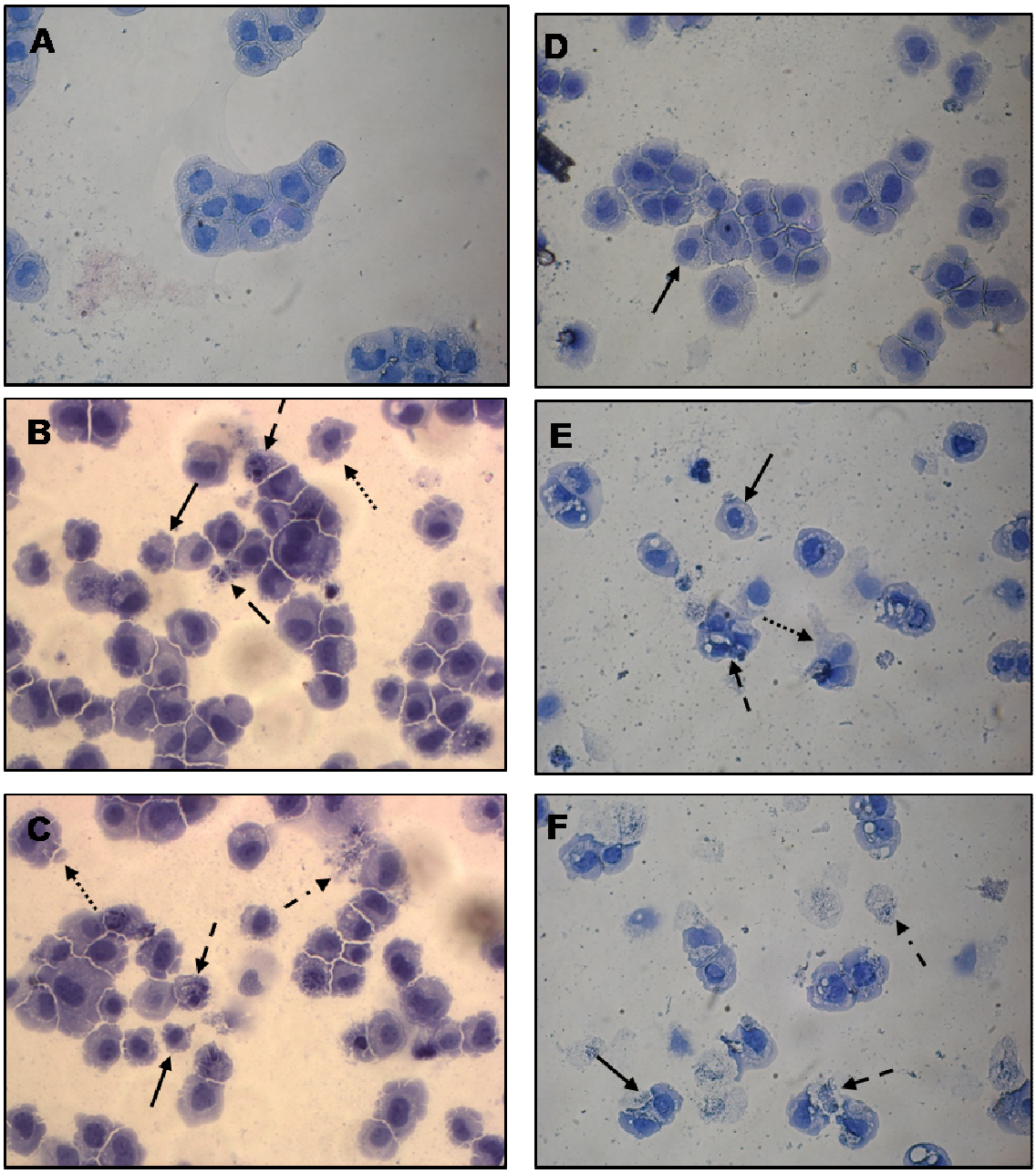


Figura 25 - Efeito do composto acridínico **AC23** (2,5 µg/mL, **D** – 5 µg/mL, **E** - 10 µg/mL, **F**) sobre a morfologia de células HCT-8 determinado por coloração diferencial por Hematoxilina/Eosina, após **24** horas de incubação.

O controle negativo, a doxorrubicina e a amsacrina estão representados nos quadros (**A**), (**B**) e (**C**), respectivamente. As lâminas foram analisadas por microscopia óptica (x400). As setas indicam os aspectos apoptóticos observados: redução do volume (⟶), formação de *blebb* (⋯⋯▸), corpo apoptótico (—), fragmentação nuclear (– –) e restos celulares (– · ▸).

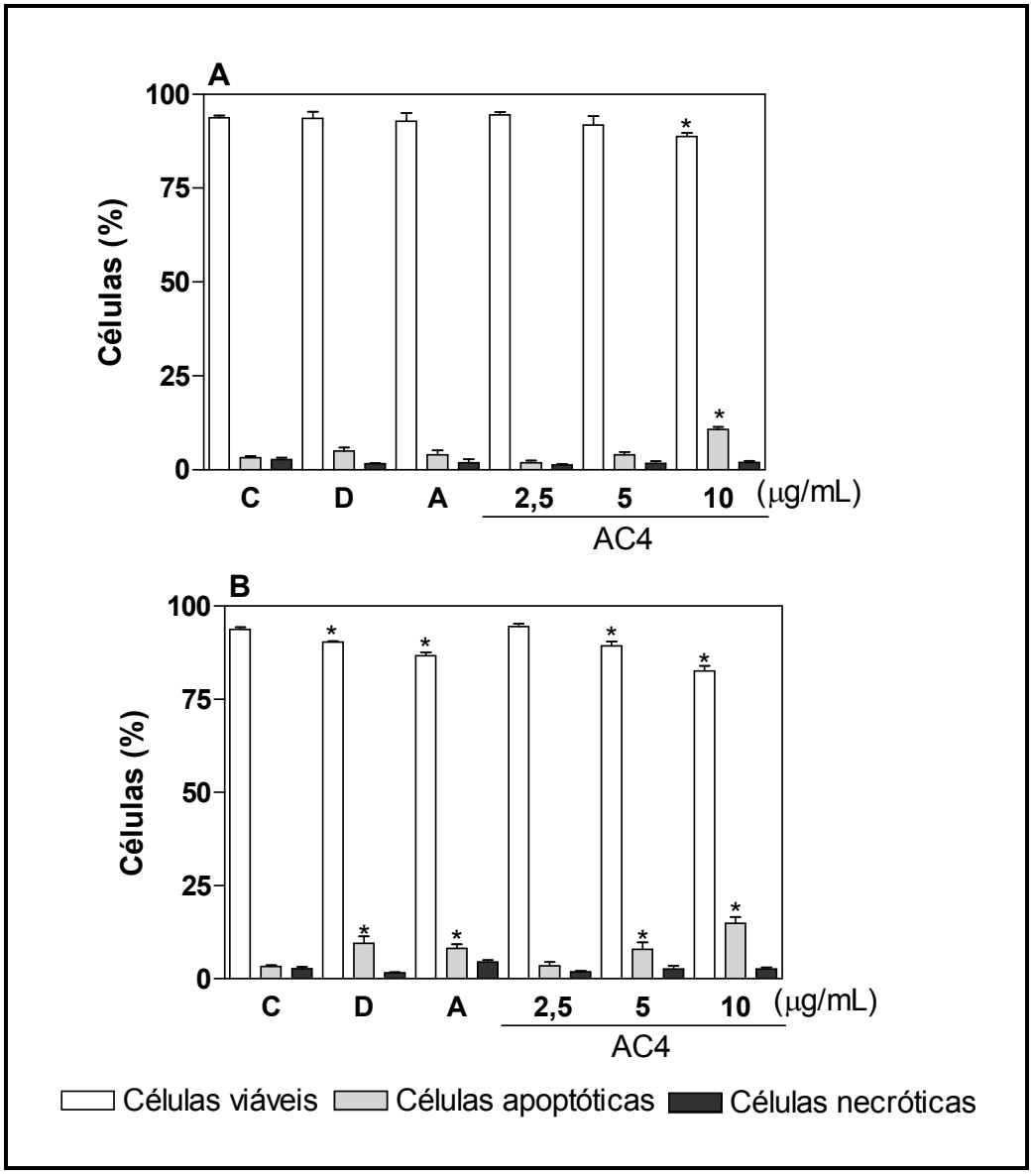


Figura 26 - Efeito do composto acridínico **AC4** sobre a indução de morte celular de células HCT-8 determinado por coloração diferencial com Brometo de Etídio e Laranja de Acridina, após 12 (**A**) e 24 (**B**) horas de incubação.

O controle negativo, a doxorrubicina e a amsacrina estão representados por C, D e A, respectivamente. Os gráficos apresentam os valores correspondentes à média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. *, $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls.

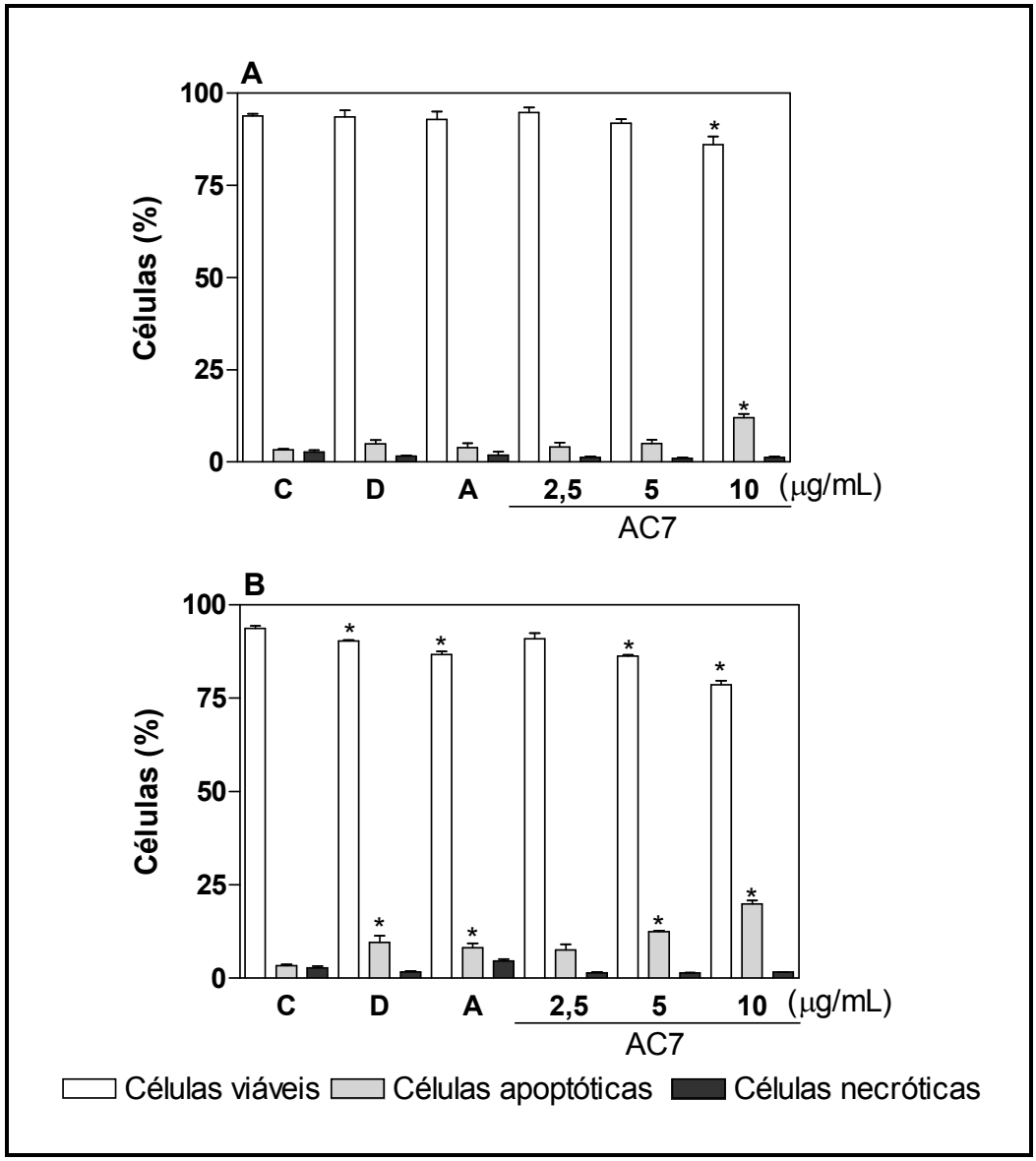


Figura 27 - Efeito do composto acridínico **AC7** sobre a indução de morte celular de células HCT-8 determinado por coloração diferencial com Brometo de Etídio e Laranja de Acridina, após 12 (**A**) e 24 (**B**) horas de incubação.

O controle negativo, a doxorrubicina e a amsacrina estão representados por C, D e A, respectivamente. Os gráficos apresentam os valores correspondentes à média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. *, $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls.

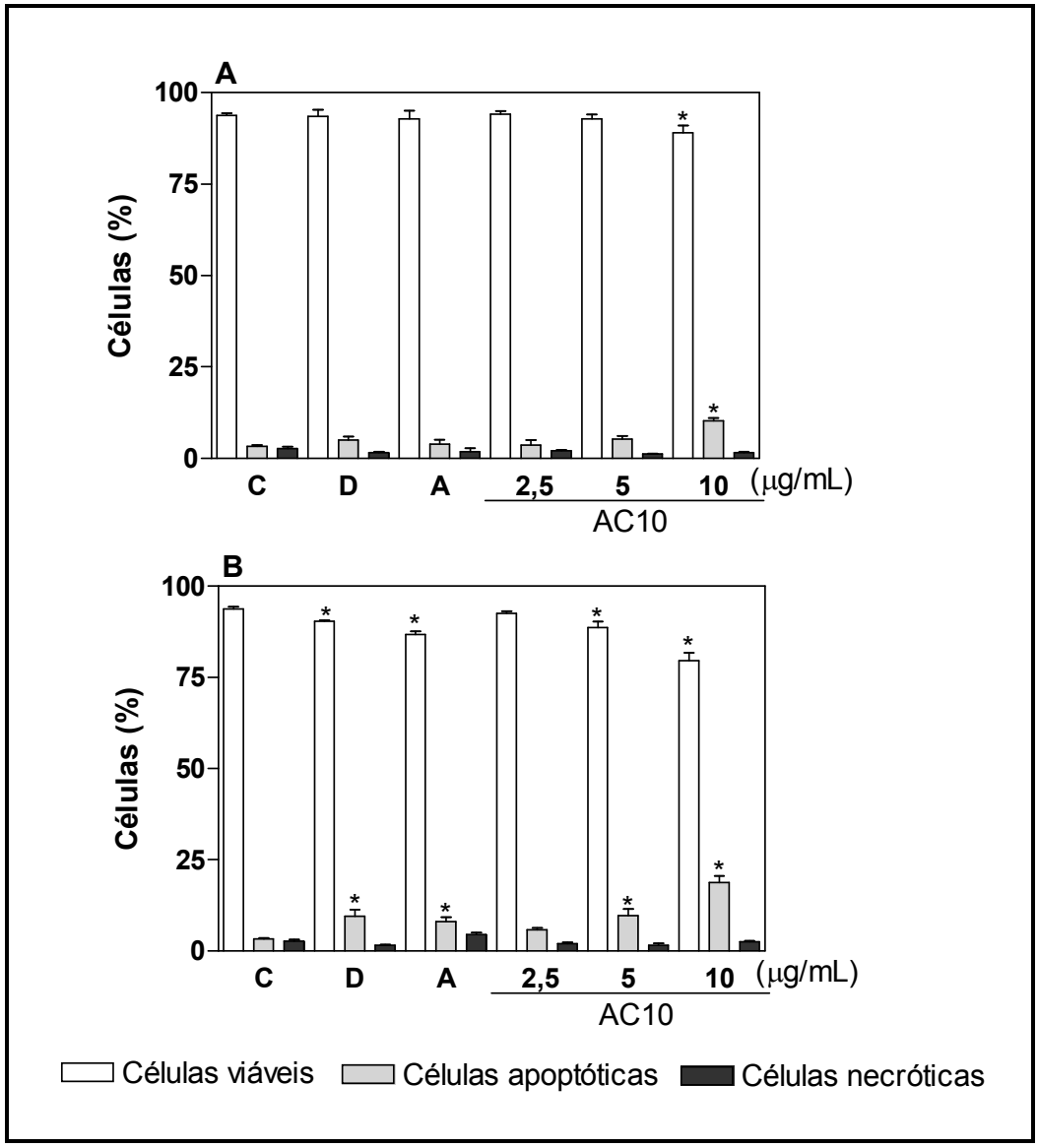


Figura 28 - Efeito do composto acridínico **AC10** sobre a indução de morte celular de células HCT-8 determinado por coloração diferencial com Brometo de Etídio e Laranja de Acridina, após 12 (**A**) e 24 (**B**) horas de incubação.

O controle negativo, a doxorrubicina e a amsacrina estão representados por C, D e A, respectivamente. Os gráficos apresentam os valores correspondentes à média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. *, $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls.

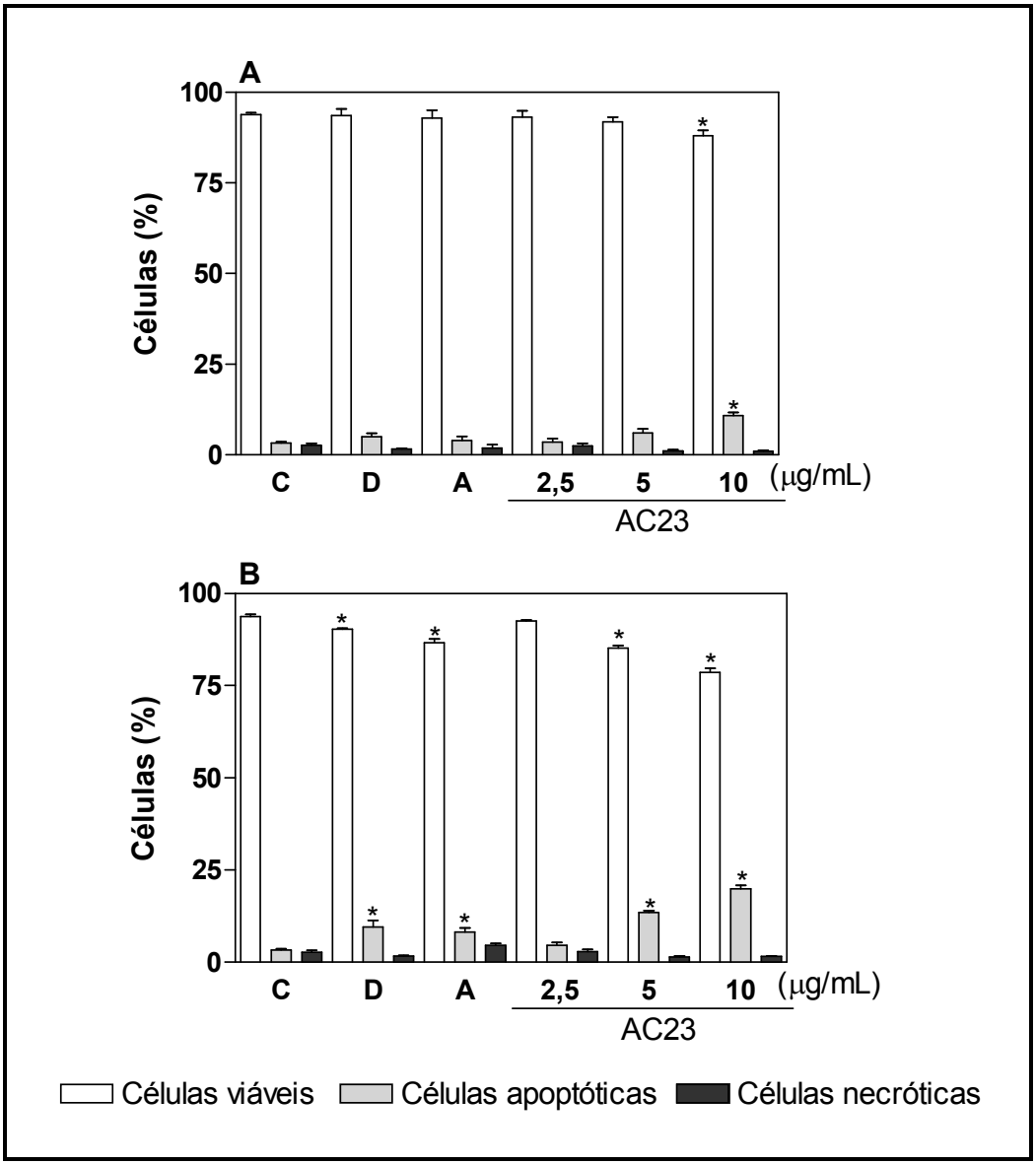


Figura 29 - Efeito do composto acridínico **AC23** sobre a indução de morte celular de células HCT-8 determinado por coloração diferencial com Brometo de Etídio e Laranja de Acridina, após 12 (**A**) e 24 (**B**) horas de incubação.

O controle negativo, a doxorrubicina e a amsacrina estão representados por C, D e A, respectivamente. Os gráficos apresentam os valores correspondentes à média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. *, $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls.

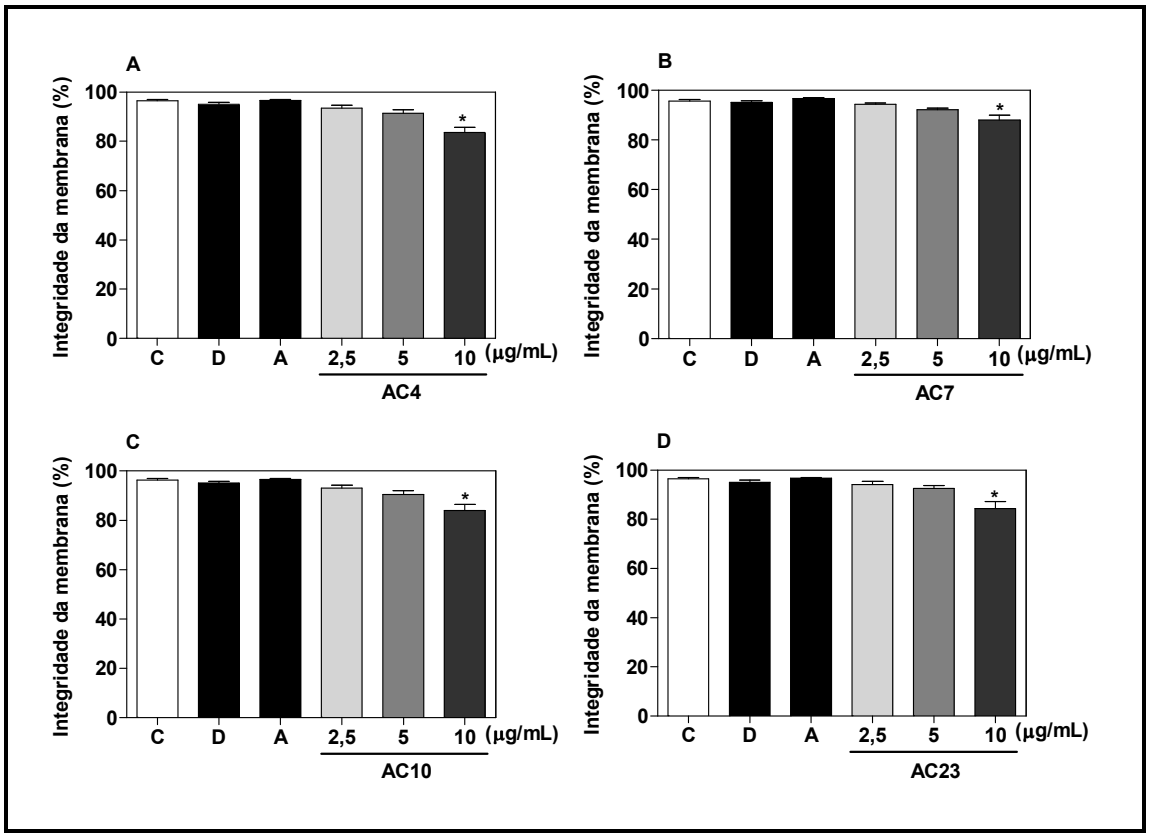


Figura 30 - Efeito dos compostos acridínicos (AC4 – **A**, AC7 – **B**, AC10 – **C** e AC23 – **D**) sobre a integridade da membrana citoplasmática de células HCT-8 determinado por citometria de fluxo usando iodeto de propídeo, após **12** horas de incubação.

Controle negativo, doxorrubicina e amsacrina estão representados por C, D e A, respectivamente. Os gráficos apresentam os valores correspondentes à média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. *, $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls.

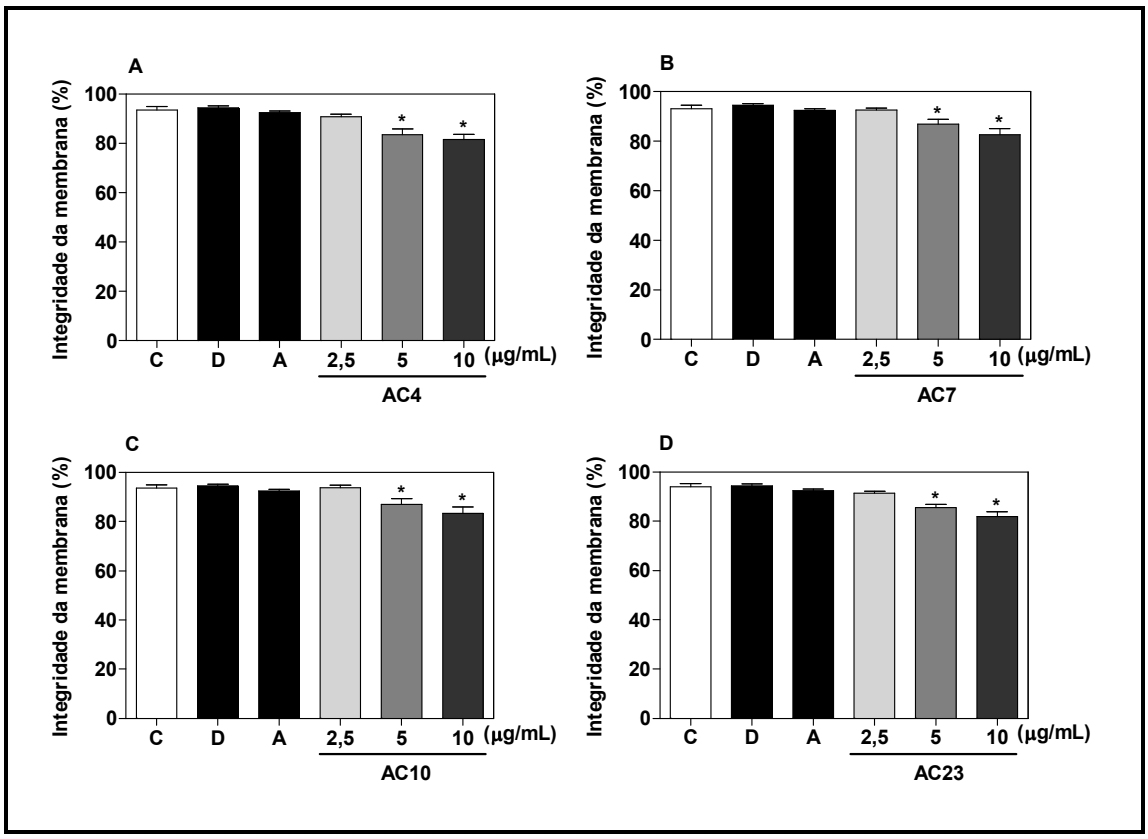


Figura 31 - Efeito dos compostos acridínicos (AC4 – **A**, AC7 – **B**, AC10 – **C** e AC23 – **D**) sobre a integridade da membrana citoplasmática de células HCT-8 determinado por citometria de fluxo usando iodeto de propídeo, após **24** horas de incubação.

Controle negativo, doxorrubicina e amsacrina estão representados por C, D e A, respectivamente. Os gráficos apresentam os valores correspondentes à média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. *, $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls.

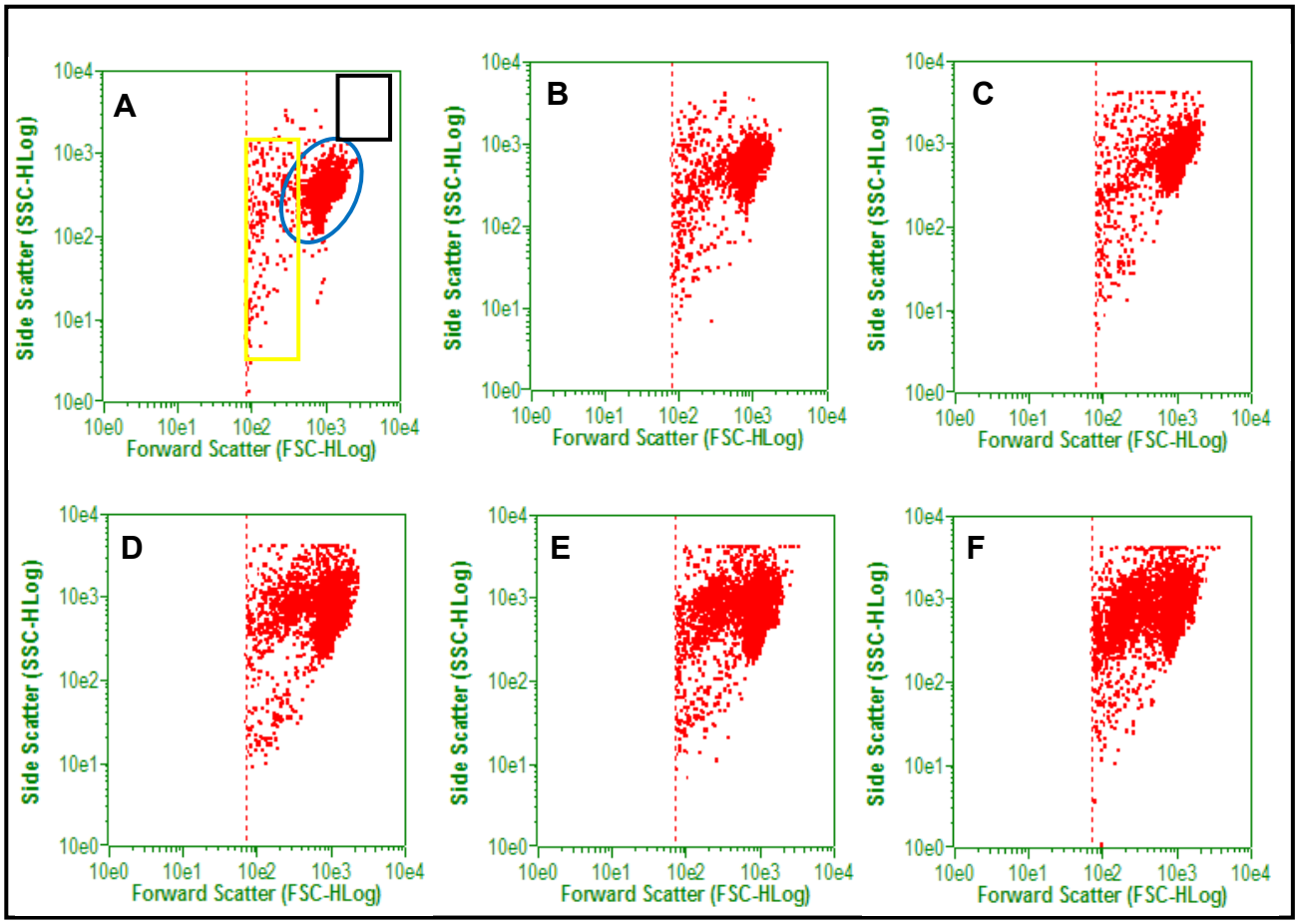


Figura 32 - Efeito do composto acridínico **AC4** (2,5 µg/mL, **D** – 5 µg/mL, **E** - 10 µg/mL, **F**) sobre a morfologia de células HCT-8 determinado por citometria de fluxo usando o FSC (*Forward scatter* - desvio da luz para frente) e SSC (*Side Scatter* - desvio da luz para o lado) como parâmetros de tamanho relativo da célula e granulosidade ou complexidade interna da célula, respectivamente, após **12** horas de incubação.

O controle negativo (**A**) contém a marcação das posições para células viáveis (círculo azul), apoptóticas (retângulo amarelo) e necróticas (retângulo preto). Doxorrubicina e amsacrina estão respresentados nos quadros **(B)** e (**C**). Os resultados são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. Os *debris* celulares foram excluídos das análises. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento.

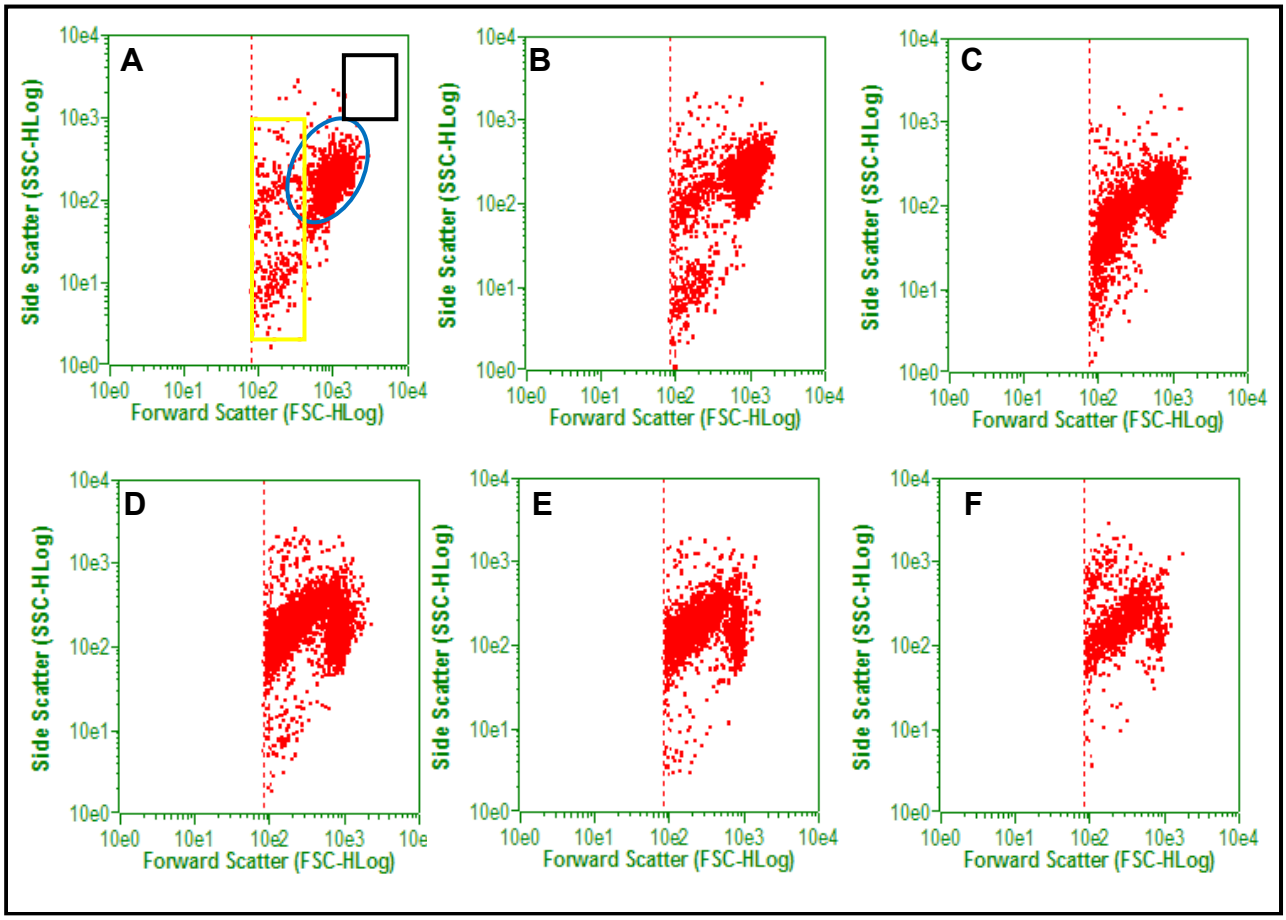


Figura 33 - Efeito do composto acridínico **AC4** (2,5 µg/mL, **D** – 5 µg/mL, **E** - 10 µg/mL, **F**) sobre a morfologia de células HCT-8 determinado por citometria de fluxo usando o FSC (*Forward scatter* - desvio da luz para frente) e SSC (*Side Scatter* - desvio da luz para o lado) como parâmetros de tamanho relativo da célula e granulosidade ou complexidade interna da célula, respectivamente, após **24** horas de incubação.

O controle negativo (**A**) contém a marcação das posições para células viáveis (círculo azul), apoptóticas (retângulo amarelo) e necróticas (retângulo preto). Doxorrubicina e amsacrina estão respresentados nos quadros **(B)** e (**C**). Os resultados são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata Os *debris* celulares foram excluídos das análises. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento.

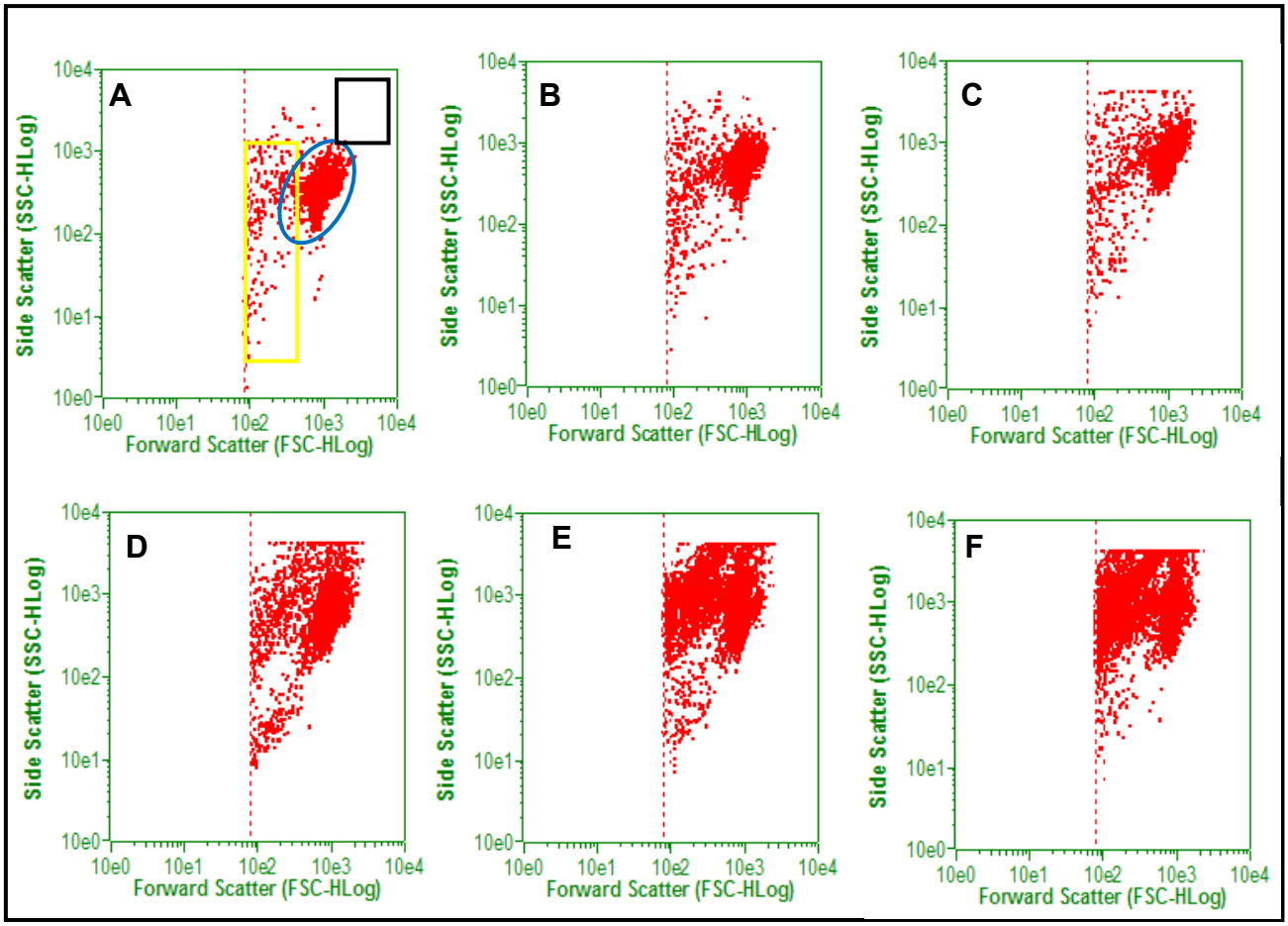


Figura 34 - Efeito do composto acridínico **AC7** (2,5 µg/mL, **D** – 5 µg/mL, **E** - 10 µg/mL, **F**) sobre a morfologia de células HCT-8 determinado por citometria de fluxo usando o FSC (*Forward scatter* - desvio da luz para frente) e SSC (*Side Scatter* - desvio da luz para o lado) como parâmetros de tamanho relativo da célula e granulosidade ou complexidade interna da célula, respectivamente, após **12** horas de incubação.

O controle negativo (**A**) contém a marcação das posições para células viáveis (círculo azul), apoptóticas (retângulo amarelo) e necróticas (retângulo preto). Doxorrubicina e amsacrina estão respresentados nos quadros **(B)** e (**C**). Os resultados são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata Os *debris* celulares foram excluídos das análises. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento.

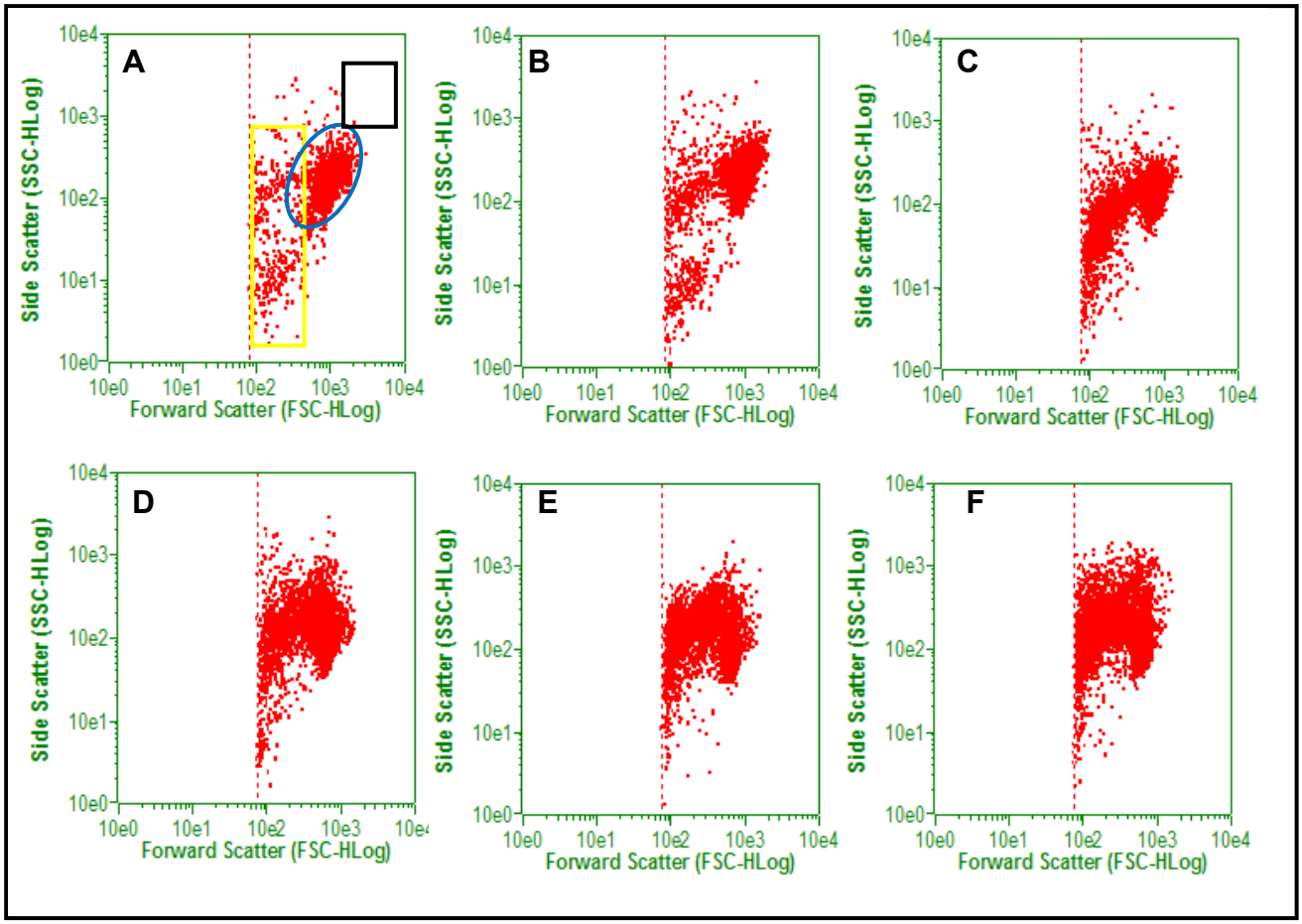


Figura 35 - Efeito do composto acridínico **AC7** (2,5 µg/mL, **D** – 5 µg/mL, **E** - 10 µg/mL, **F**) sobre a morfologia de células HCT-8 determinado por citometria de fluxo usando o FSC (*Forward scatter* - desvio da luz para frente) e SSC (*Side Scatter* - desvio da luz para o lado) como parâmetros de tamanho relativo da célula e granulosidade ou complexidade interna da célula, respectivamente, após **24** horas de incubação.

O controle negativo (**A**) contém a marcação das posições para células viáveis (círculo azul), apoptóticas (retângulo amarelo) e necróticas (retângulo preto). Doxorrubicina e amsacrina estão respresentados nos quadros **(B)** e (**C**). Os resultados são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata Os *debris* celulares foram excluídos das análises. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento.

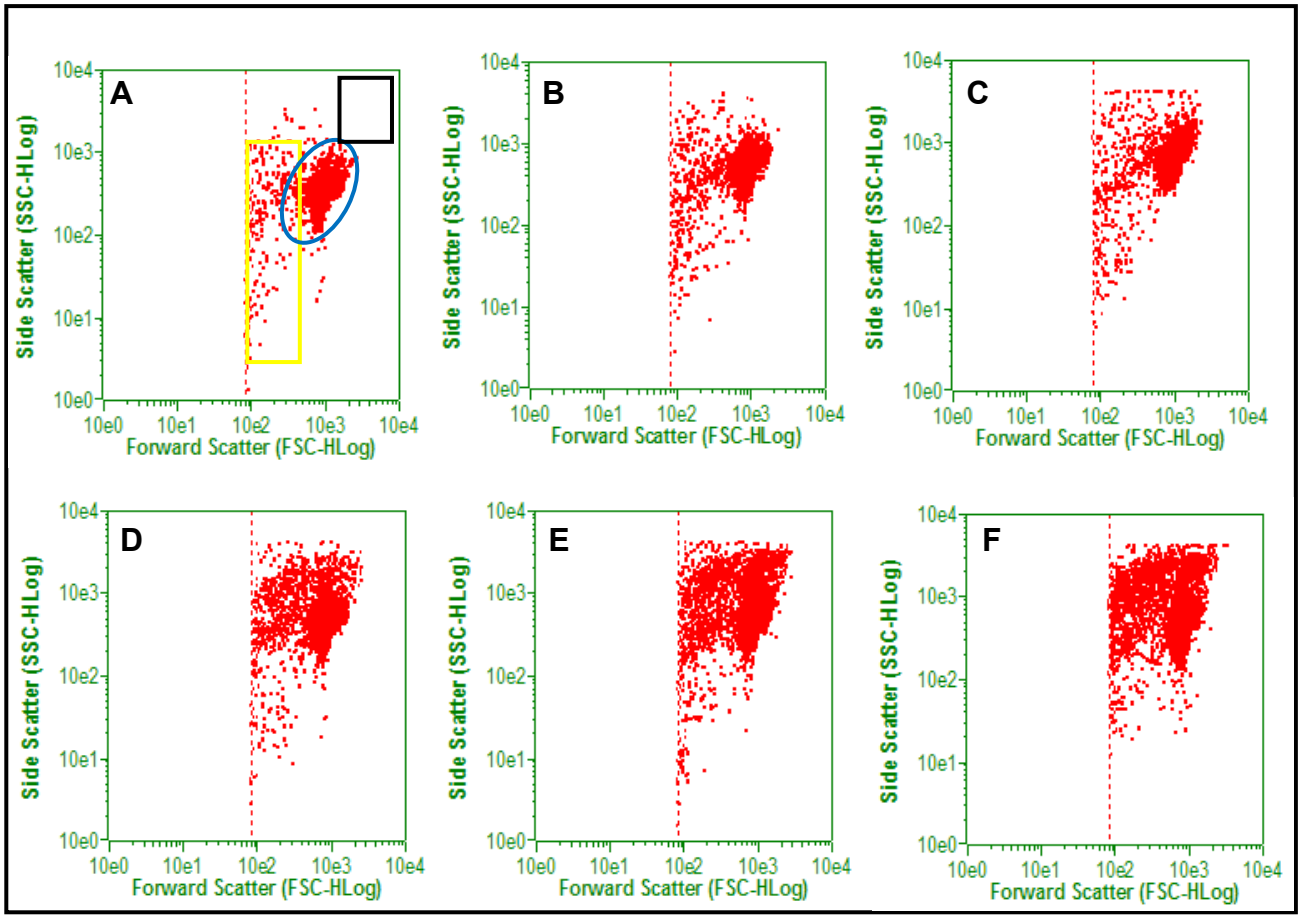


Figura 36 - Efeito do composto acridínico **AC10** (2,5 µg/mL, **D** – 5 µg/mL, **E** - 10 µg/mL, **F**) sobre a morfologia de células HCT-8 determinado por citometria de fluxo usando o FSC (*Forward scatter* - desvio da luz para frente) e SSC (*Side Scatter* - desvio da luz para o lado) como parâmetros de tamanho relativo da célula e granulosidade ou complexidade interna da célula, respectivamente, após **12** horas de incubação.

O controle negativo (**A**) contém a marcação das posições para células viáveis (círculo azul), apoptóticas (retângulo amarelo) e necróticas (retângulo preto). Doxorrubicina e amsacrina estão respresentados nos quadros **(B)** e (**C**). Os resultados são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata Os *debris* celulares foram excluídos das análises. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento.

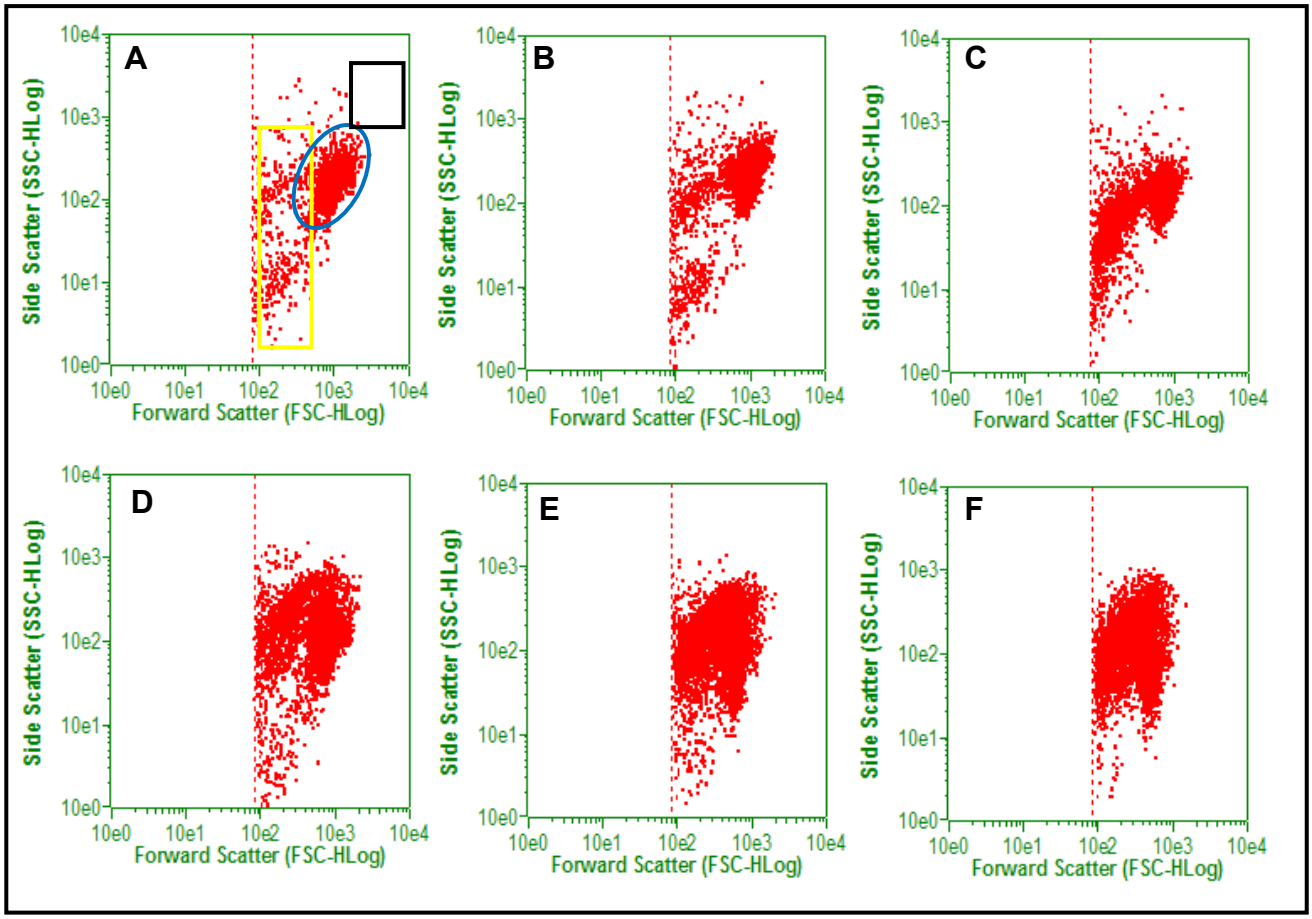


Figura 37 - Efeito do composto acridínico **AC10** (2,5 µg/mL, **D** – 5 µg/mL, **E** - 10 µg/mL, **F**) sobre a morfologia de células HCT-8 determinado por citometria de fluxo usando o FSC (*Forward scatter* - desvio da luz para frente) e SSC (*Side Scatter* - desvio da luz para o lado) como parâmetros de tamanho relativo da célula e granulosidade ou complexidade interna da célula, respectivamente, após **24** horas de incubação.

O controle negativo (**A**) contém a marcação das posições para células viáveis (círculo azul), apoptóticas (retângulo amarelo) e necróticas (retângulo preto). Doxorrubicina e amsacrina estão respresentados nos quadros **(B)** e (**C**). Os resultados são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata Os *debris* celulares foram excluídos das análises. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento.

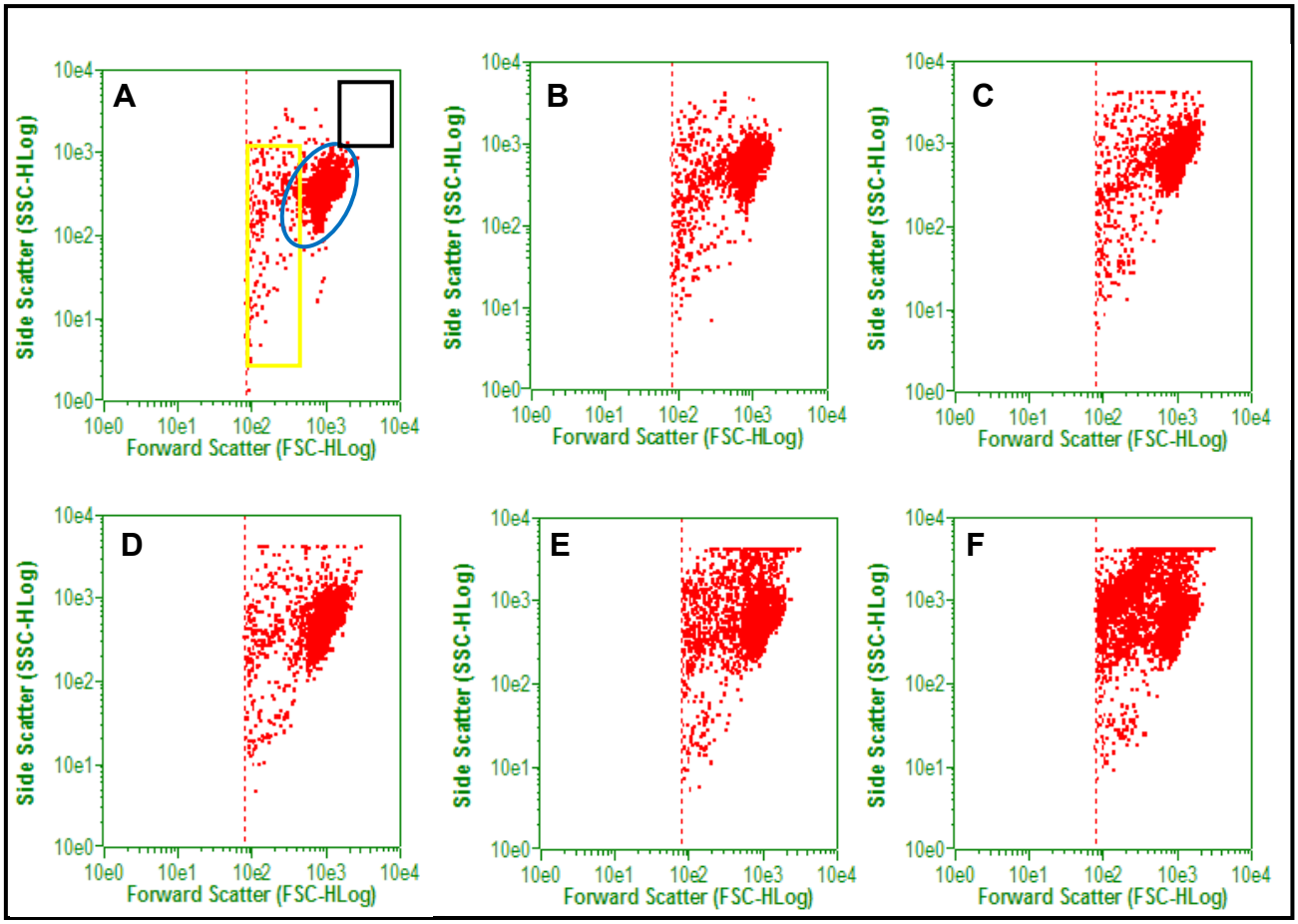


Figura 38 - Efeito do composto acridínico **AC23** (2,5 µg/mL, **D** – 5 µg/mL, **E** - 10 µg/mL, **F**) sobre a morfologia de células HCT-8 determinado por citometria de fluxo usando o FSC (*Forward scatter* - desvio da luz para frente) e SSC (*Side Scatter* - desvio da luz para o lado) como parâmetros de tamanho relativo da célula e granulosidade ou complexidade interna da célula, respectivamente, após **12** horas de incubação.

O controle negativo (**A**) contém a marcação das posições para células viáveis (círculo azul), apoptóticas (retângulo amarelo) e necróticas (retângulo preto). Doxorrubicina e amsacrina estão respresentados nos quadros **(B)** e (**C**). Os resultados são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata Os *debris* celulares foram excluídos das análises. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento.

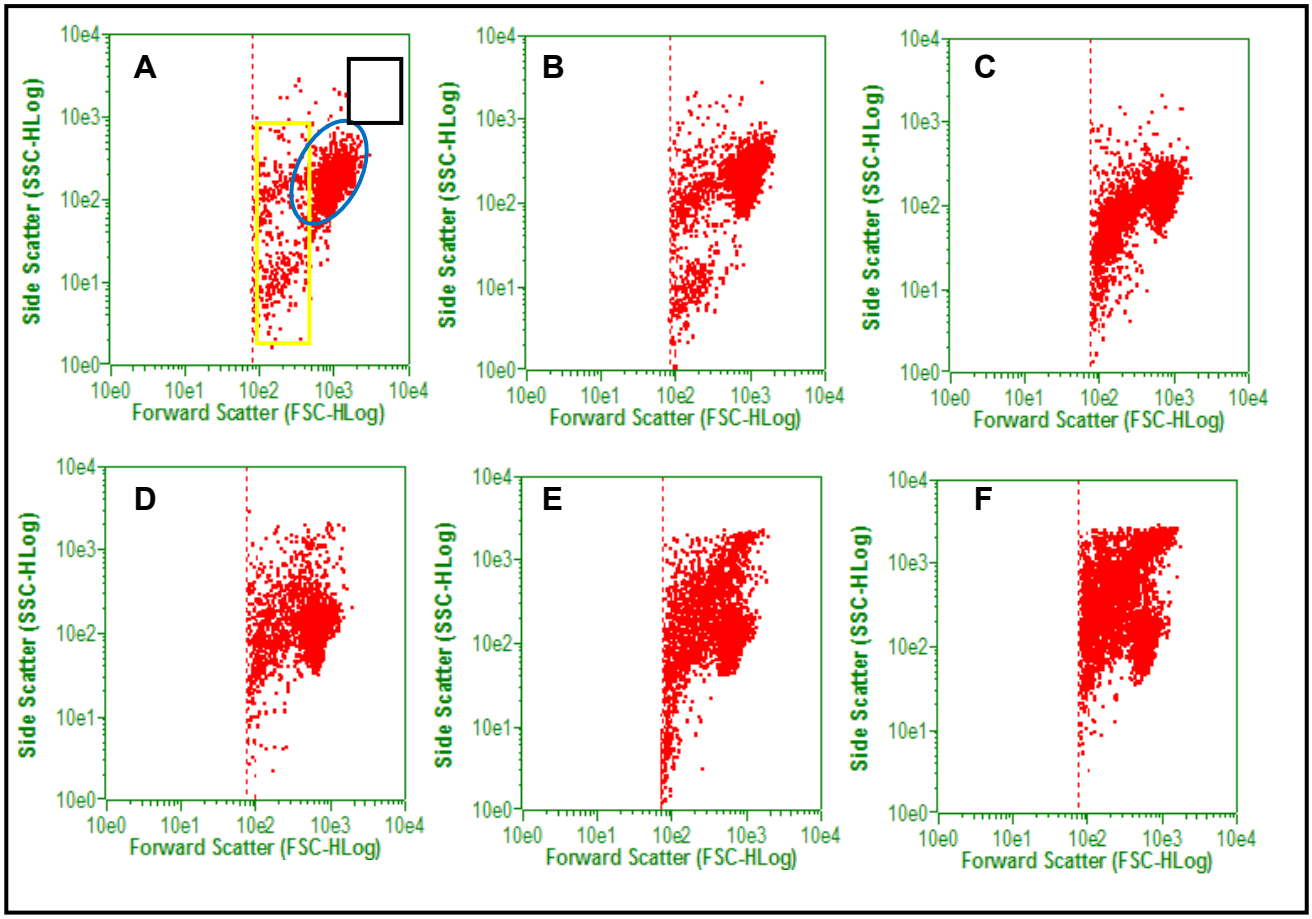


Figura 39 - Efeito do composto acridínico **AC23** (2,5 µg/mL, **D** – 5 µg/mL, **E** - 10 µg/mL, **F**) sobre a morfologia de células HCT-8 determinado por citometria de fluxo usando o FSC (*Forward scatter* - desvio da luz para frente) e SSC (*Side Scatter* - desvio da luz para o lado) como parâmetros de tamanho relativo da célula e granulosidade ou complexidade interna da célula, respectivamente, após **24** horas de incubação.

O controle negativo (**A**) contém a marcação das posições para células viáveis (círculo azul), apoptóticas (retângulo amarelo) e necróticas (retângulo preto). Doxorrubicina e amsacrina estão respresentados nos quadros **(B)** e (**C**). Os resultados são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata Os *debris* celulares foram excluídos das análises. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento.

4.5 Avaliação da despolarização mitocondrial de células HCT-8 após tratamento com os compostos acridínicos

A determinação do potencial transmembrânico da mitocôndria foi realizada por citometria de fluxo, utilizando a rodamina 123 como agente fluorogênico, após 12 e 24 horas de incubação.

Após 12 horas de exposição com os compostos acridínicos, ocorreu aumento significante ($P < 0,05$) da despolarização mitocondrial apenas na concentração de 10 µg/mL. Nessa concentração, as amostras AC4, AC7, AC10 e AC23 promoveram despolarização em 13,2 ± 1,8 %; 9,3 ± 0,9 %; 2,8 ± 0,5 % (não significante) e 7,6 ± 0,7 %, respectivamente (**Figura 40**). Após 24 horas de tratamento com as mesmas amostras, houve aumento significante ($P < 0,05$) da despolarização mitocondrial principalmente nas concentrações de 5 e 10 µg/mL. Na concentração de 2,5 µg/mL, os valores de despolarização para AC4, AC7, AC10 e AC23 foram 9,0 ± 0,3 %; 6,4 ± 0,6 % (não significante); 11,0 ± 0,7 % e 5,5 ± 2,2 % (não significante), respectivamente. Os mesmos compostos na concentração de 5 µg/mL, mantendo a ordem, apresentaram valores de 8,8 ± 0,7 %; 10,4 ± 1,2 %; 15,0 ± 0,6 % e 9,0 ± 2,3 %. Já na concentração de 10 µg/mL, os valores encontrados foram 11,9 ± 1,5 %; 16,2 ± 1,5 %; 12,5 ± 1,6 % e 12,9 ± 1,5 %, também respectivamente (**Figura41**).

Doxorrubicina (0,3 µg/mL) e amsacrina (0,3 µg/mL) foram capazes de promover significativa despolarização mitocondrial nas concentrações testadas. Após 12 horas, os valores encontrados foram 10,7 ± 1,6 % e 11,0 ± 3,9 %, respectivamente (**Figura 40**). Após 24 horas, os valores foram 14,4 ± 0,8 % e 14,7 ± 1,3 %, respectivamente (**Figura 41**).

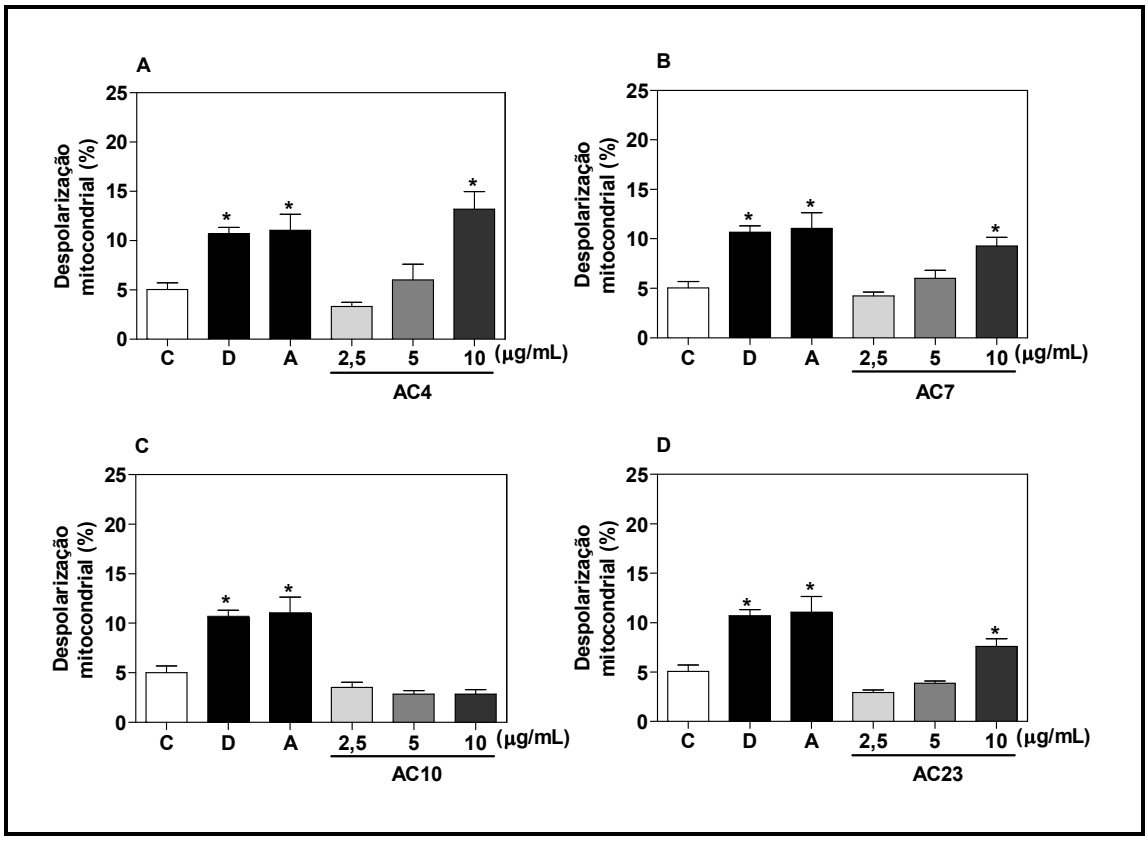


Figura 40 - Efeito dos compostos acridínicos (AC4 – **A**, AC7 – **B**, AC10 – **C** e AC23 – **D**) sobre o potencial transmembrânico de células HCT-8 determinado por citometria de fluxo usando rodamina 123, após **12** horas de incubação.

O controle negativo, doxorrubicina e amsacrina estão representados por C, D e A, respectivamente. Os gráficos apresentam os valores correspondentes à média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. *, $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls.

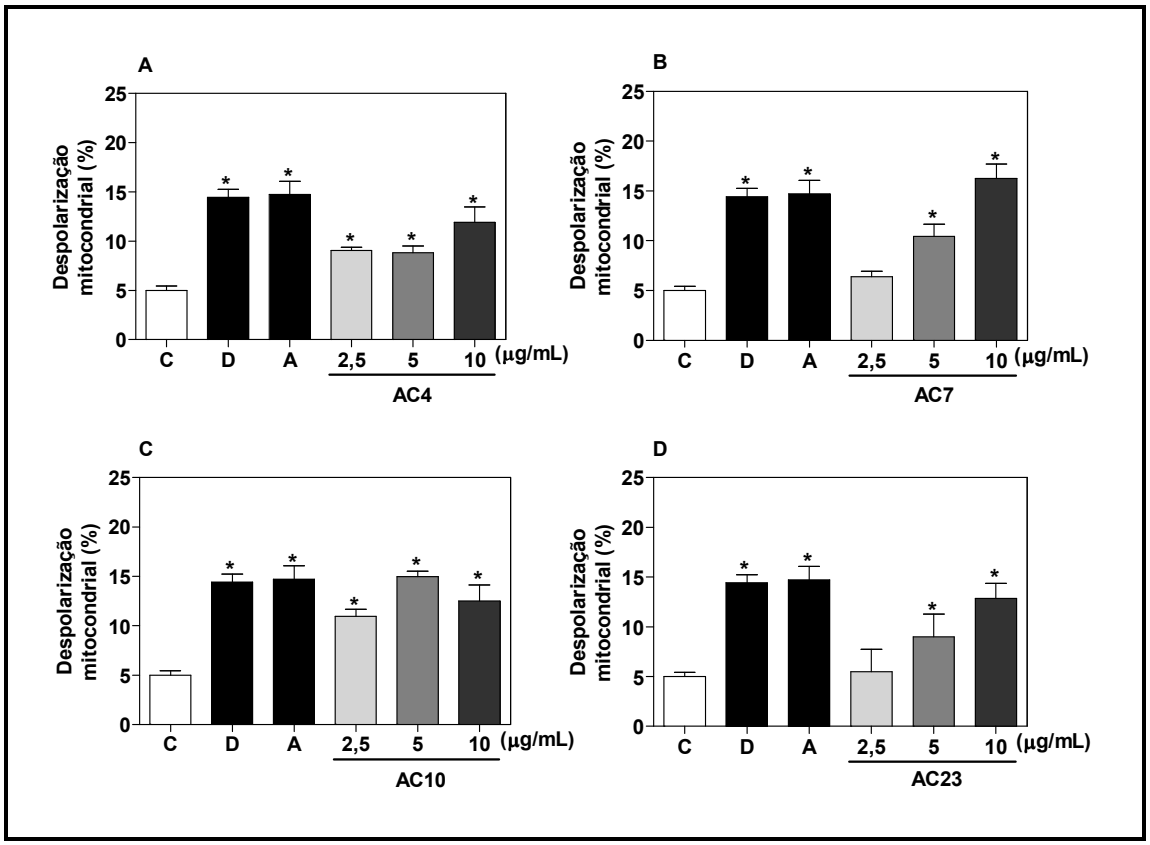


Figura 41 - Efeito dos compostos acridínicos (AC4 – **A**, AC7 – **B**, AC10 – **C** e AC23 – **D**) sobre o potencial transmembrânico de células HCT-8 determinado por citometria de fluxo usando rodamina 123, após **24** horas de incubação.

O controle negativo, doxorrubicina e amsacrina estão representados por C, D e A, respectivamente. Os gráficos apresentam os valores correspondentes à média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. *, $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls.

4.6 Avaliação do efeito dos compostos acridínicos sobre o conteúdo de DNA nuclear de células HCT-8

O conteúdo de DNA nuclear da célula, que reflete as fases do ciclo celular, foi avaliado por citometria de fluxo utilizando o iodeto de propídeo como agente fluorogênico. As células foram analisadas 12 e 24 horas após a incubação com os compostos (**Tabela 6-9**).

A avaliação do conteúdo de DNA mostrou que os compostos acridínicos (com exceção de AC23), em 12 horas de tratamento, induziram discreta parada do ciclo celular em G_2/M ($P < 0,05$) na concentração de 2,5 µg/mL. Nessa parada, o percentual de DNA G_2/M determinado para AC4, AC7 e AC10 foi de 19,7 ± 0,8; 17,5 ± 0,9 e 19,2 ± 0,4; respectivamente.

Nesta avaliação, também foi possível observar aumento significativo ($P < 0,05$) de DNA sub-G1 (DNA fragmentado ou condensado) para todas as amostras testadas e em ambos os tempos de exposição. Após 12 horas, o referido aumento ocorreu principalmente nas concentrações de 5 e 10 µg/mL. Na concentração de 5 µg/mL, para as amostras AC4, AC7, AC10 e AC23 houve fragmentação de 4,4 ± 0,3; 5,0 ± 0,6; 5,3 ± 0,6 e 4,6 ± 1,0; respectivamente. Na concentração de 10 µg/mL, mantendo a mesma ordem dos compostos, os valores de fragmentação encontrados foram 9,9 ± 1,1; 8,3 ± 0,9; 6,9 ± 0,5 e 8,1 ± 0,8. Já após 24 horas de tratamento, todas as concentrações (2,5; 5 e 10 µg/mL) foram capazes de induzir fragmentação de DNA celular. Os valores determinados para AC4, AC7, AC10 e AC23 variaram de 13,9 ± 1,5 a 43,0 ± 1,1; 10,9 ± 0,7 a 26,6 ± 3,6; 26,7 ± 0,7 a 37,5 ± 1,4 e 12,8 ± 1,9 a 28,9 ± 2,0; respectivamente. A fragmentação do DNA celular observada apresentou um perfil concentração e tempo dependente ($P < 0,05$).

Doxorrubicina (0,3 µg/mL) e amsacrina (0,3 µg/mL) também promoveram parada do ciclo celular em G_2/M após 12 horas de incubação. Em 24 horas, a parada em G_2/M também foi observada e foi acompanha de maneira significativa ($P < 0,05$) para indução da fragmentação do DNA celular (7,0 ± 0,4 e 8,1 ± 1,0, respectivamente).

Tabela 6 - Efeito do composto acridínico **AC4** sobre o conteúdo de DNA nuclear de células HCT-8 determinado por citometria de fluxo usando iodeto de propídeo, após 12 e 24 horas de incubação.

Substâncias	Concentrações (µg/mL)	Conteúdo de DNA (%)			
		Sub-G_1	G_1	S	G_2/M
12 horas de incubação					
Controle	-	1,84 ± 0,14	62,81 ± 0,84	12,51 ± 0,28	15,65 ± 0,44
Doxorrubicina	0,3	3,17 ± 0,39	46,89 ± 2,19*	24,72 ± 1,59*	21,79 ± 1,19*
Amsacrina	0,3	1,53 ± 0,39	32,54 ± 1,69*	20,33 ± 2,40*	40,45 ± 2,08*
AC4	2,5	3,76 ± 0,52*	58,21 ± 1,67	13,82 ± 0,88	19,69 ± 0,80*
	5	4,37 ± 0,34*	56,98 ± 1,09	15,16 ± 0,52	17,39 ± 1,33
	10	9,95 ± 1,14*	55,16 ± 2,66	14,49 ± 0,55	12,87 ± 0,86
24 horas de incubação					
Controle	-	4,66 ± 0,39	59,60 ± 0,79	14,36 ± 0,81	15,96 ± 0,26
Doxorrubicina	0,3	7,05 ± 0,38*	34,22 ± 1,13*	21,12 ± 0,77*	37,17 ± 1,35*
Amsacrina	0,3	8,11 ± 1,05*	27,80 ± 1,63*	24,00 ± 2,27*	26,34 ± 1,02*
AC4	2,5	13,94 ± 1,47*	55,24 ± 0,84	15,13 ± 1,05	17,52 ± 0,94
	5	24,72 ± 2,24*	51,83 ± 0,91*	15,08 ± 0,94	3,86 ± 0,76*
	10	43,30 ± 1,52*	44,00 ± 1,27*	9,97 ± 0,46*	3,70 ± 0,73*

A tabela apresenta os valores correspondentes à média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento. *, $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls. Doxorrubicina e amsacrina foram usadas como controle positivo.

Tabela 7 - Efeito do composto acridínico **AC7** sobre o conteúdo de DNA nuclear de células HCT-8 determinado por citometria de fluxo usando iodeto de propídeo, após 12 e 24 horas de incubação.

Substâncias	Concentrações (µg/mL)	Conteúdo de DNA (%)			
		Sub-G_1	G_1	S	G_2/M
12 horas de incubação					
Controle	-	1,84 ± 0,14	62,81 ± 0,84	12,51 ± 0,28	15,65 ± 0,44
Doxorrubicina	0,3	3,17 ± 0,39	46,89 ± 2,19*	24,72 ± 1,59*	21,79 ± 1,19*
Amsacrina	0,3	1,53 ± 0,39	32,54 ± 1,69*	20,33 ± 2,40*	40,45 ± 2,08*
AC7	2,5	2,40 ± 0,35	58,32 ± 1,19	13,50 ± 0,58	19,17 ± 0,45*
	5	5,04 ± 0,59*	57,77 ± 1,31	15,34 ± 1,00	16,20 ± 0,37
	10	8,35 ± 0,88*	58,12 ± 1,61	15,33 ± 1,36	12,17 ± 0,58
24 horas de incubação					
Controle	-	4,66 ± 0,39	59,60 ± 0,79	14,36 ± 0,81	15,96 ± 0,26
Doxorrubicina	0,3	7,05 ± 0,38*	34,22 ± 1,13*	21,12 ± 0,77*	37,17 ± 1,35*
Amsacrina	0,3	8,11 ± 1,05*	27,80 ± 1,63*	24,00 ± 2,27*	26,34 ± 1,02*
AC7	2,5	10,88 ± 0,75*	55,66 ± 1,52	14,89 ± 0,35	11,63 ± 0,39*
	5	13,72 ± 1,35*	54,92 ± 3,31*	13,61 ± 0,69	9,80 ± 0,65*
	10	26,58 ± 3,60*	54,56 ± 3,36*	8,872 ± 0,54*	5,15 ± 0,70*

A tabela apresenta os valores correspondentes à média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento. *, $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls. Doxorrubicina e amsacrina foram usadas como controle positivo.

Tabela 8 - Efeito do composto acridínico **AC10** sobre o conteúdo de DNA nuclear de células HCT-8 determinado por citometria de fluxo usando iodeto de propídeo, após 12 e 24 horas de incubação.

Substâncias	Concentrações (µg/mL)	Conteúdo de DNA (%)			
		Sub-G_1	G_1	S	G_2/M
12 horas de incubação					
Controle	-	1,84 ± 0,14	62,81 ± 0,84	12,51 ± 0,28	15,65 ± 0,44
Doxorrubicina	0,3	3,17 ± 0,39	46,89 ± 2,19*	24,72 ± 1,59*	21,79 ± 1,19*
Amsacrina	0,3	1,53 ± 0,39	32,54 ± 1,69*	20,33 ± 2,40*	40,45 ± 2,08*
AC10	2,5	3,72 ± 0,46*	57,63 ± 1,61	14,08 ± 0,54	19,85 ± 0,53*
	5	5,28 ± 0,58*	58,24 ± 1,22	14,44 ± 0,28	17,57 ± 0,72
	10	6,94 ± 0,51*	58,36 ± 1,26	13,54 ± 0,58	16,67 ± 0,89
24 horas de incubação					
Controle	-	4,66 ± 0,39	59,60 ± 0,79	14,36 ± 0,81	15,96 ± 0,26
Doxorrubicina	0,3	7,05 ± 0,38*	34,22 ± 1,13*	21,12 ± 0,77*	37,17 ± 1,35*
Amsacrina	0,3	8,11 ± 1,05*	27,80 ± 1,63*	24,00 ± 2,27*	26,34 ± 1,02*
AC10	2,5	26,75 ± 0,73*	52,63 ± 2,30*	14,66 ± 0,77	10,80 ± 1,04*
	5	27,05 ± 1,04*	49,13 ± 3,11*	14,31± 0,58	9,66 ± 1,05*
	10	37,47 ± 1,41*	48,83 ± 1,75*	10,22 ± 0,45*	4,73 ± 0,46*

A tabela apresenta os valores correspondentes à média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento. *, $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls. Doxorrubicina e amsacrina foram usadas como controle positivo.

Tabela 9 - Efeito do composto acridínico **AC23** sobre o conteúdo de DNA nuclear de células HCT-8 determinado por citometria de fluxo usando iodeto de propídeo, após 12 e 24 horas de incubação.

Substâncias	Concentrações (µg/mL)	Conteúdo de DNA (%)			
		Sub-G_1	G_1	S	G_2/M
12 horas de incubação					
Controle	-	1,84 ± 0,14	62,81 ± 0,84	12,51 ± 0,28	15,65 ± 0,44
Doxorrubicina	0,3	3,17 ± 0,39	46,89 ± 2,19*	24,72 ± 1,59*	21,79 ± 1,19*
Amsacrina	0,3	1,53 ± 0,39	32,54 ± 1,69*	20,33 ± 2,40*	40,45 ± 2,08*
AC23	2,5	3,28 ± 0,76	58,40 ± 0,96	14,74 ± 1,04	16,62 ± 0,29
	5	4,56 ± 1,04*	57,60 ± 0,68	16,59 ± 1,10	13,90 ± 0,53
	10	8,14 ± 0,76*	60,48 ± 0,34	13,04 ± 0,75	11,91 ± 0,48*
24 horas de incubação					
Controle	-	4,66 ± 0,39	59,60 ± 0,79	14,36 ± 0,81	15,96 ± 0,26
Doxorrubicina	0,3	7,05 ± 0,38*	34,22 ± 1,13*	21,12 ± 0,77*	37,17 ± 1,35*
Amsacrina	0,3	8,11 ± 1,05*	27,80 ± 1,63*	24,00 ± 2,27*	26,34 ± 1,02*
AC23	2,5	12,08 ± 1,95*	56,32 ± 1,94	12,49 ± 0,46	10,84 ± 1,37*
	5	24,35 ± 2,14*	55,82 ± 3,30	11,08 ± 0,73	9,815 ± 1,17*
	10	28,90 ± 1,98*	52,18 ± 3,47*	6,41 ± 0,63*	4,45 ± 0,37*

A tabela apresenta os valores correspondentes à média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento. *, $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por Student Newman-Keuls. Doxorrubicina e amsacrina foram usadas como controle positivo.

4.7 Avaliação do efeito dos compostos acridínicos sobre o crescimento celular de *Saccharomyces cerevisiae*

O crescimento celular das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* foi avaliado pelo teste em gotas, após 24 horas de incubação com os compostos acridínicos (50 e 100 µg/mL). Amsacrina (50 e 100 µg/mL) foi usada como controle positivo e os resultados podem ser observados nas **figuras 42-45**.

Os resultados mostram que na concentração 50 µg/mL a linhagem Top1Δ (sem topoisomerase I) foi mais resistente aos compostos acridínicos quando comparada à linhagem selvagem BY-4741-WT. Além disso, as linhagens Top3Δ (com topoisomerase I) e Top1/3Δ (sem topoisomerase I), na concentração de 50 µg/mL, foram sensível e resistente, respectivamente. Por outro lado, na concentração de 100 µg/mL dos compostos acridínicos, as 3 linhagens celulares utilizadas no teste foram igualmente afetadas no seu crescimento. As amostras testadas (AC4, AC7, AC10 e AC23) apresentaram efeitos similares.

O controle positivo amsacrina (AMS), por sua vez, foi também ativo sobre as linhagens celulares utilizadas, principalmente na concentração de 100 µg/mL.

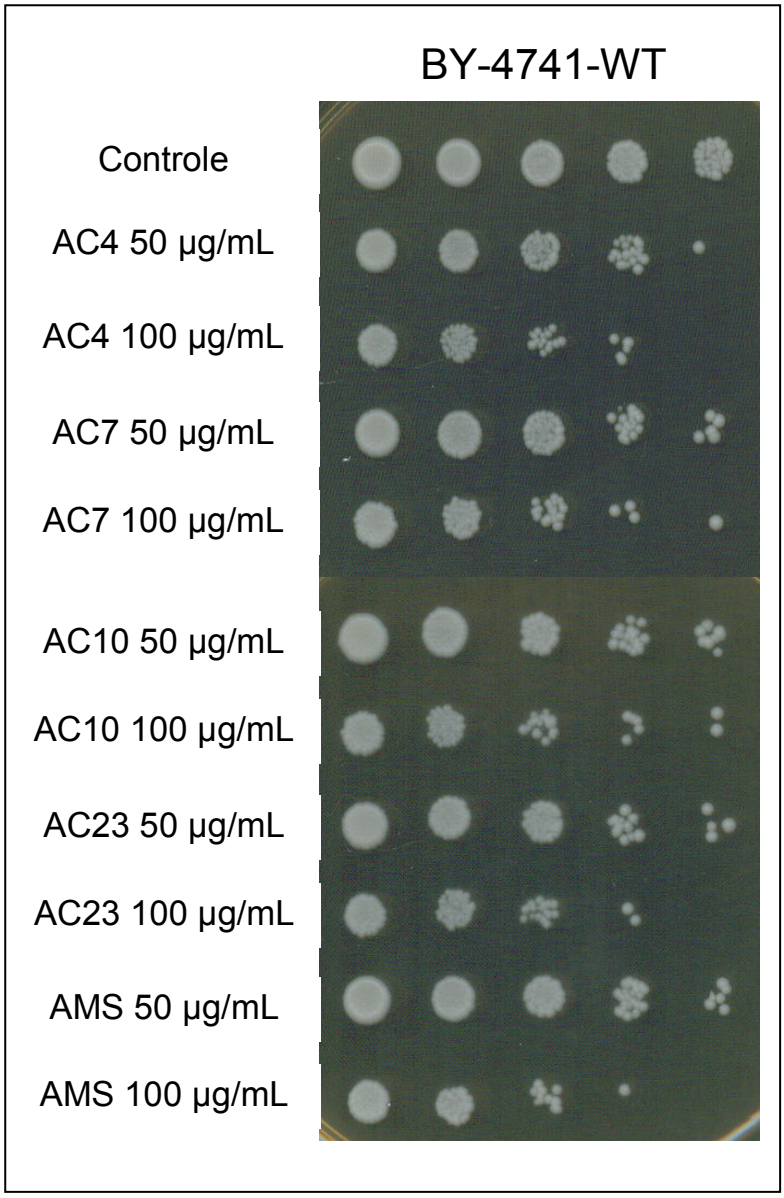


Figura 42 - Efeito dos compostos acridínicos (**AC4, AC7, AC10 e AC23**) sobre o crescimento celular de linhagem selvagem de levedura *Saccharomyces serevisiae* (BY-4741-WT) determinado pelo teste em gotas, após **24** horas de incubação.
Amsacrina (AMS) foi usada como controle positivo.

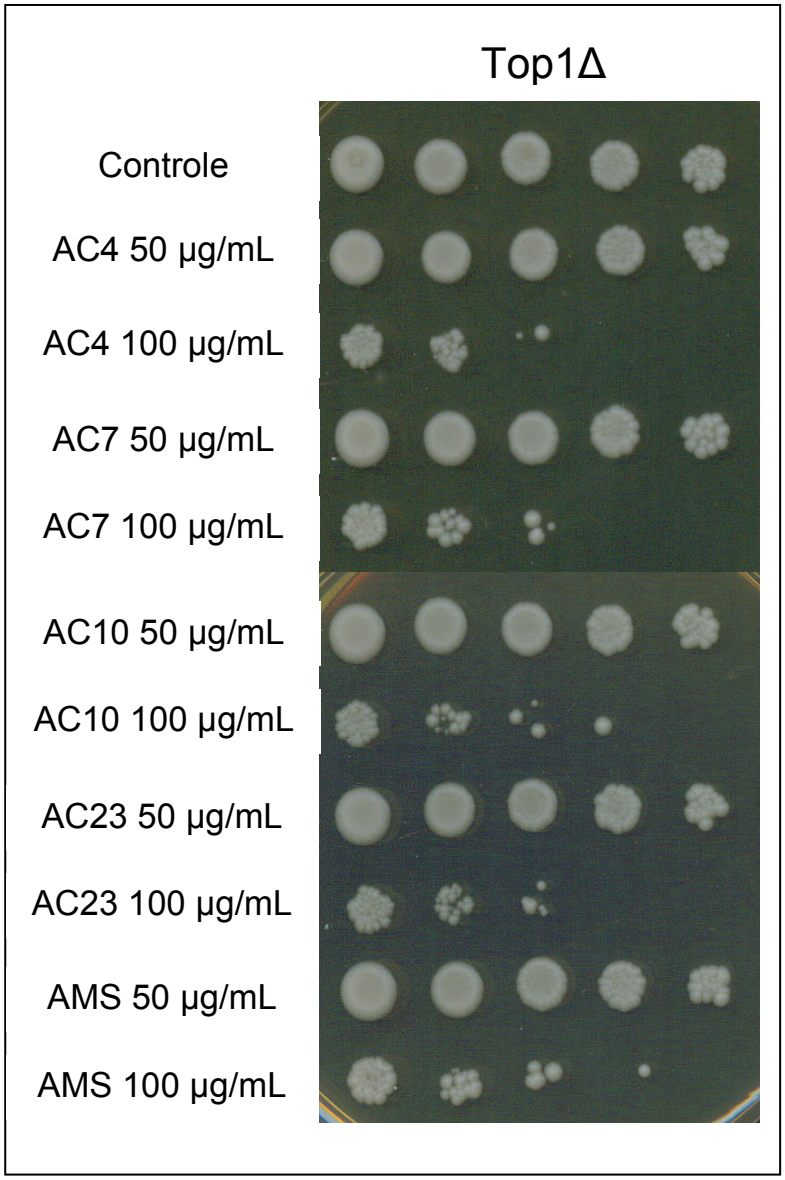


Figura 43 - Efeito dos compostos acridínicos (**AC4, AC7, AC10 e AC23**) sobre o crescimento celular de linhagem mutante Top1Δ (sem topoisomerase I) de levedura *Saccharomyces serevisiae* determinado pelo teste em gotas, após **24** horas de incubação. A amsacrina (AMS) foi usada como controle positivo.

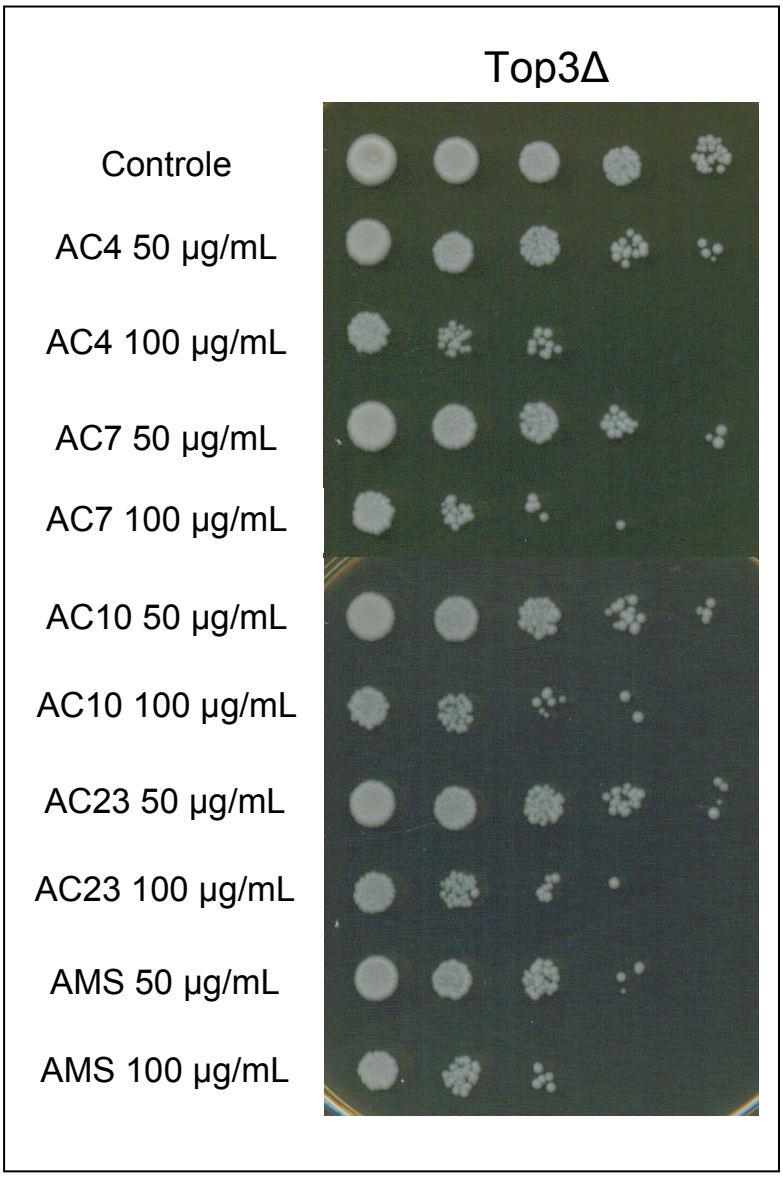


Figura 44 - Efeito dos compostos acridínicos (**AC4, AC7, AC10 e AC23**) sobre o crescimento celular de linhagem mutante Top3Δ (sem topoisomerase III) de levedura *Saccharomyces serevisiae* determinado pelo teste em gotas, após **24** horas de incubação. Amsacrina (AMS) foi usada como controle positivo.

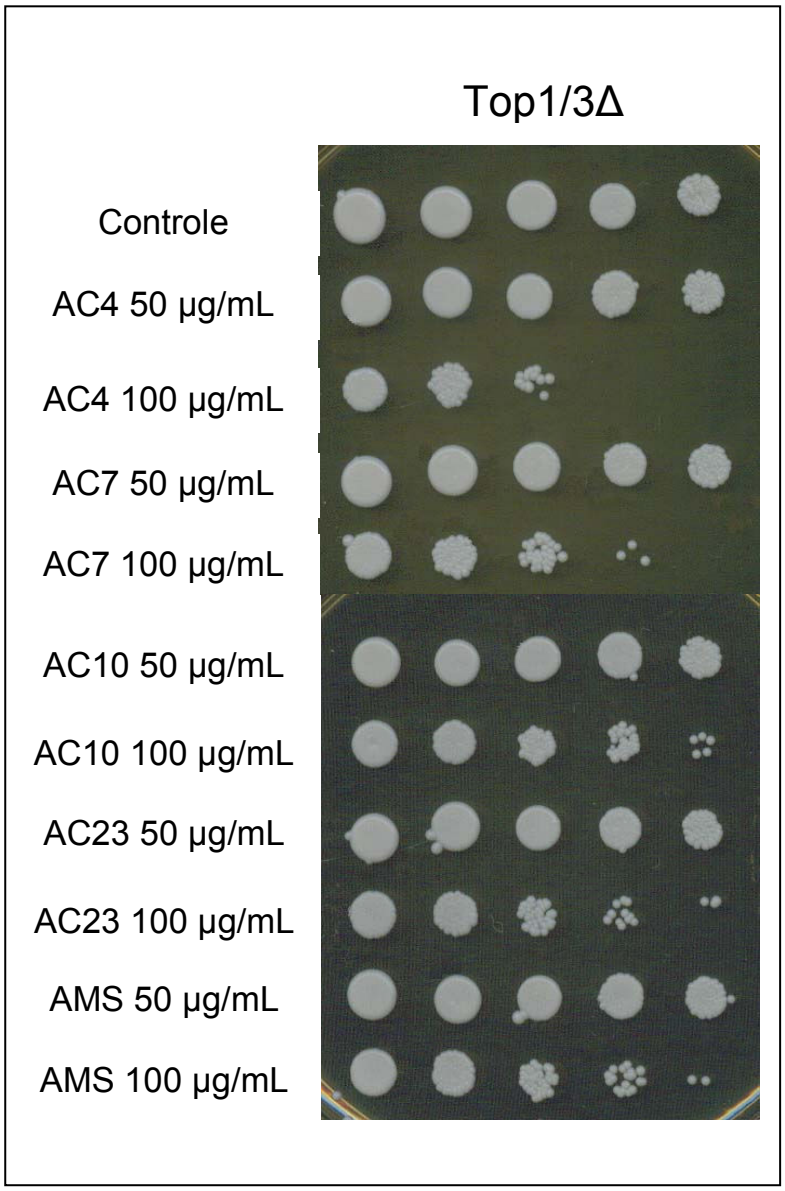


Figura 45 - Efeito dos compostos acridínicos (**AC4, AC7, AC10 e AC23**) sobre o crescimento celular de linhagem mutante Top1/3Δ (sem topoisomerase I e III) de levedura *Saccharomyces serevisiae* determinado pelo teste em gotas, após **24** horas de incubação. Amsacrina (AMS) foi usada como controle positivo.

4.8 Avaliação do efeito dos compostos acridínicos sobre o relaxamento do DNA

Observando o padrão de corrida eletroforético na **figura 46**, nota-se que os compostos acridínicos (AC4, AC7, AC10 e AC23), linhas 4-11, foram capazes de inibir parcialmente o relaxamento do DNA, principalmente na concentração de 100 μM. Esta observação é decorrente da presença de bandas inferiores de DNA superhelicoidizado, que na eletroforese tendem a correr mais rapidadente. O padrão de corrida para o DNA superhelicoidizado pode ser observado na linha 1, que corresponde ao branco do teste (DNA superhelicoidizado + veículo). Por sua vez, o padrão de corrida para o DNA relaxado encontra-se na linha 2, que corresponde ao controle negativo (DNA superhelicoidizado + Topoisomerase I).

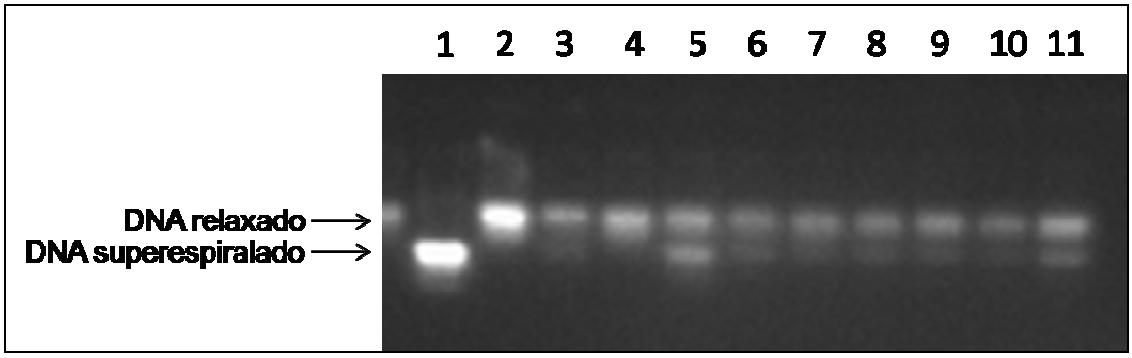


Figura 46 - Efeito dos compostos acridínicos (AC4, AC7, AC10 e AC23) sobre o relaxamento de DNA plasmidial superhelicoidizado (pRYG), por eletroforese horizontal em gel de agarose 1 %.

Linha 1, 250 ng de pRYG incubados somente na presença do solvente (DMSO 10 %) (branco); Linha 2, 250 ng de pRYG na presença do solvente (DMSO 10 %) e 4 U de Topoisomerase I (controle negativo); Linha 3, Camptotecina 100 µM (controle positivo); Linha 4 e 5, 250 ng de pRYG com 4 U de Topoisomerase I na presença de 50 e 100 µM de AC4, respectivamente; Linha 6 e 7, 250 ng de pRYG com 4 U de Topoisomerase I na presença de 50 e 100 µg/mL de AC7, respectivamente; Linha 8 e 9, 250 ng de pRYG com 4 U de Topoisomerase I na presença de 50 e 100 µg/mL de AC10, respectivamente; Linha 9 e 10, 250 ng de pRYG com 4 U de Topoisomerase I na presença de 50 e 100 µg/mL de AC23, respectivamente. Revelação por brometo de etídio.

4.9 Avaliação da genotoxicidade dos compostos acridínicos em CMSPH

O potencial genotóxico foi avaliado em células monocucleares de sangue periférico humano (CMSPH) por meio do ensaio cometa. Como pode ser visto na **tabela 10**, os compostos acridínicos (AC4, AC7, AC10 e AC23) não apresentaram genotoxicidade em CMSPH (ID < 15). Já os controles doxorrubicina e amsacrina causaram significativo (P < 0,05) dano ao DNA (140,4 ± 5,3 e 155,8 ± 5,1; respectivamente) nas concentrações testadas.

Tabela 10 - Avaliação do potencial genotóxico dos compostos acridínicos (**AC4, AC7, AC10 e AC23**) em CMSPH (células mononucleares de sangue periférico humano) pelo ensaio cometa, após 3 horas de incubação.

Substâncias	Concentração (µg/mL)	Índice de Dano (ID)[a]
Controle	-	11,80 ± 1,25
Doxorrubicina	0,3	140,40 ± 5,35*
Amsacrina	0,3	155,80 ± 5,07*
AC4	2,5	9,33 ± 1,69
	5,0	9,50 ± 0,92
	10,0	6,33 ± 1,15
AC7	2,5	5,83 ± 1,30
	5,0	1,30 ± 1,85
	10,0	7,83 ± 1,49
AC10	2,5	6,00 ± 1,16
	5,0	7,50 ± 0,96
	10,0	15,50 ± 1,18
AC23	2,5	7,00 ± 1,53
	5,0	6,83 ± 1,28
	10,0	15,00 ± 1,00

A tabela apresenta os valores correspondentes à média ± E.P.M. de dois experimentos independentes realizados em duplicata, obtidos a partir da contagem de 400 células por experimento. Doxorrubicina e amsacrina foram utilizadas como controle positivo. *, $P < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

5 DISCUSSÃO

A classe acridina é conhecida desde o século XIX, quando alguns de seus derivados foram desenvolvidos como pigmentos e corantes. Seus inúmeros representantes apresentam origens diversas podendo ser obtidos de fonte natural (planta ou organismo marinho) ou, primordialmente, sintética. Suas propriedades biológicas foram descritas desde a primeira Guerra Mundial, as quais foram avaliadas em infecções provocadas por bactérias, protozoários e também em modelos experimentais de câncer (BELMONT *et al*., 2007).

Muitos compostos acridínicos atuam por interferir na topologia do DNA, razão pela qual esta macromolécula é considerada o principal alvo biológico das acridinas com propriedades anticâncer. Com isso, existe um interesse no desenvolvimento de novos compostos acridínicos seletivos ao DNA. Pois, várias classes de antineoplásicos intercalantes ao DNA encontram-se na clínica, a exemplo da amsacrina, daunorubicina, etoposido, camptotecina, indolocarbazol e rebecamicina, que atuam por promover uma ligação covalente com o DNA, agindo a nível da topoisomerase I e II (ARIMONDO; HÉLÈNE, 2001). Pode ser destacado que, amsacrina (m-AMSA, 4'-(9-acridilamino)metanosulfon-*m*-anisidida) e a DACA (N-(2-(dimetilamino)etil)acridina-4-carboxamida) são importantes exemplos da classe acridina que apresentam esse mecanismo de ação. A m-AMSA é utilizada na clínica no tratamento de leucemia, enquanto que a DACA foi avaliada em estudos de fase II para tumores sólidos, entretanto, não prosseguiu nos estudos por não manter eficácia antitumoral (BACHERIKOV *et al.,* 2005; CAPONIGRO *et al.,* 2002; DITTRICHA *et al.*, 2003).

Estes e outros fatos reforçam e constituem o desafio fundamental do presente trabalho: contribuir com o desenvolvimento de novas acridinas anti-câncer mais eficazes e menos tóxicas por meio de estratégias e ferramentas da síntese química aliada a estudos biológicos.

Neste sentido no *screening* inicial, utilizando o teste do MTT, foi avaliado o potencial citotóxico *in vitro* de 22 novos compostos acridínicos sintéticos (**Figura 10**) em três linhagens tumorais humanas (SF-295, HCT-8 e MDAMB-435). A análise do resultado permitiu selecionar 4 compostos que apresentaram %IC > 90 % em pelo menos uma linhagem tumoral utilizada. Os compostos selecionados foram: AC4, 5-(acridin-9-il-metileno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona; AC7, 5-(acridin-9-il-

metileno)-3-(4-bromo-benzil)-tiazolidina-2,4-diona; AC10, 5-(acridin-9-il-metileno)-3-(4-cloro-benzil)-tiazolidina-2,4-diona; e AC23, 5-(acridin-9-il-metileno)-3-(4-flúor-benzil)-tiazolidina-2,4-diona).

De acordo com Ferguson e Denny (1991), as acridinas e seus derivados são compostos orgânicos que apresentam em sua estrutura química um cromóforo planar formado por três anéis aromáticos condensados, com um átomo de nitrogênio no anel central. Essa característica estrutural confere aos compostos acridínicos a capacidade de intercalar ao DNA, sendo uma condição importante, mas não suficiente, para a atividade antiproliferativa dos mesmos (PALCHAUDHURI; HERGENROTHER, 2007).

Dessa maneira, comparando a estrutura (**Figura 10**) dos compostos aqui selecionados (AC4, AC7, AC10 e AC23) com aqueles que apresentaram baixo %IC, foi verificado que a presença simultânea do enxofre (S) em A, do grupo metil (CH_3) em X e do oxigênio (O) em R_1, parece ser importante para o potencial citotóxico. Além disso, a presença dos átomos de halogênio (flúor, F; cloro, Cl e bromo, Br) ou o grupo metil na posição 4 de R_2 , aumentam o efeito citotóxico.

Em seguida, os compostos AC4, AC7, AC10 e AC23 foram submetidos a ensaios de citotoxicidade para determinar sua seletividade em um painel de células tumorais e células normais de diferentes tipos histológicos. Foi possível observar que esses compostos foram mais ativos em tumores sólidos do tipo HCT-8 (carcinoma de cólon) e SF-295 (glioblastoma) com valores de CI_{50} < 6 µg/mL para todas as amostras. Porém, os mesmos compostos não foram ativos (CI_{50} > 25 µg/mL) contra células leucêmicas (HL-60, CEM e K-562), o que os diferencia da amsacrina, usada na clínica no tratamento de pacientes com leucemia (FERGUSON *et al.*, 1998).

Esses achados preliminares de citotoxicidade para os derivados acridínicos, são reforçados por Hamouly *et al.* (1993) e Ching *et al.* (1990), onde foi observada a atividade citotóxica *in vitro* de vários compostos acridínicos em linhagens tumorais humanas de diferentes tipos histológicos. Os achados são também corroborados pelos resultados obtidos com a Pirazoloacridina (PZA), um compostos acridínico obtido por síntese química, que apresentou maior citotoxicidade em linhagens celulares de tumor sólido quando comparada a linhagens celulares leucêmicas (LORUSSO *et al.,* 1990). Adicionalmente, a PZA apresentou efeito citotóxico contra

linhagens de neuroblastoma deficientes na produção de p53 (KESHELAVA *et al.,* 2003).

Um fator importante no desenvolvimento de novos medicamentos anticâncer é que os mesmos sejam avaliados quanto a sua toxicidade em células normais do organismo humano (células da pele, do trato gastrintestinal, plaquetas, glóbulos vermelhos e brancos) (ZUCO *et al*., 2002; ANAZETTI *et al*., 2003). Assim, a atividade citotóxica dos compostos acridínicos foi avaliada em células mononucleares de sangue periférico humano (CMSPH), pelo teste do Alamar Blue. A análise do resultado permitiu identificar a baixa citotoxicidade (CI_{50} > 25 µg/mL) dos compostos em CMSPH, enquanto que amsacrina apresentou CI_{50} (IC 95 %) igual a 8,5 (6,8-9,9) µg/mL. Ao contrário dos compostos AC4, AC7, AC10 e AC23, a amsacrina demonstrou elevada citotoxicidade frente a células normais, o que poderá ser traduzido na inespecificidade *in vitro* em relação ao painel de células tumorais e normais avaliados.

Além disso, os compostos acridínicos aqui estudados não promoveram lise das hemácias de camundongos, o que sugere que o mecanismo de ação citotóxica dos compostos não é devido a um dano direto sobre a membrana plasmática da célula. Podendo, dessa maneira, estar relacionada a um mecanismo de morte mais específico (COSTA *et al*., 2008).

A continuidade do estudo do potencial anticâncer das amostras AC4, AC7 AC10 e AC23 foi realizada em linhagem HCT-8 após 12 e 24 horas de incubação com os compostos testes em diferentes concentrações (2,5; 5 e 10 µg/mL), as quais foram escolhidas a partir da média das CI_{50} dos compostos em HCT-8.

O efeito antiproliferativo dos novos compostos acridínicos foi confirmado pelo teste do azul de tripan e por citometria de fluxo em células HCT-8. Os resultados demonstraram que as substâncias testadas apresentaram efeitos antiproliferativos semelhantes entre si, no qual foi observado uma redução significativa no número de células viáveis após 12 e 24 horas de tratamento, sendo mais intensa no tempo de 24 horas de exposição e mais efetiva na maior concentração testada (10 µg/mL). Curiosamente, após 12 horas de tratamento, foi observado que no teste do azul de tripan os compostos testados não alteraram a viabilidade celular em nenhuma concentração testada, o que se contrapõe ao resultado encontrado na citometria de fluxo, para o mesmo tempo de incubação, onde ocorreu redução significativa da viabilidade celular. Esse achado pode ser explicado pelo fato de que os métodos

utilizados baseiam-se em parâmetros diferentes para quantificar células viáveis. No teste do azul de tripan, células viáveis são as que excluíram o corante, todavia, na citometria de fluxo, células viáveis são classificadas de acordo com o tamanho e a granulosidade. Além disso, células em estágios iniciais de apoptose apresentam seus sistemas de transporte de membrana ainda ativos, o que possibilita a exclusão do corante azul de tripan, sendo, então, contabilizadas como células viáveis nesse teste (KRYSKO *et al.,* 2008).

Em seguida, a fim de avaliar a síntese de DNA em células HCT-8 tratadas e não-tratadas com os compostos AC4, AC7, AC10 e AC23 foi realizado o ensaio do BrdU após 24 horas de incubação. A análise do resultado permitiu observar uma diminuição da incorporação da bromodeoxiuridina (BrdU) nas células HCT-8 tratadas com os novos compostos acridínicos, de maneira concentração dependente. Este resultado reforça o que foi observado no teste do azul de tripan, no teste do MTT, bem como, na citometria de fluxo em relação ao efeito antiproliferativo das amostras.

Apesar de que muitos autores consideram a distinção entre apoptose e necrose difícil e controversa, algumas características podem ser avaliadas e consideradas na sugestão do tipo de morte celular (TINARI *et al*., 2008).

Devido a isso, houve interesse em investigar o padrão de morte celular (apoptose e/ou necrose) induzido pelos compostos AC4, AC7, AC10 e AC23 em células HCT-8. Assim, análise do padrão de morte celular foi realizada por métodos de colaração (hematoxilina/eosina e brometo de etídeo/laranja de acridina) e por citometria de fluxo, os quais são métodos adequados para investigar a integridade da membrana plasmática, o conteúdo de DNA e a despolarização mitocondrial, entre outras características celulares (DARZYNKIEWICZ *et al*., 1992; KEYHANI *et al.*, 2009).

De acordo com Kroemer *et al.* (2005) e Ricci e Zong (2006), a apoptose corresponde a um mecanismo de morte bastante regulado caracterizado por redução do volume celular, manutenção da integridade da membrana, fragmentação nuclear e externalização da fosfatidilserina. Fragmentação do DNA, despolarização mitocondrial e ativação de caspases são outras características que podem ser apresentadas por células apoptóticas. Diferentemente da apoptose, a morte por necrose é caracterizada pelo aumento do volume celular, seguido de perda da integridade da membrana plasmática com conseqüente liberação dos componentes celulares e indução de inflamação aos tecidos adjacentes.

Com base nessas informações, a análise morfológica da coloração com hematoxilina/eosina permitiu verificar sinais consistentes de morte celular por apoptose na concentração de 10 µg/mL, após 12 horas de incubação, e nas concentrações de 5 e 10 µg/mL, após 24 horas de tratamento, para todos os compostos acridínicos testados. As características encontradas foram redução do volume celular, formação de *blebbs*, condensação da cromatina, fragmentação do DNA nuclear e alguns restos celulares. Os resultados obtidos na coloração diferencial com brometo de etídeo/laranja de acridina também demonstraram aumento significativo de células com padrão apoptótico (condensação da cromatina e fragmentação do DNA) os quais corroboram com os resultados encontrados na marcação com hematoxilina/eosina. Vale ressaltar que os eventos apoptóticos foram se tornando mais evidentes com o aumento do tempo e da concentração dos compostos.

A análise da integridade da membrana citoplasmática, do tamanho e da granulosidade celular realizada por citometria de fluxo demonstrou manutenção da integridade da membrana por grande parte das células e redução do volume e da granulosidade celular. Dessa maneira, os resultados apresentados pelos testes morfológicos corroboram com a sugestão de que o padrão de morte de células HCT-8 expostas aos compostos acridínicos AC4, AC7, AC10 e AC23 está ocorrendo por ativação da via apoptótica.

Os mecanismos moleculares envolvidos na apoptose ocorrem principalmente em duas vias de sinalização, a via mitocondrial e a via do receptor de morte. O evento chave na via mitocondrial corresponde ao efluxo de citocromo c da mitocôndria para o citosol, o qual forma complexo com Apaf-1 e caspase 9 que promove ativação das caspases efetoras (caspases 3 e 7). A via do receptor de morte, por sua vez, é caracterizada pela ligação de ligante específico (TNF-α, CD95-L e TRAIL) ao domínio extracelular do receptor de morte de membrana. A ativação deste receptor promove o recrutamento da caspase 8 que, em seguida, ativa as caspases 3 e 7, responsáveis pelas alterações celulares da apoptose (RICCI; ZONG, 2006).

Com o intuito de melhor entender a via de sinalização da apoptose envolvida no efeito citotóxico das amostras AC4, AC7, AC10 e AC23 em células HCT-8, foi utilizada a citometria de fluxo para determinar o potencial transmembrânico mitocondrial das células. Sabe-se que a despolarização mitocondrial é um evento

marcante da via intrínseca da apoptose resultante da desorganização estrutural da membrana dessa organela, a qual foi quantificada pela utilização do corante fluorescente rodamina 123 (KROEMER *et al.*, 1997). Os resultados encontrados demonstraram promoção de despolarização mitocondrial concentração dependente principalmente após 24 horas de tratamento para todos os compostos testados. Os compostos apresentaram efeitos semelhantes entre si e os dados fortalecem a sugestão de morte celular por apoptose pela via intrínseca ou mitocondrial.

Os resultados encontrados para os compostos AC4, AC7, AC10 e AC23 em relação a indução de apoptose em células HCT-8, são corroborados pelos resultados do trabalho de Goodell *et al*. (2008), em que uma série de 9-aminoacridinas substituídas, estruturalmente semelhantes aos compostos aqui estudados, foram capazes de induzir apoptose em células de câncer pancreático, provavelmente, devido a inibição catalítica da enzima topoisomerase II.

Além disso, muitos derivados acridínicos têm a capacidade de promover parada do ciclo celular, em especial na fase G_2/M (GODELL *et al.*, 2008; SKLADANOWSKI, 2002). A parada do ciclo celular reflete uma necessidade da célula em reparar algum dano, caso não seja reparado mecanismos apoptóticos são ativados (ROZENBLAT *et al*., 2008). Sabendo disso, o conteúdo de DNA de células HCT-8 tratadas com os novos compostos acridínicos foi avaliado por citometria de fluxo utilizando o corante fluorogênico iodeto de propídeo. Nesse teste, a quantidade de DNA é diretamente proporcional a intensidade de fluorescência emitida o que permite quantificar as diferentes fases do ciclo celular (G_0/G_1, S e G_2/M). Isso é possível porque após o estímulo proliferativo, a célula sai do estado de repouso (fase G0) e entra no ciclo celular que está dividido em 4 etapas (G_1, S, G_2 e Mitose). Em G_1, a célula se prepara para duplicar o seu DNA. A duplicação do DNA ocorre na fase S, síntese, e em G_2 a célula se prepara para sofrer a mitose. Assim, percebe-se que o conteúdo de DNA por célula vai aumentando de G_1 a G_2 e, em seguida, diminui com a mitose quando surgem as células filhas (FISCHER *et al*., 2007).

A análise do ciclo celular foi realizada em células HCT-8 após o tratamento de 12 e 24 horas com os novos compostos acridínicos. O resultado demonstrou um discreto acúmulo de células na fase G2/M, após 12 horas de incubação apenas na menor concentração testada. Além disso, a fragmentação do DNA foi observada com o aumento da concentração e do tempo de exposição em todas as amostras testadas, determinando desse modo o potencial dessas em induzir morte celular por

apoptose. De modo semelhante, Skladanowaki (2002), demonstrou parada do ciclo celular em G2, acompanhada de inibição da síntese do DNA, pelo ensaio do BrdU, e ativação da via apoptótica em células L-1210 promovida pelo derivado 1-nitroacridina, nitracrina.

Pesquisadores têm demonstrado que o ciclo celular pode ser perturbado por agentes que tem a capacidade de interagir com o DNA nuclear (POOT *et al.*, 1995; LÉONCE *et al.*, 2001). A interação com o DNA é de natureza química e pode acontecer por intercalação ou ligação às fendas do ácido nucléico. Tal propriedade corresponde ao mecanismo de ação de muitos compostos usados na clínica como anticâncer, antimaláricos, antibióticos e antifúngicos. Nesse âmbito, acridinas e seus derivados têm apresentado capacidade de interagir com o DNA nuclear, primordialmente, por intercalação a partir de uma forte ligação não-covalente e reversível com a cadeia polinucleotídica (GAUGAIN *et al.*, 1984; SÁNCHEZ *et al.*, 2006; PALCHAUDHURI; HERGENROTHER, 2007).

Como demonstrado pelos ensaios eletroquímicos realizados por Moura (2008), os novos derivados acridínicos AC4, AC7, AC10 e AC23 apresentaram comportamento característico de interação com o DNA, seja na presença de fita simples ou dupla do ácido nucléico. O teste não permite determinar o tipo de interação com o DNA, porém, é possível sugerir que a ação citotóxica dos compostos deve-se, pelo menos em parte, a esse mecanismo. Para muitos derivados acridínicos a interação com o DNA ocorre por intercalação, a qual é favorecida pela estrutura planar policíclica desses compostos (PALCHAUDHURI; HERGENROTHER, 2007). Neste caso, o efeito promove intensas modificações no metabolismo nuclear e a inibição da síntese de DNA, por exemplo, é inevitável (SKLADANOWAKI, 2002). O resultado encontrado no teste eletroquímico, portanto, está de acordo com o efeito observado no ensaio do BrdU para os novos compostos acridínicos testados, bem como, pode explicar, em parte, a interferência no ciclo celular de células HCT-8, marcada por aumento significativo de fragmentação do DNA, observada na citometria de fluxo.

Dentre os alvos envolvidos no efeito antiproliferativo da classe acridina, estão as enzimas topoisomerases I e II (FINLAY *et al.*, 1996; BAGULEY *et al.*, 1997). Estas são enzimas nucleares que tem a capacidade de reduzir a tensão do DNA durante os processos de replicação, transcrição, recombinação e segregação cromossômica no ciclo celular. Isso ocorre porque as topoisomerases tem a

capacidade de clivar (ação nuclease) uma (topoisomerase I) ou as duas fitas (topoisomerase II) de DNA, permitindo o seu desenrolamento, e religar (ação ligase) a cadeia polinucleotídica (PARCHMENT; PESSINA, 1998). A clivagem da fita do DNA pelas topoisomerases resulta do ataque nucleofílico do sítio ativo tirosínico da enzima sobre a ligação fosfodiéster da dupla-hélice. Para tanto, a enzima tipo I liga-se a porção 3' ou 5' do DNA, enquanto que a enzima tipo II liga-se apenas a porção 5' (REID *et al.*, 1998).

Neste sentido, muitas classes de inibidores de topoisomerase foram introduzidas na clínica como agentes anticâncer. Os derivados da camptotecina, irinotecan e topotecan, são conhecidos inibidores de topoisomerase I. Doxorrubicina, etoposídeo e amsacrina, por sua vez, são exemplos de fármacos que agem por inibir a topoisomerase II. Ativos contra muitos cânceres sólidos e de origem hematológica, o mecanismo de ação destes compostos tem sido explicado pela estabilização do complexo enzima-DNA, com conseqüente formação de DNA fragmentado e indução de morte celular por apoptose (D'ARPA; LIU, 1989; CHARCOSSET *et al*., 1993; POMMIER *et al.*, 2003).

Existe outro mecanismo de ação envolvido na interação com as enzimas topoisomerase. Trata-se da inibição catalítica destas enzimas que se caracteriza por impedir a sua ligação com o DNA evitando a ocorrência do processo de relaxamento promovido por clivagem, seguida de desenrolamento e religação da fita polinucleotídica. Como resultado, o DNA também sofre fragmentação, e a sinalização para a apoptose é deflagrada (D'ARPA; LIU, 1989; POMMIER *et al.*, 2003; FINLAY *et al*., 1996).

As diferentes formas de inibição das topoisomerases, bem como, a intercalação de moléculas ao DNA podem ser avaliadas por vários métodos bioquímicos e biofísicos. Entre esses, podemos citar a determinação do crescimento de leveduras *Saccharomyces cerecisiae* e a análise do relaxamento de DNA, os quais são métodos eficientes, fáceis e muito informativos (REID *et al*., 1998; PEIXOTO *et al*., 2010).

Os novos compostos acridínicos do presente estudo foram, então, submetidos a testes *in vitro* para avaliar o efeito sobre o crescimento de cepas mutantes (deficientes para as enzimas topoisomerase I, Top1Δ; topoisomerase III, Top3Δ; e topoisomerase I e III, Top1/3Δ) da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que de acordo com Reid *et al*. (1998) é considerado um modelo adequado para investigar o

mecanismo de ação de moléculas que possam ter como provável alvo farmacológico as topoisomerases. Desse modo, foi possível observar que na concentração de 50 µg/mL, ocorreu uma maior resistência ao tratamento da cepa mutante Top1Δ (sem topoisomerase I) quando comparada a cepa selvagem BY-4741-WT (tem topoisomerase I, II e III). Além disso, nessa concentração, as cepas Top3Δ (tem topoisomerase I e II) e Top1/3Δ (tem apenas topoisomerase II) foram sensível e resistente ao tratamento, respectivamente. Esses dados sugerem que a topoisomerase I parece ser um alvo importante para que os compostos AC4, AC7, AC10 e AC23 exerçam seu efeito antiproliferativo. Já na concentração de 100 µg/mL, todas as cepas de fungos foram igualmente sensíveis aos compostos testados, sugerindo que o aumento da concentração pode estar envolvendo outros mecanismos de dano e morte celular, além das topoisomerases.

Baseado no resultado anterior, a fim de reforçar o estudo, foi realizado o teste sobre a atividade catalítica da enzima topoisomerase I (Topoisomerase I Drug Screening Kit, TopoGEN, Inc., Columbus, USA) com os compostos acridínicos AC4, AC7, AC10 e AC23 nas concentrações de 50 e 100 µM. Neste ensaio, foi observado que os compostos AC4, AC7, AC10 e AC23 foram capazes de inibir a função catalítica da referida enzima, principalmente na concentração de 100 µM. Portanto, podemos sugerir que o efeito citotóxico inicialmente encontrado dos compostos testados em linhagens tumorais humanas parece envolver a inibição catalítica da enzima topoisomerase I, corroborando com o resultado encontrado no teste com leveduras. Entretanto, torna-se válido considerar a importância da realização de ensaios a nível de topoisomerase II, com o intuito de reforçar o observado no teste com leveduras.

Além disso, a importância é justificada por muitos estudos que demonstram a possibilidade de atuação sobre as duas isoformas da topoisomerase para os compostos acridínicos (DENNY, 1997). Nesse aspecto, o composto DACA, o qual é um derivado acridínico com atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* comprovada, tem a capacidade de intercalar ao DNA celular e interferir com a atividade catalítica das enzimas topoisomerases I e II. Entretanto, este composto, em ensaios clínicos de fase II, não manteve a mesma eficácia antitumoral observada nos ensaios pré-clínicos (CAPONIGRO *et al.,* 2002; DITTRICHA *et al.*, 2003).

Segundo D'Arpa e Liu (1989), a inibição catalítica das enzimas topoisomerases implica em interferência no processo de replicação celular o que

também está de acordo com o resultado observado no ensaio do BrdU para os compostos AC4, AC7, AC10 e AC23, onde houve uma inibição da síntese do DNA de maneira concentração dependente. Adicionalmente, a fragmentação do DNA de células HCT-8 observada na citometria de fluxo, sugestiva de apoptose, após o tratamento com os compostos AC4, AC7, AC10 e AC23 podem, em parte, ser explicadas pela inibição catalítica da enzima topoisomerase I.

Vale ressaltar que outras classes de compostos, além da classe acridina, têm a capacidade de inibir de forma específica a enzima topoisomerase I, apresentando efeitos antitumorais (ANTONY *et al.*, 2006; CASTELLI *et al.*, 2009). Dentre essas, beta-lapachona, um derivado quinônico obtido do produto natural lapachol (isolado de *Tabebuia avellanedae*), destaca-se por exercer seu mecanismo de ação antiproliferativa por inibir especificamente a atividade catalítica da enzima topoisomerase I. Desse modo, beta-lapachona pode induzir apoptose em células tumorais por bloqueio do processo replicativo (PLANCHON *et al.*, 1995). De fato, de acordo com Huang e Pardee (1999), beta-lapachona induziu apoptose em 3 linhagens tumorais de cólon humano (SW-480, SW-620 e DLD-1), as quais, como as células de câncer de cólon, possuem elevada freqüência de mutações em p53, um gene supressor tumoral. Ainda nesse trabalho, os autores demonstraram parada do ciclo celular na fase S/G2 após 24 horas de tratamento com beta-lapachona.

Sabendo que agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes apresentam, em sua maioria, potencial genotóxico e que os compostos AC4, AC7, AC10 e AC23 demonstraram interação com o DNA celular, foi realizado o ensaio cometa utilizando células monocucleares de sangue periférico humano (CMSPH) (FAIRBAIRN *et al.,* 1995; ANDERSON *et al.,* 1994; SILVA *et al.,* 2003). A análise do resultado permitiu verificar que as amostras, diferentemente dos controles positivos, não promoveram dano ao DNA em CMSPH nas concentrações testadas. Este fato está de acordo com os resultados encontrados nos ensaios de citotoxicidade, onde os mesmos não foram ativos em CMSPH, demonstrando sua seletividade para células tumorais.

O resultado encontrado confere um perfil diferenciado em relação a amsacrina, tendo em vista que este, segundo Blasiak *et al.* (2003), mostrou-se genotóxico para células normais e tumorais, também determinado pelo ensaio cometa. Adicionalmente, Backer *et al*. (1990) demonstrou que a amsacrina foi mais potente na indução de mutações e danos cromossômicos em linfócitos de sangue

periférico de camundongos (*in vivo*) e em células de linfoma L-5178-Y (*in vitro*), quando comparado a camptotecina, um inibidor de topoisomerase I.

Por fim, os compostos acridínicos AC4, AC7, AC10 e AC23 aqui estudados podem ser considerados como *templates* para o desenvolvimento de novas moléculas com potencial anticâncer.

6 CONCLUSÃO

Dentre os 22 novos compostos acridínicos sintéticos testados, 4 foram selecionados (AC4, AC7, AC10 e AC23) os quais apresentaram potencial citotóxico seletivo para tumores sólidos, demonstraram baixa toxicidade para CMSPH e foram capazes de inibir a síntese de DNA e de induzir apoptose por via intrínseca em células HCT-8. Além disso, apresentaram potencial de interferir na atividade catalítica da enzima toposiomerase I, não havendo diferença na ação farmacológica (efeito e potência) entre os referidos compostos.

Tabela 11 - Resumo dos resultados dos compostos acridínicos (**AC4, AC7, AC10 e AC23**) em modelos experimentais *in vitro*. (+) Ativo, (-) Inativo.

Amostra	Screening			Estudo do mecanismo de citotoxicidade									
	MTT	Hemólise	PBMC	Tripan	BrdU	AO/BE Apoptose	Densidade celular	Integridade de membrana	Depolarização mitocondrial	Fragmentação do DNA	G_2	Inibição da topoisomerase I	Genotoxicidade
AC4	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
AC7	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
AC10	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
AC23	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-

REFERÊNCIAS

AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. **J. Immunol. Methods**, v. 170, p. 211-224, 1994.

AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). History of cancer. Disponível em:< http://www.cancer.org/>. Acesso em: 6 Nov. 2009.

ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa,** v. 1, p. 37-58, 2007.

ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S.; DURAN, N.; HAUN, M. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL-60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology,** v. 188, p. 261-274, 2003.

ANDERSON, D.; YU, T. W.; PHILLIPS, B. J.; SCHMEZER, P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the Comet assay. **Mutat. Res.,** v. 307, p. 261-271, 1994.

ANTONY, S.; AGAMA, K. K.; MIAO, Z. H.; HOLLINGSHEAD, M.; HOLBECK, S. L.; WRIGHT, M. H.; VARTICOVSKI, L.; NAGARAJAN, M.; MORRELL, A.; CUSHMAN, M.; POMMIER, Y. Bisindenoisoquinoline bis-1,3{(5,6-dihydro-5,11-diketo-11H-indeno[1,2-c]isoquinoline)-6-propylamino}propane bis (trifluoroacetate) (NSC 727357), a DNA intercalator and topoisomerase inhibitor with antitumor activity. **Mol. Pharmacol.**, v. 70, p. 1109-20, 2006.

ARIMONDO, P. B.; HÉLÈNE, C. Design of new anti-cancer agents based on topoisomerase poisons targeted to specific DNA sequences. **Curr. Med. Chem. Anticancer Agents**, v. 1, p. 219-35, 2001.

BACHERIKOV, V. A.; CHANG, J.; LIN, Y.; CHEN, C.; PAN, W.; DONG, H.; LEE, R.; CHOU, T.; SU, T. Synthesis and antitumor activity of 5-(9-acridinylamino)anisidine derivatives. **Bioorg. Med. Chem.,** v. 13, p. 6513-6520, 2005.

BAGULEY, B. C.; LETEURTRE, F.; RIOU, J. F.; FINLAY, G. J.; POMMIER, Y. A Carbamate Analogue of Amsacrine with Activity Against Non-cycling Cells Stimulates Topoisomerase II Cleavage at DNA Sites Distinct From Those of Amsacrine. **Eur. J. Cancer,** v. 33, p. 272-279, 1997.

BARTEK, J.; LUKAS, C.; LUKAS, J. Checking on DNA damage in S phase. **Nature Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 5, p. 792-804, 2004.

BELMONT, P.; BOSSON, J.; GODET, T.; TIANO, M. Acridine and Acridone Derivatives, Anticancer Properties and Synthetic Methods: Where Are We Now? **Anticancer Agents Med. Chem.**, v. 7, p. 139-169, 2007.

BEZERRA, D. P.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; ELMIRO, F. J. M.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antiproliferative Effects of Two Amides, Piperine and Piplartine, from Piper Species. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 60, p. 539-543, 2005.

BEZERRA, D. P.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; ALENCAR, N. M.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; ALVES, A. P.; PESSOA, O. D.; CHAVES, J. H.; SILVEIRA, E. R.; COSTA-LOTUFO, L. V. In vivo growth inhibition of sarcoma 180 by piperlonguminine, an alkaloid amide from the Piper species. **J. Appl. Toxicol.**, v. 28, p. 599-607, 2008.

BLASIAK, J.; GLOC, E.; DRZEWOSKI, J.; WOZNIAK, K.; ZADROZNY, M.; SKÓRSKI, T.; PERTYNSKI, T. Free radical scavengers can differentially modulate the genotoxicity of amsacrine in normal and cancer cells. **Mutat. Res.,** v. 535, p. 25-34, 2003.

BOATRIGHT, K. M.; RENATUS, M.; SCOTT, F. L.; SPERANDIO, S.; SHIN, H.; PEDERSEN, I. M.; RICCI, J. E.; EDRIS, W. A.; SUTHERLIN, D. P.; GREEN, D. R.; SALVESEN, G. S. A unified model for apical caspase activation. **Mol. Cell**, v.11, p. 529-541, 2003.

BODE, A. M.; DONG, Z. Cancer prevention research - then and now. **Nat. Rev. Cancer**, v. 9, p. 508-516, 2009.

BOUFFIER, L.; BALDEYROU, B.; HILDEBRAND, M-P.; LANSIAUX, A.; DAVID-CORDONNIER, M-H.; CARREZ, D.; CROISY, A.; RENAUDET, O.; DUMYA, P.; DEMEUNYNCK, M. Amino- and glycoconjugates of pyrido[4,3,2-kl]acridine. Synthesis, antitumor activity, and DNA binding. **Bioorg.Med. Chem.**, v. 14, p. 7520-7530, 2006.

BU, X.; CHEN, J.; DEADY, L. W.; DENNY, W. A. Synthesis and cytotoxicity of potential anticancer derivatives of pyrazolo(3,4,5-kl)acridine and indolo(2,3-a)acridine. **Tetrahedron**, v. 58, p. 175-181, 2002.

BURLINSON, B.; TICE, R. R.; SPEIT, G.; AGURELL, E.; BRENDLER-SCHWAAB, S. Y.; COLLINS, A. R.; ESCOBAR, P.; HONMA, M.; KUMARAVEL, T. S.; NAKAJIMA, M.; SASAKI, Y. F.; THYBAUD, V.; UNO, Y.; VASQUEZ, M.; HARTMANN, A. Fourth international workgroup on genotoxicity testing: results of the in vivo comet assay workgroup. **Mutat. Res.**, v. 627, p. 31-35, 2007.

CAPONIGRO, F.; DITTRICH, C.; SORENSEN, J. B.; SCHELLENS, J. H. M.; DUFFAUD, F.; ARES, L. P.; LACOMBE, D.; DE BALINCOURT, C.; FUMOLEAU, P. Phase II study of XR 5000, an inhibitor of topoisomerases I and II, in advanced colorectal cancer. **Eur. J. Cancer**, v. 38, p. 70-74, 2002.

CARVALHO, P.; TIRNAUER, J. S.; PELLMAN, D. Surfing on microtubule ends. **Trends Cell Biol.**, v. 5, p. 229-237, 2003.

CASTELLI, S.; CAMPAGNA, A.; VASSALLO, O.; TESAURO, C.; FIORANI, P.; TAGLIATESTA, P.; OTERI, F.; FALCONI, M.; MAJUMDER, H. K.; DESIDERI, A. Conjugated eicosapentaenoic acid inhibits human topoisomerase IB with a mechanism different from camptothecin. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 486, p. 103-10, 2009.

CHARCOSSET, J. Y.; SOUES, S.; LAVAL, F. Poisons of DNA topoisomerases I and II. **Bull. Cancer**, v.80, p. 923-954, 1993.

CHEN, C-H.; LIN, Y-W.; ZHANG, X.; CHOU, T-C; TSAI, T-J.; KAPURIYA, N.; KAKADIYA, R.; SU, T-L. Synthesis and in vitro cytotoxicity of 9-anilinoacridines bearing N-mustard residue on both anilino and acridine rings. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 44, p. 3056-3059, 2009.

CHILIN, A.; MARZARO, G.; MARZANO, C.; VIA, L. D.; FERLIN, M. G.; PASTORINI, G.; GUIOTTO, A. Synthesis and antitumor activity of novel amsacrine analogs: The critical role of the acridine moiety in determining their biological activity. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 17, p. 523-529, 2009.

CHING, L-M.; FINLAY, G J.; JOSEPH, W. R.; BAGULEY, B. C. Comparison of the cytotoxicity of amsacrine and its analogue Cl-921 against cultured human and mouse bone marrow tumour cells. **Eur. J. Cancer Clin. Oncol.**, v. 26, p. 49-54, 1990.

CHINNAIYAN, A. M.; O'ROURKE, K.; TEWARI, M.; DIXIT, V. M. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. **Cell**, v. 81, p. 505-512, 1995.

CHINNAIYAN, A. M.; O'ROURKE, K.; TEWARI, M.; CORY, S.; ADAMS, J. M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-ordeath APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. **EMBO J.**, v. 14, p. 5579-5588, 1995.

COSTA-LOTUFO, L. V.; ARAÚJO, E. C. C.; LIMA, M. A. S.; MORAES, M. E. A.; PESSOA, C.; SILVEIRA, E. R.; MORAES, M. O. Antiproliferative effects of abietane diterpenoids isolated from Hyptis martiusii Benth (Labiatae). **Pharmazie**, v. 58, p. 78-79, 2004.

COSTA-LOTUFO, L. V.; CUNHA, G. M.; FARIAS, P. M.; VIANA, G. S.; CUNHA, K. M. A.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. Gramosa, N. V.; Rao, V. S. N. The cytotoxic and embriotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from Copaifera langsdorffi oleo-resin. **Toxicon,** v. 40, p. 1231-1234, 2002.

COSTA, P. M.; FERREIRA, P. M.; BOLZANI, V. D.; FURLAN, M.; SANTOS V. A.; CORSINO, J.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.;

MONTENEGRO, R. C.; PESSOA, C. Antiproliferative activity of pristimerin isolated from Maytenus ilicifolia (Celastraceae) in human HL-60 cells. **Toxicol. Vitro**, v. 22, p. 854-863, 2008.

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

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents. **Chem. Rev.,** v. 109, p. 3012-3043, 2009.

D'ARPA, P.; LIU, L. F. Topoisomerase-targeting antitumor drugs. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 989, p. 163-177, 1989.

DANIAL, N. N.; KORSMEYER, S. J. Cell death: critical control points. **Cell**, v. 116, p. 205-219, 2004.

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

DE ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quím. Nova**, v. 28, p. 118-129, 2005.

DENNY, W. A. Acridine derivatives as chemotherapeutic agents. **Curr. Med. Chem.**, v. 18, p. 1655-1665, 2002.

DENNY, W. A. Dual topoisomerase I/II poisons as anticancer drugs. **Expert Opin. Investig. Drugs**, v. 6, p. 1845-1851, 1997.

DI GIORGIO, C.; SHIMI, K.; BOYER, G.; DELMAS, F.; GAL, J-P. Synthesis and antileishmanial activity of 6-mono-substituted and 3,6-di-substituted acridines obtained by acylation of proflavine. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 42, p. 1277-1284, 2007.

DIMRI, G. P.; LEE, X.; BASILE, G.; ACOSTA, M.; SCOTT, G.; ROSKELLEY, C.; MEDRANO, E. E.; LINSKENS, M.; RUBELJ, I.; PEREIRA-SMITH, O.; PEACOCKE, M.; CAMPISI, J. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 92, n. 20, p. 9363-9367, 1995.

DITTRICHA, C.; COUDERTB, B.; PAZ-ARESC, L.; CAPONIGROD, F.; SALZBERGE, M.; GAMUCCIF, T.; PAOLETTIG, X.; HERMANSG, C.; LACOMBEG, D.; FUMOLEAUH, P. Phase II study of XR 5000 (DACA), an inhibitor of topoisomerase I and II, administered as a 120-h infusion in patients with non-small cell lung cancer. **Eur. J. Cancer,** v. 39, p. 330-334, 2003.

DOLL, R.; PETO, R. The cause of cancer. Quantitative estimates of available risks of cancer in the United States today. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 66, p. 1192-1308, 1981.

DONEPUDI, M.; MAC SWEENEY, A.; BRIAND, C.; GRÜTTER, M. G. Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. **Mol. Cell**, v. 11, p. 543-549, 2003.

DU, C.; FANG, M.; Li, Y.; Li, L.; WANG, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. **Cell**, v. 102, p. 33-42, 2000.

DUVALL, E.; WYLLIE, A. H.; MORRIS, R. G. Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). **Immunology**, v. 56, p. 351-358, 1985.

EL-HAMOULY, W. S.; RU.CKDESCHEL, J. C.; ARCHER, S. Preparation and antitumor activity of an *N*-methylcarbamate derivative of amsacrine. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 28, p. 913-916, 1993.

FADOK, V. A.; VOELKER, D. R.; CAMPBELL, P. A.; COHEN, J. J.; BRATTON, D. L.; HENSON, P. M. Exposure of phosphatidylserin on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrofages. **J. Immunol.**, v. 148, p. 2207-2216, 1992.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The Comet Assay: a comprehensive review. **Mutat. Res.**, v. 339, p. 37-59, 1995.

FERGUSON, L. R.; DENNY, W. A. The genetic toxicology of acridines. **Mutat. Res.**, v. 258, p. 123-60, 1991.

FERGUSON, L. R.; ZIJL; P. V.; BAGULEY, B. C. Comparison of the mutagenicity of amsacrine with that of a new clinical analogue, CI-921. **Mutat. Res.**, v. 204, p. 207-217, 1988.

FINLAY, G. J.; RIOU, J. F.; BAGULEY, B. C. From amsacrine to DACA (n-[2-(dimethylamino)ethyl]acridine-4-carboxamide): selectivity for topoisomerases I and II among acridine derivatives. **Eur. J. Cancer**, v. 32A, p. 708-714, 1996.

FISCHER, P. M.; GLOVER, D. M.; LANE, D. P.Targeting cell cycle. **Drug Discov. Today Therap. Strateg.,** v. 4, p. 417-423, 2004.

GAUGAIN, B.; MARKOVITS, J.; LE PECQ, J.-B.; ROQUES, B. P. DNA polyintercalation: comparison of DNA binding properties of an acridine dimer and trimer. **Fed. Eur. Biochem. Soc.**, v. 169, p. 123-126, 1984.

GOODELL, J. R.; OUGOLKOV, A. V.; HIASA, H.; KAUR, H.; REMMEL, R.; BILLADEAU, D. D.; FERGUSON, D. M. Acridine-based agents with topoisomerase II activity inhibit pancreatic cancer cell proliferation and induce apoptosis. **J. Med. Chem.**, v. 51, p. 179-182, 2008.

HAHN, W. C.; WEINBERG, R. A. Modelling the molecular circuitry of cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, p. 331-341, 2002.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

HARTMANN, A.; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (Comet assay). **Toxicol. Lett.**, v. 90, p. 183-188, 1997.

HUANG, L.; PARDEE, A. B. β-Lapachone induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. **Mol. Med.**, v. 5, p. 711-720, 1999.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2008**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2009. Disponível em:< http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/versaofinal.pdf>. Acesso em: 6 novembro 2009.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2010**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2009. p. 23-24. Disponível em:< http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/versaofinal.pdf>. Acesso em: 2 fev. 2010.

KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v. 432, p. 316-323, 2004.

KERR, J. F. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, v. 26, p. 239-257, 1972.

KERR, J. F. R.; GOBE, G. C.; WINTERFORD, C. M.; HARMON, B. V. Anatomical methods in cell death. **Methods Cell Biol.**, v. 46, p. 1-27, 1995.

KESHELAVA, N.; TSAO-WEI, D.; REYNOLDS, P. C. Pyrazoloacridine Is Active in Multidrug-resistant Neuroblastoma Cell Lines with Nonfunctional p531. **Clin. Cancer Res.**, v. 9, p. 3492-3502, 2003.

KEYHANI, E.; KHAVARI-NEJAD, S.; HEYHANI, J.; ATTAR, F. Acriflavine-mediated apoptosis and necrosis in yeast candida utilis. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1171, p. 284-291.

KOZURKOVÁ, M.; SABOLOVÁ, D.; JANOVEC, L.; MIKES, J.; KOVAL, J.; UNGVARSKY, J.; STEFANISINOVÁ, M.; FEDOROCKO, P.; KRISTIANB, P.; IMRICH, J. Cytotoxic activity of proflavine diureas: Synthesis, antitumor, evaluation and DNA binding properties of 10,100-(acridin-3,6-diyl)-30,300-dialkyldiureas. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 16, p. 3976-3984, 2008.

KROEMER, G.; EL-DEIRY, W. S.; GOLSTEIN, P.; PETER, M. E.; VAUX, D.; VANDENABEELE, P.; ZHIVOTOVSKY, B.; BLAGOSKLONNY, M. V.; MALORNI, W.; KNIGHT, R. A.; PIACENTINI, M.; NAGATA, S.; MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell Death Differ.**, v. 2, suppl. 2, p. 1463-1467, 2005.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. **Physiol. Rev.**, v. 87, p. 99-163, 2007.

KROEMER, G.; POUYSSEGUR, J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. **Cancer Cell**, v. 13, p. 472-482, 2008.

KROEMER, G.; ZAMZAMI, N.; SUSIN, S. A. Mitochondrial control of apoptosis. **Immunol. Today**, v. 18, p. 44-51, 1997.

KRYSKO, D. V.; BERGHE, T. V.; D'HERDE, K. V. P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. **Methods**, v. 44, p. 205-221, 2008.

KUMMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. **Robbins and Cotran Pathologic basis of diseases**. 7th ed. Philadelphia: WB Saunders, 2004.

LEBLANC, H. N.; ASHKENAZI, A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. **Cell Death Differ.**, v. 10, p. 66-75, 2003.

LÉONCE, S.; PÉREZ, V.; LAMBEL, S.; PEYROULAN, D.; TILLEQUIN, F.; MICHEL, S.; KOCH, M.; PFEIFFER, B.; ATASSI, G.; HICKMAN, J. A.; PIERRÉ, A. Induction of cyclin E and inhibition of DNA synthesis by the novel acronycine derivative S23906-1 precede the irreversible arrest of tumor cells in S phase leading to apoptosis. **Mol. Pharmacol.,** v. 60, p. 1383-1391, 2001.

LERMAN, L. S. Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. **J. Mol. Biol.**, v. 3, p. 18-30, 1961.

LI, H.; ZHU, H.; XU, C. J.; YUAN J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. **Cell**, v. 94, p. 491-501, 1998.

LOCKSLEY, R. M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. **Cell**, v. 104, p. 487-501, 2001.

LORUSSO, P.; WOZNIAK, A. J.; POLIN, L.; CAPPS, D.; LEOPOLD, W. R.; WERBEL, L. M.; BIERNAT, L.; DAN, M. E.; CORBETT, L. H. Antitumor efficacy of PD115943 (NSC 366140) against solid tumors of mice. **Cancer Res.**, v. 50, p. 4900-4905, 1990.

LUO, J.; SOLIMINI, N. L.; ELLEDGE, S. J. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. **Cell**, v. 6, p. 823-837, 2009.

LUO, X.; BUDIHARDJO, I.; ZOU, H.; SLAUGHTER, C.; WANG, X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. **Cell**, v. 94, p. 481-490, 1998.

MACKLIS, J. D.; MADISON R. D. Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. **J. Neurosci. Methods**, v. 31, p. 43-46, 1990.

MAGNANO, A.; SPARAPANI, S.; LUCCIARINI, R.; MICHELA, M.; AMANTINI, C.; SANTONIB, G.; ANTONINI, I. Synthesis and biological evaluation of indazolo[4,3-bc]-[1,5]naphthyridines(10-aza-pyrazolo[3,4,5-kl]acridines): a new class of antitumor agents. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 12, p. 5941-5947, 2004.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis and necrosis. Na overview of cell death. **Am. J. Path.**, v. 146, p. 3-15, 1995.

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

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Mammalian cyclin dependent kinases. **Trends Biochem. Sci.**, v. 30, p. 630-641, 2005.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 1, p. 222-231, 2001.

MANN, J. Natural products in câncer chemotherapy: past, present and future. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, p. 143-148, 2002.

MILITAO, G. C. G.; DANTAS, I. N. F.; PESSOA, C.; FALCÃO, M. J. C.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; CURI, R.; LIMA, T.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Induction of apoptosis by pterocarpans from Platymiscium floribundum in HL-60 human leukemia cells. **Life Sci.**, v. 78, p. 2409-2417, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 16, p. 55-63, 1983.

NAGATA, S. Apoptosis by death factor. **Cell**, v. 88, p. 355-365, 1997.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. **J. Nat. Prod.**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NICOLAOU, K. C.; WINSSINGER, N.; PASTOR, J.; NINKOVIC, S.; SARABIA, F.; HE, Y.; VOURLOUMIS, D.; YANG, Z.; LI, T.; GIANNAKAKOU, P.; HAMEL E. Synthesis of epothilones A and B in solid and solution phase. **Nature**, v. 387, p. 238-239, 1997.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, p. 5421-5426, 2000.

OPPEGARD, L. M.; OUGOLKOV, A. V.; LUCHINI, D. N.; SCHOON, R. A.; GOODELL, J. R.; KAUR, H; BILLADEAU, D. D.; FERGUSON, D. M.; HIASA, H. Novel acridine-based compounds that exhibit an anti-pancreatic cancer activity are catalytic inhibitors of human topoisomerase II. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 602, p. 223-229, 2009.

PALCHAUDHURI, R.; HERGENROTHER, P. J. DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 18, p. 497-503, 2007.

PARCHMENT, R. E.; PESSINA, A. Topoisomerase I inhibitors and drug resistance. **Cytotechnology**, v. 27, p. 149-164, 1998.

PEIXOTO, P.; BAILLY, C.; DAVID-CORDONNIER, M. H. Topoisomerase I-mediated DNA relaxation as a tool to study intercalation of small molecules into supercoiled DNA. **Methods Mol. Biol.**, v. 613, p. 235-56, 2010.

PESSOA, C.; SILVEIRA, E. R.; LEMOS, T. L.; WETMORE, L. A.; MORAES, M. O.; LEYVA, A. Antiproliferative effects of compounds derived from plants of Northeast Brazil. **Phytother. Res.**, v. 14, p. 187-191, 2000.

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

PETRIKAITÈ, V.; TARASEVICIUS, E.; PAVILONIS, A. New ethacridine derivatives as the potential antifungal and antibacterial preparations. **Medicina (Kaunas)**, v. 43, p. 8, 2007.

POMMIER, Y.; REDON, C.; RAO, V. A.; SEILER, J. A.; SORDET, O.; TAKEMURA, H.; ANTONY, S,; MENG, L.; LIAO, Z.; KOHLHAGEN, G.; ZHANG, H.; KOHN, K. W. Repair of and checkpoint response to topoisomerase I-mediated DNA damage. **Mutat. Res.**, v. 532, p. 173-203, 2003.

POOT, M.; HILLER, K. H.; HEIMPEL S.; HOEHN, H. Distinct patterns of cell cycle disturbance elicited by compounds interfering with DNA topoisomerase I and II activity. **Exp. Cell Res.**, v. 218, p. 326-30, 1995.

REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K. D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacol. Ther.**, v. 99, p. 1-13, 2003.

REID, R. J. D.; BENEDETTI, P.; BJORNSTI, M-A. Yeast as a model organism for studying the actions of DNA topoisomerase-targeted drugs. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1400, p. 289-300, 1998.

RICCI, M. S.; ZONG, W-X. Chemotherapeutic Approaches for Targeting Cell Death Pathways. **Oncologist**, v. 1, p.342-357, 2006.

RIEGER, P. T. The biology of cancer genetics. **Semin. Oncol. Nurs.**, v. 20, p. 145-154, 2004.

ROZENBLAT, S.; GROSSMAN, S.; BERGMAN, M.; GOTTLIEB, H.; COHEN, Y.; DOURAT, S. Induction of G_2/M arrest and apoptosis by sesquiterpene lactones in human melanoma cells lines. **Biochem. Pharmacol.**, v. 75, p. 369-382, 2008.

SÁNCHEZ, I.; RECHES, R.; CAIGNARD, D. H.; RENARD, P.; PUJOL, M. D. Synthesis and biological evaluation of modified acridines: the effect of N- and O- substituent in the nitrogenated ring on antitumor activity. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 41, p. 340-352, 2006.

SAVILL, J.; DRANSFIELD, I.; HOGG, N.; HASLETT, C. Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. **Nature**, v. 343, p. 170-173, 1990.

SCAFFIDI, C.; FULDA, S.; SRINIVASAN, A. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. **EMBO J.**, v. 17, p. 1675-1687, 1998.

SCHWARTSMANN, G.; WORKMAN, P. Anticancer drug screening and discovery in the 1990s: a European perspective. **Eur. J. Cancer**, v. 29, p. 3-14, 1993.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicologia**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

SILVA, T. G. **Síntese e avaliação da atividade biológica de novos derivados acridino-tiazolidínicos e acridino-imidazolidínicos**. Tese (Doutorado) - Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

SKALTSOUNIS, A. L.;, MITAKU, S.; TILLEQUIN, F. Acridone alkaloids. **The Alkaloids: Chemistry and Biology**, v. 54, p. 259-377, 2000.

SKLADANOWSKI, A. Modulation of G_2 arrest enhaces cell death induced by the antitumor 1-nitroacridine derivative, Nitracrine. **Apoptosis**, v. 7, p. 347-359, 2002.

SOUZA, M. V. N.; PINHEIRO, A. C.; FERREIRA, M. L.; GONÇALVES, R. S. B.; LIMA, C. H. C. Natural Products in Advance Clinical Trials Applied to Câncer. **Rev. Fitos**, v. 3, n. 2, p. 25-41, 2007.

THORNBERRY, N. A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. **Science**, v. 281, p. 1312-1316, 1998.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutag.**, v. 35, p. 206-221, 2000.

TINARI, A.; GIAMMARIOLI, A. M.; MANGANELLI, V.; CIARLO, L.; MALORNI, W. Analyzing morphological and ultrastructural features in cell death. **Methods in Enzymol.**, v. 442, p. 1-26, 2008.

VAN CRUCHTEN, S.; VAN DEN BROECK, W. Morphological and Biochemical Aspects of Apoptosis, Oncosis and Necrosis. **Anat. Histol. Embryol.**, v. 31, p. 214-223, 2002.

VERHAGEN, A. M.; EKERT, P. G.; PAKUSCH, M.; John Silke, J.; CONNOLLY, L. M.; REID, G. E.; MORITZ, R. L.; SIMPSON, R. J.; VAUX, D. L. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. **Cell**, v. 102, p. 43-53, 2000.

WAJANT, H.; PFIZENMAIER, K.; SCHEURICH, P. Tumor necrosis factor signaling. **Cell Death Differ.**, v. 10, p. 45-65, 2003.

WEI, M. C.; ZONG, W. X.; CHENG, E. H. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. **Science**, v. 292, p. 727-730, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Regulatory situation of herbal medicine. **Bull. World Health Organ.**, 2006. Disponível em:< http://www.who.int/en/>. Acesso em: 6 Nov. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World Cancer Report**: 2008. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2009.

WYLLIE, A. H.; KERR, J. F. R.; CURRIE, A. R. Cell death: the significance of apoptosis. **Int. Rev. Cytol.**, v. 68, p. 251-306, 1980.

YANG, P.; YANG, Q.; QIANA, X. Novel DNA bis- intercalators of isoquinolino[4,5-bc]acridines: design, synthesis and evaluation of cytotoxic activity. **Tetrahedron**, v. 61, p. 11895-11901, 2005.

ZUCO, V.; SUPINO, R.; RIGHETTI, S. C.; CLERIS, L.; MARCHESI, E.; PASSERINE- GAMBACORTI, C.; FORMELLI, F. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. **Cancer Lett**., v. 175, p. 17-25, 2002.