



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA-RENORBIO**

**FÁTIMA DE CÁSSIA EVANGELISTA DE OLIVEIRA**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOSSISTEMAS CONTENDO TAMBJAMINAS:  
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E VALIDAÇÃO *IN VITRO* EM LINHAGEM  
DE CÂNCER COLORRETAL (HCT-116)**

**FOTALEZA**

**2017**

FÁTIMA DE CÁSSIA EVANGELISTA DE OLIVEIRA

DESENVOLVIMENTO DE NANOSSISTEMAS CONTENDO TAMBJAMINAS:  
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E VALIDAÇÃO *IN VITRO* EM LINHAGEM DE  
CÂNCER COLORRETAL (HCT-116)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará-RENORBIO, como requisito à obtenção do título de doutor em Biotecnologia.  
Área de concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Claudia do Ó Pessoa.

Coorientadora: Dra. Marcília Pinheiro da Costa.

FORTALEZA

2017

FÁTIMA DE CÁSSIA EVANGELISTA DE OLIVEIRA

DESENVOLVIMENTO DE NANOSSISTEMAS CONTENDO TAMBJAMINAS:  
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E VALIDAÇÃO *IN VITRO* EM LINHAGEM DE  
CÂNCER COLORRETAL (HCT-116)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará-RENORBIO, como requisito à obtenção do título de doutor em Biotecnologia.  
Área de concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Claudia do Ó Pessoa.  
Coorientadora: Dra. Marcília Pinheiro da Costa.

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Prof. Dr Jeanlex Soares de Sousa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr José Ferreira Nunes  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Prof. Dr Roberto Nicolete  
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-Ce)

---

Dr. Guilherme Julião Zocolo  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA-Ce)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

D32d Oliveira, Fátima de Cássia Evangelista de.

Desenvolvimento de nanossistemas contendo tambjamins: Caracterização físico-química e validação *in vitro* em linhagem de câncer colorretal (HCT-116) / Fátima de Cássia Evangelista de Oliveira. – 2017.

145 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Programade Pós-Graduação em Biotecnologia (Rede Nordeste de Biotecnologia), Fortaleza, 2017.

Orientação: Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa.

Coorientação: Profa. Dra. Marcília Pinheiro da Costa.

1. Nanocarreadores. 2. Alcaloides bupirrólicos. 3. Nanopartículas. I. Título.

CDD 660.6

Dedico esta Tese a Deus e a minha  
família por sempre estarem ao meu lado

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, por ser tão maravilhoso sempre comigo e estar meu lado em todos os momentos, iluminando meu caminho e sempre colocando anjos em minha caminhada.

A minha **mãe** Maria Marlene Evangelista de Oliveira ao meu **pai** João Martins de Oliveira (*in memória*), por sempre me apoiarem, por terem proporcionado o melhor para que eu pudesse realizar meus sonhos, por todo amor e dedicação dado em todas as fases da minha vida.

As minhas **irmãs**: Maria Celestina Sabino de Oliveira (Tina) por sempre apostar, apoiar e financiar meus estudos, pelas brigas na letra feia, nas tarefas realizadas erradas, pois me fez ainda quando criança, não querer escutar o ERRADO que dizia tão enfatizado, aprender toda a lição para não precisar ser cobrada em nada e a minha outra irmã Francisca Sabino de Oliveira (Fran) por sempre ser animada e por sua raiva ser rapidamente passageira, por isso sempre discutíamos, mas pouco tempo depois parecia não ter acontecido nada.

A minha orientadora, Profa. Dra. **Claudia** do Ó Pessoa, por ter me recebido e acreditado em meu trabalho mesmo sem ter me conhecido antes deste desafio, além do exemplo de profissional e pessoa humana que a senhora é. Que a senhora jamais perca essa essência de ESTAR preocupada com o outro.

A minha coorientadora Profa. Dra. **Marcília** Pinheiro da Costa pelo exemplo de estudante de doutorado (época em que a conheci), de profissional correta por abrir o caminho para ERA NANOTECNOLÓGICA.

Ao Prof. Dr. **Martin Banwell** da Universidade Nacional Australiana, por ter sintetizado e cedido às moléculas que foram objeto de estudo do presente trabalho.

Ao Prof. Dr. **Yves Pommier** do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, por sua importante colaboração referente aos testes realizados nas linhagens DT40.

A EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) representada por Dr. **Guilherme** Julião Zocolo e Dr. **Paulo** Riceli Vasconcelos por abrir as portas do laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais etapa necessária para a realização de parte das análises necessárias para esse estudo.

Ao Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho (**CENAPAD**) por disponibilizar o ambiente virtual para a realização dos ensaios *in silico*.

Aos pesquisadores e/ou professores, Dr. **Washington** Araújo Barros, **Danilo** Rocha e principalmente ao Dr. **Bruno Cavalcanti** pelo apoio, sugestões e por estarem sempre disponíveis a discussões científicas.

A todos os amigos do LOE/ UFC, pelas amizades construídas, pela paciência e por sempre estarem dispostos a ajudar. Em especial, **Augusto** César, **Sarah** Sant'Anna, **Renan** Foca, **Teiliane** Rodrigues, **Kaio** Moraes, **Dayse** Lima, **Cristiana** Libardi, **Carlos** Paier, Maria **Júlia** Bezerra, José **Neto**, **Adelânia** Roque, **Sarah Damasceno** e que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente com este trabalho.

Aos amigos **Daniel** Pascoalino e **Bruno Marques** por realizarem estudos nas linhagens DT40 e pelos ensinamentos do docking molecular, respectivamente.

Meu muito obrigada, a **Silvana** França, por todo apoio e companheirismo, especialmente por ter me ensinado e treinado sobre cultura de células e as metodologias no laboratório durante o período do doutorado.

As amigas (cafussuzinhas) **Andréa** Felinto Moura, Maria **Claudia** dos Santos **Luciano** e Maria Francilene Souza da Silva (**Fran**) pela amizade, carinho e ajudatanto dentro como fora do laboratório, sem vocês jamais teria conseguido.

Aos amigos, (Tios) **Jorge** Cardoso e **Vera** Leite, **Sabrina** Leite e **Felipe** Jesuino (casal perfeito) **Aline** Batista, **Samara** Cardoso, **Sarah Ramos** e **Hemerson** Lima que mesmo não fazendo parte do dia a dia, mas sempre estão na torcida de cada etapa finalizada e cada vitória conseguida.

Este trabalho foi realizado com o auxílio das seguintes instituições: Rede Nordeste de Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará (**RENORBIO- UFC**), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) e Fundação Cearense de Amparo a Pesquisa (**FUNCAP**).

“Não importam as circunstâncias e não importam as adversidades, por mais difícil que seja eu vou seguir em frente e vou reunir todas as forças para que eu me transforme cada vez mais na pessoa que eu decidir ser.”

Madre Teresa de Calcutá



## RESUMO

O câncer tornou-se um grande problema de saúde pública mundial, e atualmente é responsável por uma em cada seis mortes no mundo. Os tumores malignos que acometem o cólon e o reto ocupam o terceiro lugar na incidência de câncer e é a quarta principal causa de mortalidade relacionada ao câncer em todo o mundo. As Tambjamins são alcalóides cuja principal função é auxiliar na defesa química de seus organismos contra predadores, estudos mostraram que essa substância exibe uma ampla classe de atividade biológica, inclusive propriedades antitumorais, porém com elevada toxicidade. Nesse contexto, a nanotecnologia permite a criação de nanofármacos, em escala nanométrica ( $10^{-9}$ ), que apresentem propriedades físico-químicas distintas e que podem ser utilizados no diagnóstico, na prevenção, na terapia ou em produtos direcionados para a saúde, inclusive o câncer. Desse modo, objetivo do presente estudo foi encapsular e caracterizar os nanossistemas, contendo Tambjamins (I e J) e avaliar seu efeito antiproliferativo *in vitro* sobre linhagens celulares tumorais e não tumorais. Para isso dois sistemas de encapsulamento foram testados PLGA e Lipossomas. As caracterizações químicas se deram por meio da determinação do tamanho de partículas, potencial zeta, estabilidade e percentual de encapsulamento. A atividade biológica foi testada num painel de linhagens tumorais, pelo ensaio do MTT e SRB, e considerando a atividade biológica da droga livre comparada aos nanossistemas, a linhagem HCT 116 foi escolhida para determinação do possível mecanismo de ação desses compostos. Ensaio de proliferação celular, integridade de membrana, ciclo celular, potencial transmembrânico mitocondrial, mecanismo de morte e forforilação de H2Ax foram determinados por citometria de fluxo. O ensaio do Cometa foi realizado para avaliação de dano de DNA. Coloração de HE e Giensa foram utilizadas para determinação das alterações morfológicas e formação de micronúcleos, respectivamente. Ensaio *in silico*, para determinação de propriedades ADME/Tox (FAFDrug3) e busca por alvos (*Pharmmapper*) foram utilizados para predições fármaco-biológicas. Os resultados mostraram que o método de encapsulamento por lipossoma foi o mais adequado para ambas as Tambjamins, permitiu a formação de nanossistemas estáveis e com elevada taxa de encapsulamento (>90%). As Tambjamins I e J mostraram efeitos citotóxicos frente todas às linhagens testadas. Elas parecem induzir a morte celular por apoptose, com parada do ciclo celular, despolarização mitocondrial, presença de danos de DNA e formação de micronúcleos de maneira concentração e tempo dependente, além de promover a modulação do pH intracelular. Os resultados com as Tambjaminsencapsuladas mostraram que esses nanossistemas quando comparado com a droga livre apresentam um efeito mais prolongado, denotando que os compostos apresentam melhorpotencialfarmacológico.

**Palavras-chave:** Nanocarreadores. Alcaloides bipirrólicos. Nanopartículas.

## ABSTRACT

Cancer has progressively become a major public health problem, is responsible for one in every six deaths in the world. Malignant tumors affecting the colon and rectum are ranked third in cancer incidence and are the fourth cause of cancer-related global mortality. Tambjamins are alkaloids whose main natural function is the chemical defense of their organisms against predators, studies have shown that these substances exhibit a broad class of biological activity, including antitumor properties, but with high toxicity. In this context, nanotechnology provides the creation of nano-drugs, at nanoscale ( $10^{-9}$ ), that present different physico-chemical properties and that can be used in the diagnosis, prevention, therapy or products directed to health, including the cancer. Thus, the aim of the present study was to encapsulate and characterize two nanosystems, containing Tambjamins (I and J) and to evaluate their antiproliferative effects *in vitro* on tumor and non-tumor cell lines. For this, the encapsulation systems were tested for PLGA and Liposomes. The chemical characterization was carried out by determination of particle size, zeta potential, stability and encapsulation rates. Biological activity was tested in a panel of tumor cell lines by the MTT and SRB assays and considering the biological activity of the drug-free compounds compared to nanosystems, the HCT 116 cell line was chosen to determine the mechanisms of action of these compounds. Tests of cell proliferation, membrane integrity, cell cycle, mitochondrial transmembrane potential, mechanism of cell death and phosphorylation of H2Ax were determined by flow cytometry. The Comet assay was performed to assess DNA damage. Staining of Panotico and Giemsa were used to determine the morphological changes and formation of micronuclei, respectively. *In silico* assays for the determination of ADME/Tox (FAFDrug3) and targeting properties (*Pharmmapper*) were used for drug-biological predictions. The results showed that liposome encapsulation method was the most suitable for both Tambjamins, allowing the formation of stable nanosystems with high encapsulation rate (> 90%). Tambjamins I and J showed cytotoxic effects against all tested cell lines. They appear to induce cell death by apoptosis, with cell cycle arrest, mitochondrial depolarization, presence of DNA damage and formation of micronuclei in a concentration and time dependent manner, besides promoting intracellular pH modulation. The results with the encapsulated Tambjamins showed these nanosystems compared to the free drug have a longer effect, denoting that the compounds have a great pharmacology potential.

**Keywords:** Nanocarreadores. Bipyrrolic alkaloids. Nanoparticles.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer estimados para 2016/2017 por sexo no Brasil, exceto câncer de pele não melanoma. .....	22
Figura 2-	Características essenciais da progressão do câncer.....	23
Figura 3-	Números de de câncer colorretal por região segundo dados do INCA, 2016.....	25
Figura 4-	Esquema do desenvolvimento do pólipó adenomatoso a adenocarcinoma.....	26
Figura 5-	Esquema de fases do ciclo celular.....	27
Figura 6-	Níveis de ciclina durante o ciclo celular.....	28
Figura 7-	Atividade dos agentes quimioterápicos antineoplásicos, dependendo da fase do ciclo celular.....	30
Figura 8-	Diferentes fármacos antimitóticos em diferentes locais dos microtúbulos.....	31
Figura 9-	Progressão da morte celular. Características morfológicas de necrose e apoptose.....	35
Figura 10-	Características das vias de morte celular autofágica, apoptótica e necrótica. LC3- cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos; PS- fosfatidilserina; ROS- espécies reativas de oxigênio. .....	36
Figura 11-	Progressão anual de artigos publicados ao longo de 10 anos nas bases PubMed e <i>Web of Science</i> , associando os termos “ Nanotechnology AND cancer”. .....	37
Figura 12-	Número de publicações com os termos “Nanotechnology AND cancer” na base <i>Web of Science</i> .....	38
Figura 13-	Representação quanto ao tamanho das vesículas sendo a cor rosa MLV, a cor verde LUV e a azul SUV.....	41
Figura 14-	Acúmulo de nanopartículas em tecido tumoral nas proximidades dos vasos sanguíneos.....	43
Figura 15-	Núcleo químico característico da classe tambjamina. ....	46
Figura 16-	Estrutura química dos primeiros 10 alcalóides bipirrólicos descobertos pertencentes à classe das Tambjamins. ....	47
Figura 17-	Estrutura da Prodigiosina, alcaloide tripirrólico. ....	47
Figura 18-	Estrutura química das Tambjamins analisadas no presente estudo. (A) Tambjamina I e (B) Tambjamina J. ....	51
Figura 19-	Esquema metodológico experimental das avaliações realizadas para concretização dos objetivos propostos no trabalho.....	52
Figura 20-	Ilustração do processo de nanoencapsulamento de Tambjamins (TI e TJ) em polímero de ácido láctico e glicólico (PLGA) pelo método de emulsão simples (o/a).....	53
Figura 21-	Ilustração do processo de nanoencapsulamento de Tambjamins (TI e	54

	TJ) em lipossoma pelo método de hidratação do filme lipídico.....	
Figura 22-	Representação dos cometas corados com brometo de etídeo e visualizados no microscópio de fluorescência. (A) Grau 0, (B) Grau 1, (C) Grau 2 e (D) Grau 3 (E) Grau 4.....	72
Figura 23-	Fotomicrografia de linfócito binucleados portando micronúcleos.....	73
Figura 24-	Número de publicações na base de dados <i>Web of Science</i> por país.....	84
Figura 25-	Processo de incorporação de tambjaminsas em lipossoma pelo método de hidratação do filme lipídico. Imagem gerada a partir de microscópio invertido no aumento de 40x.....	85
Figura 26-	Comparação do perfil antiproliferativo/citotóxico das Tambjaminsas na forma livre (TI e TJ) e encapsuladas (LTI e LTJ), através dos ensaios de (A) MTT e (B) Sulforodamina B (SRB), na linhagem tumoral HCT-116 tratadas por 24, 48 e 72h.....	94
Figura 27-	Perfil de sensibilidade das Tambjaminsas I e J em 17 linhagens DT40 deficiente em genes de reparo de DNA em diferentes vias moleculares, após 72h de tratamento. Camptotecina (CPT), Etoposídeo (ETP) e ICRF-193 foram utilizados com controle positivo. Valores negativos (esquerda) e positivos (direita) mostram que as células indicadas são sensíveis ou resistentes, respectivamente, ao composto testado. As barras estão coloridas de acordo com a principal via de reparo de DNA em que cada gene deficiente naquela célula pertence: preto, NHEJ (junção de pontas não homólogas); salmão, checkpoint de dano; azul, recombinação homóloga (HR); marrom, síntese translesão (TLS); azul claro, PARP1; verde, remoção de complexos de clivagem de Top1 ou Top2; rosa, via da Anemia Fanconi; laranja, DNA polimerases e síntese translesão; roxo, FEN1 (flap endonuclease); vermelho, reparo por excisão de nucleotídeos (NER); amarelo, EXO1. As células do tipo selvagem (WT) estão mostradas no topo do gráfico.....	96
Figura 28-	Células HCT116 cultivadas e tratadas com Tambjaminsas livres e encapsuladas por 24h de tratamento. (A) Controle negativo, (B) Doxorubicina 0,3 $\mu$ M, (C) TI 2,5 $\mu$ M, (D) TI 5,0 $\mu$ M, (E) LTI 5,0 $\mu$ M, (F) TJ 2,8 $\mu$ M, (G) TJ 4,2 $\mu$ M, (H) LTJ 4,2 $\mu$ M. Aumento de 20x.....	99
Figura 29-	Células HCT116 cultivadas e tratadas com tambjaminsas livres e encapsuladas por 24h de tratamento. Microscopia óptica a partir de coloração panótipo rápido, aumento de 20x. (A) Controle negativo, (B) Doxorubicina 0,3 $\mu$ M, (C) TI 2,5 $\mu$ M, (D) TI 5,0 $\mu$ M, (E) LTI 5,0 $\mu$ M, (F) TJ 2,8 $\mu$ M, (G) TJ 4,2 $\mu$ M, (H) LTJ 4,2 $\mu$ M. As setas indicam os aspectos apoptóticos observados. Seta branca indica dissolução da cromatina, azul (picnose), cinza (tumefação), rosa (necrose), amarela (vacuolização), vermelha ( <i>blebs</i> ), verde (restos celulares), verde tracejada (Nanossistema lipossomal).....	101
Figura 30-	Vesículas lipossomais na linhagem HCT-116 tratada com LTJ 4,2 $\mu$ M no tempo de 24h, ampliação da figura 29H.....	102

Figura 31-	Células HCT116 cultivadas e tratadas com tambjaminsas livres e encapsuladas por 48h de tratamento. Microscopia óptica campo claro, aumento de 20x. (A) Controle negativo, (B) Prodigiosina 1,0 $\mu$ M, (C) Doxorubicina 0,3 $\mu$ M, (D) TI 2,5 $\mu$ M, (E) TI 5,0 $\mu$ M, (F) TI 5,0 $\mu$ M, (G) TJ 2,8 $\mu$ M, (H) TJ 4,2 $\mu$ M, (I) TJ 4,2 $\mu$ M.....	103
Figura 32-	Processo de modulação do pH por esses compostos em células cancerígenas ocorre através da modulação do transportador de ânion transmembrânico.....	104
Figura 33-	Células HCT116 cultivadas e tratadas com tambjaminsas livres e encapsuladas por 48h de tratamento. Microscopia óptica a partir de coloração panótipo rápido, aumento de 20x. (A) Controle negativo, (B) Prodigiosina 1,0 $\mu$ M, (C) Doxorubicina 0,3 $\mu$ M, (D) TI 2,5 $\mu$ M, (E) TI 5,0 $\mu$ M, (F) LTI 5,0 $\mu$ M, (G) TJ 2,8 $\mu$ M, (H) TJ 4,2 $\mu$ M, (I) LTJ 4,2 $\mu$ M. As laminulas foram analisadas por microscopia óptica no aumento de 20x. As setas indicam os aspectos apoptóticos observados. Seta branca indica dissolução da cromatina, azul (picnose), cinza (tumefação), rosa (necrose), amarela (vacuolização), vermelha ( <i>blebs</i> ) e verde (restos celulares).....	105
Figura 34-	Efeito antiproliferativo de diferentes das doses livre das tambjaminsas I e J livres e encapsulada realizadas através do ensaio xCELLigence.....	107
Figura 35-	Análises por citometria de fluxo de números absolutos de células de HCT116. A experimentação foi realizada (A) 24 h (B) 48 h após a incubação com tambjaminsas livres (TI e TJ) e nanoencapsuladas com partículas de lipossomas (LTI e LTJ), Doxorubicina (24 e 48h) e Prodigiosina (48 h) foram usado como controle positivo. Os gráficos mostram média $\pm$ SE. *p <0,05 ANOVA seguido do pós teste Tukey.	108
Figura 36-	Análises da viabilidade celular por citometria de fluxo em linhagem de HCT116 tratadas com tambjaminsas livre e encapsulada.. Experimento (A) 24h e (B) 48 h após incubação com Tambjaminsas livres (TI e TJ) e nanoencapsuladas em partículas de lipossomas (LTI e LTJ), Doxorubicina (24 e 48h) e Prodigiosina (48h) foram utilizados como controle positivo. Os gráficos mostram média $\pm$ SE. *p <0,05 ANOVA seguido do pós teste Tukey.....	109
Figura 37-	Efeito de diferentes Tambjaminsas livres (TI e TJ) e nanossistema de Tambjaminsas (LTI e LTJ) sob o ciclo celular realizado após 24 h de incubação na linhagem HCT116. Doxorubicina foi utilizado como controle positivo. Os gráficos mostram média $\pm$ SE. <sup>a,b,c</sup> p<0,05 ANOVA seguido do pós teste Tukey. <sup>a</sup> Fase G0/G1, <sup>b</sup> Fase S e <sup>c</sup> FaseG2/M.....	111
Figura 38-	Efeito de diferentes Tambjaminsas livres (TI e TJ) e nanossistemas de Tambjaminsas (LTI e LTJ) sob o ciclo celular realizado após 48 horas de incubação na linhagem HCT116. Doxorubicina e Prodigiosina foram utilizadas como controle positivo. Os gráficos mostram média	

	± SE. <sup>a,b,c</sup> p<0,05 ANOVA seguido do pós teste Tukey. <sup>a</sup> Fase G0/G1, <sup>b</sup> Fase S e <sup>c</sup> FaseG2/M.....	112
Figura 39-	Dano de DNA inferido por níveis de subG1 causados pelas Tambjamins (TI e TJ) e Tambjamins nanoencapsuladas (LTI e LTJ) na linhagem HCT116 após 24h (A) e 48h (B) de incubação. Os gráficos mostram média ± SE. *p<0,05 ANOVA seguido do pós teste Tukey.....	114
Figura 40-	Efeito de diferentes Tambjamins (TI e TJ) sobre a morte celular realizada após 48 horas de incubação em linhagens de HCT116. Quadstats mostram a distribuição da população celular após a coloração com ANEXIN V®. Prodjiosina e Doxorubicina foram utilizados como controle positivo (A) Controle Negativo. (B) Prodjiosina, (C) Doxorubicina, (D) TI (2,5 µM) (E) TI (5,0 µM), (F) TJ (2,8 µM), (G) TJ (4,2 uM). (H) Os gráficos mostram média ± SE. <sup>a,b,c,d</sup> p<0,05 ANOVA seguido do pós teste Tukey. <sup>a</sup> Viáveis, <sup>b</sup> Apoptose inicial, <sup>c</sup> Apoptose tardia e <sup>d</sup> Debris.....	115
Figura 41-	Efeito de diferentes tambjamins (TI e TJ) sobreo potencial transmembrânico mitocondrial após 24 h (A) e 48 h (B) de incubação em linhagens de HCT116. Doxorubicina foi utilizada como controle positivo. Os gráficos mostram média ± SE. *p<0,05 ANOVA seguido do pós teste Tukey.....	117
Figura 42-	Fosforilação de H2AX avaliado pelo kit FlowCelect™Histone H <sub>2</sub> A.X Phosphorylation Assay, após 6h e 24h de tratamentos com a Tambjamina I e Tambjamina J.....	118
Figura 43-	Índice de dano de DNA determinado pelo ensaio do cometa neutro em células de HCT116 tratadas com as Tambjamins I (2,5 e 5,0 µM) e J (2,8 e 4,2 µM) após 24h de tratamento. Doxorubicina (0,3 µM) foi utilizado como controle positivo. *p<0,05 ANOVA seguido do pós teste de Tukey.....	119
Figura 44-	Índice de dano de DNA determinado pelo ensaio do cometa alcalino em células de HCT116 tratadas com as Tambjamins I (2,5 e 5,0 µM) e J (2,8 e 4,2 µM) e em associação com as enzimas FPG e ENDOIII após 24h de tratamento. Doxorubicina (0,3 µM) foi utilizado como controle positivo. *p<0,05 ANOVA seguido do pós teste de Tukey.....	120
Figura 45-	Formação de micronúcleos em células de HCT116 tratadas com as Tambjamins I (2,5 e 5,0 µM) e J (2,8 e 4,2 µM). Doxorubicina (0,3 µM) foi utilizado como controle positivo. *p<0,05 ANOVA seguido do pós teste de Tukey.....	121
Figura 46-	Avaliação da expressão de β-actina, ciclina D, caspase 3, caspase 8, AKT, PARP íntegro, BAX e p21 em células HCT-116 tratadas com veículo (DMSO-Controle), Doxorubicina (0,3µM) e Tambjamins I (2,5µM e 5µM) e J (2,4µM e 4,2 µM) após 24 horas de incubação por Western Blot.....	122

Figura 47- Principais achados do estudo com tambjamins sintéticas e encapsuladas em lipossomas, avaliação da físico-química e biológica.... 129

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Lista de linhagens utilizadas com suas origens e concentrações de plaqueamento.....	58
Tabela 2-	Linhagens DT40 utilizadas e respectivas alterações nas funções gênicas (deleção/mutação) em vias de reparo de dano de DNA.....	62
Tabela 3-	Propriedades de avaliação dos parâmetros ADMETox.....	77
Tabela 4-	Distribuição de patentes sobre Tambjamins depositadas nos bancos ESPACENET, USPTO e WIPO.....	80
Tabela 5-	Distribuição de artigos sobre Tambjamins encontrados nas bases <i>Pubmed</i> , <i>Web of Science</i> e <i>Scencedirect</i> . ....	81
Tabela 6-	Publicações por área de concentração na base <i>Web of Science</i> .....	82
Tabela 7-	Composições metodológicas utilizadas para o nanoencapsulamento PLGA. A numeração de 1 a 14 indicam a quantidade de protocolos que foram testados a partir da modificação da composição.....	86
Tabela 8-	Composições metodológicas utilizadas para o nanoencapsulamento em lipossomas. A numeração de 1 a 10 indicam a quantidade de protocolos que foram testados a partir da modificação da composição até a formação do filme e alteração do tempo de sonicação/repouso....	87
Tabela 9-	Avaliação do tamanho das partículas e Potencial Zeta das nanoemulsões de Tambjamins em lipossomas. ....	88
Tabela 10-	Atividade citotóxica em diferentes células de câncer, expressa em CI50 para droga Tambjamina I, Tambjamina J livres e doxorubicina (Dox) (controle positivo) após 72h de incubação.....	90
Tabela 11-	Atividade citotóxica em diferentes células de câncer, expressa em CI50 para drogas livres Tambjamins I (TI), Tambjamina J (TJ) e encapsuladas LTI e LTJ. Doxorubicina (Dox) (controle positivo) após 72h de incubação. ....	92
Tabela 12-	Comparação do perfil antiproliferativo/citotóxico das Tambjamins na forma livre e encapsulada, através do ensaio de Sulforodamina B (SRB) e comparação com o ensaio de MTT, realizados na linhagem tumoral HCT-116 tratada por 24, 48 e 72h.....	93
Tabela 13-	Valores dos parâmetros ADMETox das Tambjamins I e J e Prodigiosina gerados pelo servidor pkCSM Pharmacokinetics.....	124
Tabela 14-	Ranqueamento <i>in silico</i> de potenciais alvos ligantes para as Tambjamins (I e J) e Prodigiosina.....	126



## LISTA DE ABREVIATURAS

$\Delta\Psi_m$ –	Potencial transmembrânico mitocondrial
A431 –	Câncer de pele não melanoma (A431).
ADME/Tox –	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
AIDS –	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANOVA –	Análise de variância
ANU –	National Australian University
Apaf-1 –	Protease apoptótica
AS –	Octadecylamine
ATP –	Adenosina trifosfato
BSA –	Albumina Serica Bovina
CaCo-2 –	Adenocarcinoma de coloretal humano (CaCo-2)
CCR –	Câncer de colorretal
CDK –	Cinases dependentes de ciclinas
CHOL –	Colesterol
CN –	Controle negativo
CO <sub>2</sub> –	Dióxido de carbono
D.P.M –	Desvio padrão da média
DFT –	Teoria do Funcional da Densidade
DHFR –	Diidrofolato redutase
DISC –	Complexo de Sinalização de Indução de Morte
DMSO –	Dimetilsufóxido
DNA –	Ácido desoxiribonucleico
DOX –	Doxorrubicina
E.P.M –	Erro padrão da média
EIV –	Vesículas obtidas por injeção de éter
EPR –	<i>Enhanced Permeability and Retention</i>
ESPACENET –	<i>European Patent Office</i>
EUA –	Estados Unidos da America
FCS –	<i>Forward Scatter</i>
FPG –	Formamidopirimidina DNA-glicosilase
FPV –	Vesículas obtidas em prensa de French

GA –	Ácido glicirretínico
GM1 –	Monossialogangliosideo
H <sub>2</sub> AX –	Histona fosforilada
IAP –	Proteínas inibidoras de Apotose
iCDK –	Inibidores de CDKs
ID –	Índice de Dano
INCA –	Instituto Nacional do Câncer
INPI –	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
LabNOE –	Laboratório de Oncologia Experimental
LATIPAT –	Patentes da América Latina
LB –	Lipossoma placebo
L-Grb2 –	Receptor do fator de crescimento
LLA –	Leucemia linfoide aguda
LS180 –	Carcinoma de cólon humano (LS180)
LTI –	Tambjamina I encapsulada por lipossomo
LTJ –	Tambjamina J encapsulada por lipossomo
LUV –	Lipossomas unilamelares grandes
MD –	Dinâmica Molecular
MFP –	Microscopia de força atômica
MLV –	Lipossomas multilamelares grandes
MS –	Espectrometria de Massas
MTT –	(3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazólio)
NCI –	Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos
OMS –	Organização Mundial da Saúde
OX –	Oxaliplatina
PBS –	Tampão fosfato
PC –	Fosfatidilcolina de soja
PE –	Ficoetrina
PEG –	Polietilenoglicóis
PI –	Iodeto de propídeo
PLGA –	Poli(ácido lático-co-ácido glicólico)
PRODJ –	Prodigiosina
PS –	Fosfatidilserina

REA –	Relação e estrutura-atividade
REV –	Vesículas de evaporação em fase reversa
RIPK-3	Proteína Quinase de Interação com Receptor-1
RIPK1 –	Proteína Quinase de Interação com Receptor-1
RNA –	Ácido ribonucleico
ROS –	Espécies reativas de oxigênio
RPMI –	Roswell Park Memorial Institute Medium
SM –	Esfingomielinases
SRB –	Sulforodamina B
SSC –	Side SCatter
SUV –	Vesículas unilamelares pequenas
T0 –	Tempo zero
TDDFT –	Teoria da Densidade Funcional Dependente do Tempo
TI –	Tambjamina I
TJ –	Tambjamina J
TNF –	Fator de Necrose Tumoral (TNF)
TNFR –	Receptor do Fator de Necrose Tumoral
UPLC –	Ultra Performance Liquid Chromatography
USPTO –	United States Patent and Trademark Office
V79 –	Fibroblastos de pulmão de <i>hamster</i> chinês
WHO –	Organização Mundial da Saúde
WIPO –	WIPO – World Intellectual Property Organization

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	Câncer.....	21
1.2	Câncer Colorretal.....	24
1.3	Ciclo Celular e alvos de agentes antineoplásico.....	27
1.4	Morte celular.....	32
1.5	Nanotecnologia como ferramenta de combate ao câncer.....	37
1.6	Copolímero de ácido láctico e glicólico (plga)/Lipossomas como carreadores de drogas contra o câncer.....	39
1.7	Simulações Computacionais e Sistemas Biológicos.....	44
1.7.1	<i>ADME/Tox e Pharmmaper.....</i>	44
1.8	Alcalóides: Tambjamins e Prodigiosina .....	46
2	JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA .....	48
3	OBJETIVOS.....	50
3.1	Objetivo geral .....	50
3.2	Objetivos específicos .....	50
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	51
4.1	Esquema metodológico experimental.....	51
4.2	Formulação de nanopartículas em PLGA.....	53
4.3	Formulação de nanopartículas lipossomais.....	53
4.3.1	<i>Caracterização dos nanossistemas para entrega de drogas anticâncer.....</i>	54
4.3.1.1	<i>Distribuição do tamanho de partículas e potencial zeta.....</i>	55
4.3.1.2	<i>Eficiência da encapsulação.....</i>	55
4.3.1.3	<i>Estudo de estabilidade.....</i>	56
4.3.1.4	<i>Avaliação da estabilidade acelerada e em longo prazo das formulações.....</i>	56
4.3.1.5	<i>Análise morfológica dos nanossistemas.....</i>	56
4.4	Avaliação da atividade de citotoxicidade in vitro.....	57
4.4.1	<i>Obtenção e cultivo de células.....</i>	57
4.4.2	<i>Avaliação da atividade metabólica em linhagens celulares in vitro (MTT).....</i>	57
4.4.3	<i>Avaliação da atividade proliferativa in vitro (SRB).....</i>	58
4.4.4	<i>Avaliação da alteração na viabilidade celular no painel de células DT40- ATPlite.....</i>	60
4.4.5	<i>Estudos do padrão de morte celular e efeitos sobre a progressão do ciclo celular.....</i>	63
4.4.6	<i>Análise morfológica: Coloração diferencial por Panótico rápido.....</i>	63
4.4.7	<i>Monitoramento dinâmico da proliferação e viabilidade celular em tempo real- XCelligence System .....</i>	63
4.4.8	<i>Citometria de Fluxo.....</i>	64
4.4.9	<i>Avaliação do ciclo celular e fragmentação de DNA.....</i>	65
4.4.10	<i>Avaliação da Externalização da Fosfatidilserina: Anexina V.....</i>	67
4.4.11	<i>Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial: Rodamina 123.....</i>	68
4.4.12	<i>Determinação da fosforilação de H<sub>2</sub>AX.....</i>	69
4.4.13	<i>Testes de Genotoxicidade/Mutagenicidade.....</i>	70

4.4.14	<i>Avaliação da expressão proteica utilizando a técnica de Western blot.....</i>	74
4.5	<b>Estudo in silico .....</b>	77
4.5.1	<i>Parâmetros de ADMETox.....</i>	77
4.5.2	<i>Estudo Pharmmaper.....</i>	78
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	79
5.1	<b>Tambjamins: Prospecção científica e Tecnológica.....</b>	79
5.2	<b>Formulações de nanopartículas em PLGA.....</b>	85
5.2.1	<i>Cracterizações físico-químico os nanossistemass em PLGA.....</i>	85
5.3	<b>Formulações de nanopartículas em Lipossoma.....</b>	86
5.3.1	<i>Caracterizações físico-químico os nanossistemass de Lipossoma.....</i>	86
5.3.2	<i>Tamanho de Partículas.....</i>	87
5.3.3	<i>Análise Morfológica.....</i>	89
5.4	<b>Avaliação da atividade das Tambjamins na forma livre e encapsuladas em lipossomas em linhagens celulares.....</b>	90
5.5	<b>Avaliação da alteração da viabilidade celular <i>in vitro</i> em linhagens DT-40.....</b>	95
5.6	<b>Avaliação das alterações morfológicas da linhagem HCT-116 após o trata-mento com Tambjamins livres e lipossomais.....</b>	98
5.7	<b>Monitoramento dinâmico da proliferação e viabilidade celular em tempo real- XCelligence System.....</b>	106
5.8	<b>Citometria de fluxo.....</b>	107
5.9	<b>Avaliação do dano de DNA: H2Ax, Cometa e Micronúcleo.....</b>	117
5.10	<b>Avaliação da expressão proteica de células HCT116 tratadas com Tambjamins .....</b>	121
5.11	<b>Predições <i>in silico</i>.....</b>	123
5.11.1	<i>ADME/TOX.....</i>	123
5.11.2	<i>PharmMapper.....</i>	125
6	<b>CONCLUSÕES.....</b>	129
	<b>REFERÊNCIAS... ..</b>	131

# 1 INTRODUÇÃO

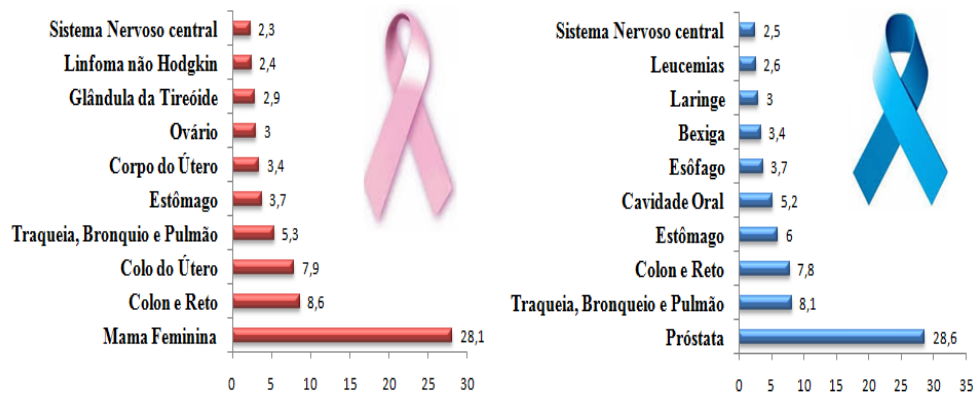
## 1.1 CÂNCER

Em sociedades industrializadas, o câncer está em segundo lugar, perdendo apenas para doenças cardiovasculares, nas causas da morte. Cronologicamente, o câncer vem sendo descrito desde o Egito antigo ano a.c, porém devido à falta de material de restos mortais antigos, com neoplasias, era uma doença em humanos que estava relacionada à idade, dieta e fatores ambientais (ZIMMERMAN, 2003; DAVID; ZIMMERMAN, 2010). Por ser uma doença rara, na antiguidade, colocava-se em questão o papel dos fatores ambientais cancerígenos nas sociedades modernas. Sendo classificado como uma doença restrita à sociedade humana pós-industrial. David e Zimmerman (2010) concluíram recentemente que o câncer é um fenômeno humano contemporâneo causado pelo estresse do estilo de vida moderna, sendo as alterações na dieta e as modificações ambientais antropogênicas os principais fatores que contribuem para o desenvolvimento do câncer.

Nos últimos anos, o câncer tornou-se um grande problema de saúde pública mundial, e atualmente é responsável por uma em cada seis mortes no mundo, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS). Além disso, por ano, 8,8 milhões de pessoas morrem de câncer e 14 milhões de pessoas desenvolvem esta doença todos os anos. Este fato ocorre principalmente em países de baixa e média renda sendo uma das causas o diagnóstico tardio da doença (WHO, 2017).

No Brasil, a estimativa realizada pelo INCA para o biênio 2016-2017, aponta a ocorrência de cerca de 600 mil novos casos e ao excluir o câncer de pele não melanoma (aproximadamente 180 mil casos novos), ocorrerão cerca de 420 mil casos novos de câncer. Este dado epidemiológico observado é semelhante na América Latina e no Caribe, e os cânceres de próstata (61 mil) em homens e mama (58 mil) em mulheres serão os mais frequentes. Os outros tipos mais frequentes de neoplasias serão em homens: pulmão, intestino, estômago e cavidade oral e nas mulheres: intestino, colo do útero, pulmão e estômago figurarão entre os principais (Figura 1)(INCA, 2016).

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer estimados para 2016/2017 por sexo no Brasil, exceto câncer de pele não melanoma.



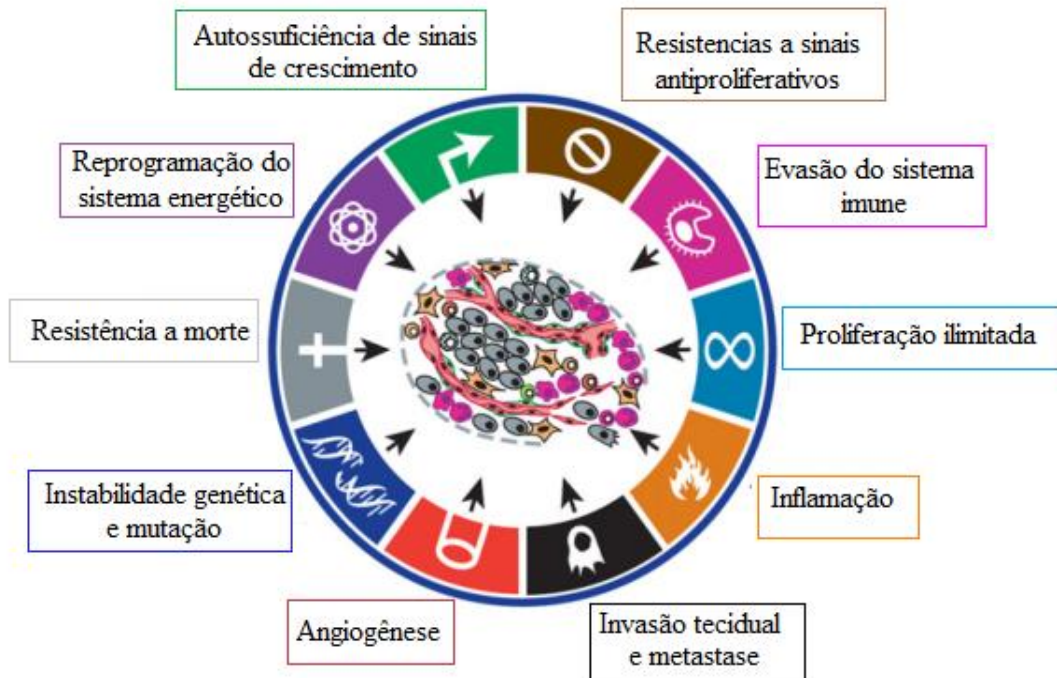
Fonte: INCA, 2016/2017.

Durante as três últimas décadas foi possível observar a biologia e a patologia do câncer e esta última está associada tanto a fatores como etnia, sexo, idade e estado nutricional como também ao fato do homem ser atacado por exposição esporádica ou sequencial a carcinógenos químicos, radiação ionizante e não ionizante e os estados inflamatórios e infecciosos crônicos como bacteriano, viral ou parasitário. Com isso, estudos indicam que a maior parte das neoplasias são resultados das interações entre os fatores genéticos e ambientais, e diferente do que se acreditava somente 5 a 10% das neoplasias são contribuições exclusivamente genética (LOURO, et al. 2002).

Ao pensar na base biomolecular do distúrbio proliferativo do câncer mutações gênicas que interferem na expressão normal de proteínas estão envolvidas no controle do ciclo e da morte celular. Verificamos que essas lesões genéticas ou mutacionais são responsáveis pelo desenvolvimento das neoplasias, em consequência de mutações nas células germinativas ou somáticas, sendo de origem hereditária ou adquirida, respectivamente (LOURO et al., 2002).

Muitos pesquisadores caracterizam o câncer como um conjunto de doenças que provoca o desequilíbrio entre proliferação e morte celular resultando em hiperplasia ou neoplasia, sendo a primeira possível de reverter a partir da remoção do estímulo enquanto a segunda, um processo irreversível. Com isso, Hanahan e Weinberg (2011) apresentaram 10 características que se destacam nas células cancerosas entre elas podem ser citadas a autossuficiência no mecanismo de crescimento, resistência a sinais anti-proliferativos e insensibilidade aos mecanismos de morte programada (Figura 2).

Figura 2. Características essenciais da progressão do câncer.



Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg (2011).

Devido ao crescimento desordenado de células anormais com potencial invasivo, o câncer é uma das patologias alvos de pesquisas para o desenvolvimento ou descoberta de novos fármacos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013). Nos últimos 10 anos, pesquisadores publicaram mais de 1 milhão de artigos no Pubmed e *Web of Science* e cerca de 10 mil patentes foram depositadas no Espacenet, o que comprova que a ciência vem se empenhando na busca pelo entendimento e cura desta doença. A natureza do câncer é bastante complexa sendo caracterizada por uma série de mutações genéticas que de forma progressiva conduz a transformação das células normais em células cancerosas (GOLDSBY et al., 2002).

Uma das principais diferenças entre células não cancerosas e as cancerosas é que estas últimas apresentam instabilidade celular que provoca o descontrole na produção e liberação de sinais promotores do crescimento que regulam a entrada e progressão do ciclo celular. Além disso, essas células possuem a capacidade de induzir a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) e invadir tecidos vizinhos ou distantes e formar desta forma metástases (HANAHAN; WEINBERG, 2011).



A perda da homeostase pela célula faz com que esta consiga passar pelo ciclo celular sem a checagem necessária, comportando uma série de mutações que contribui para o surgimento das características malignas do tumor (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000). O ciclo celular é subdividido em quatro subfases: G1, S, G2 e M (VERMEULEN et al., 2003) que agem de forma integrada que envolvem processos como aumento da massa celular, duplicação do ácido desoxirribonucleico (DNA) e divisão física de uma célula (mãe) em duas células filhas idênticas, processo esse denominado de mitose. Assim, o ciclo celular trata-se de um processo evolutivo como também de um processo conservativo da célula.

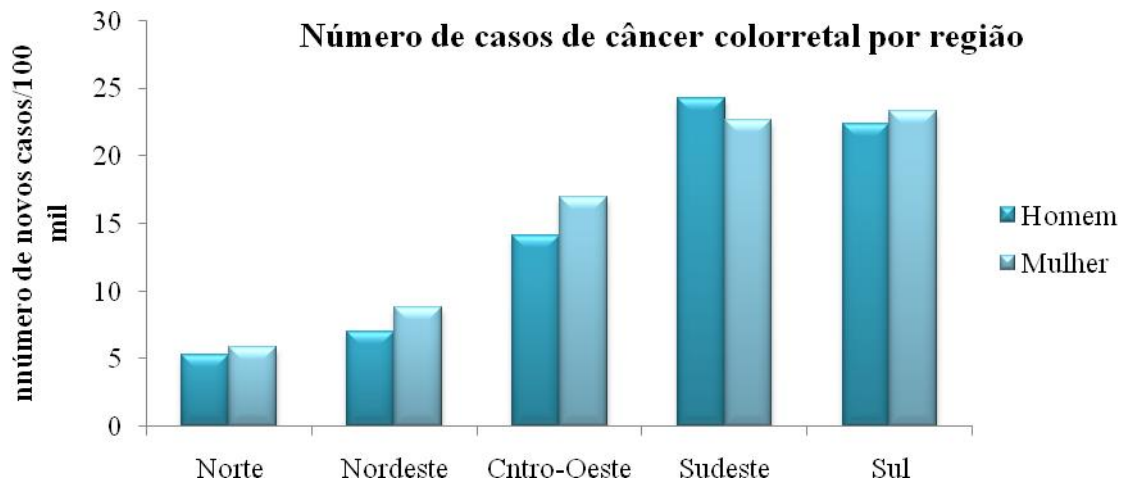
O conhecimento do ciclo celular ou dos seus mecanismos torna-se importante para que haja a compreensão da etiologia do câncer (SALMONM, 1998), pois o ciclo é responsável pelo mecanismo que conduz o destino das células, interpretando os sinais de crescimento recebidos e definindo se a célula deve continuar suas proliferações ou deve acionar seu mecanismo de morte (FOSTER, 2008).

## **1.2 CÂNCER COLORRETAL**

Os tumores malignos que acometem o cólon e o reto (câncer de colorretal – CCR) ocupam o terceiro lugar na incidência de câncer e é a quarta principal causa de mortalidade relacionada ao câncer em todo o mundo. Tradicionalmente, o CCR prevalece com incidência maior nas populações ocidentais da América do Norte, Austrália e Europa Ocidental, locais onde a incidência maior de pessoas com hábito alimentar rico em consumo de carnes vermelhas e carnes processadas, pouca ingestão de frutas, legumes e verduras. Nesses países encontra-se alta prevalência da obesidade, sobrepeso, sedentarismo, consumo de álcool e tabagismo (MARLEY; NAN, 2016). No entanto, atualmente o CCR não se encontra em maior prevalência somente nesses países, pois, observou-se que à medida que a população da Ásia, América do Sul e África subsaariana adotou os estilos de vida e os hábitos alimentares ocidentais houve um aumento no número de casos de CCR nesses países.

Segundo o INCA (2016) foi estimado 34.280 novos casos de CCR no Brasil, sendo 16.660 casos novos em homens e de 17.620 em mulheres, contudo o número de incidência é alterado segundo a região avaliada. Existe um número maior de casos nas regiões Sul e Sudeste (terceiro tumor maligno mais frequente em homens e em mulheres) e quarto lugar é encontrado na região Norte (Figura 3).

Figura 3. Números de de câncer colorretal por região segundo dados do INCA, 2016.



Fonte: INCA, 2016/2017

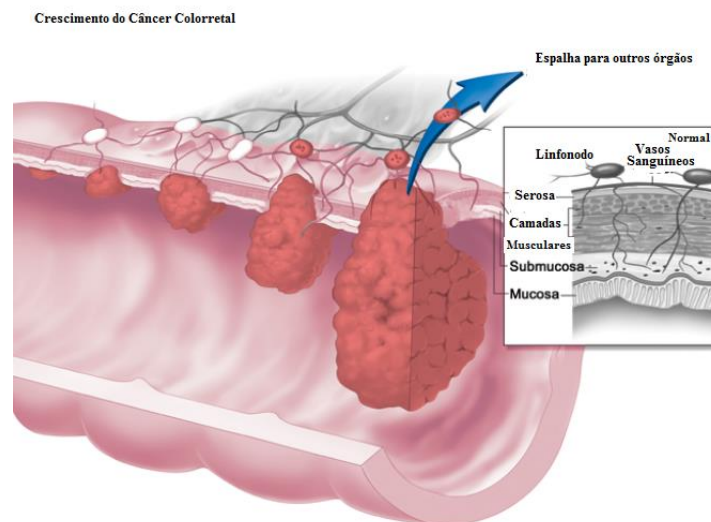
Um dado observado é que o aumento na taxa, tanto de incidência, quanto de mortalidade estão ligados ao avanço da idade (CRAWFORD et al., 2011). Porém, novos conceitos estão surgindo com relação à idade/incidência desse tipo de tumor, por muito tempo foi considerado uma doença não relacionada a pessoas jovens, porém estudos de prospecção realizados por O'Connell *et al.* (2004) sobre qual idade definia “ser jovem” e a relação com o desenvolvimento de CCR encontrou várias controvérsias entre os trabalhos que definiam “jovens” em que as faixas etárias estavam abaixo de 40 anos de idade, abaixo de 35 anos, e existiam ainda estudos que eram antes dos 30 anos e apenas um trabalho levou em conta pacientes com menos de 25 anos. Porém, todos os estudos possuem em comum a correlação entre a doença e o “estilo de vida”. Apesar de ser considerado uma das principais causas para o aparecimento do câncer colorretal, o estilo de vida, não se pode deixar de citar os demais fatores existentes como o histórico familiar de CCR, doença inflamatória intestinal, diabetes, obesidade e a presença de pólipos adenomatosos com potencial maligno (BONNINGTON; RUTTER, 1026).

O CCR é um tipo de câncer que se apresenta sob a forma esporádica, cerca de 75% dos pacientes enquanto que os 25% restantes possuem componentes genéticos hereditários (DA SILVA et al., 2016). Um ponto animador é que este tipo de câncer possui prevenção e pode ter sua detecção precoce, por procedimentos que vão desde a pesquisa de sangue nas fezes ao exame endoscópico (colonoscopia). Estes métodos são capazes de detectar pólipos adenomatosos e, assim, diagnosticar o câncer em estágios iniciais e desta forma aumentar a

sobrevida do paciente (THORGEIRSSON et al., 2008). Porém, muitas vezes seus sintomas são pouco perceptíveis e a doença só é identificada quando se encontra em fase avançada.

A maioria dos adenocarcinomas do cólon e reto surgem a partir de pólipos adenomatosos inicialmente benignos até formarem lesões malignas e, assim, formar os adenocarcinomas (BODGER, 2001) (Figura 4). Contudo o câncer colorretal não poderia ser diferente em sua complexidade para os demais cânceres, pois apresenta forte heterogeneidade com perda da integridade genômica, que torna fácil o acúmulo de múltiplas mutações durante o seu desenvolvimento. Além disso, ocorrem, ainda, alterações como instabilidade cromossômica, instabilidade de microssatélite, metilação aberrante de DNA e defeitos nos mecanismos de reparo de dano de DNA (DE ROSA et al. 2015), desta forma podem coexistir diferentes células cancerosas no mesmo tumor o que pode colaborar para a resistência ao tratamento (APARICIO; CALDAS, 2013).

Figura 4. Esquema do desenvolvimento do pólipo adenomatoso a adenocarcinoma.



Fonte: disponível em <http://www.scientificarena.com/2016/10/dietary-interventions-for-colorectal.html>

O tratamento do CCR depende do estadiamento da doença como: tamanho, localização, extensão do tumor, além da saúde geral do paciente (REDDY et al., 2015). Atualmente existem várias modalidades terapêuticas. Entre elas encontramos a cirurgia (curativa ou paliativa), quimioterapia, e radioterapia, que podem ser usadas isoladas ou associadas (NICOLUSSI et al., 2009). Dados mostram que 50% dos pacientes no momento do diagnóstico possuem tumores em estágio avançado, e mundialmente somente 50% possuem a sobrevida em torno de 5 anos (WILMINK, 1997).

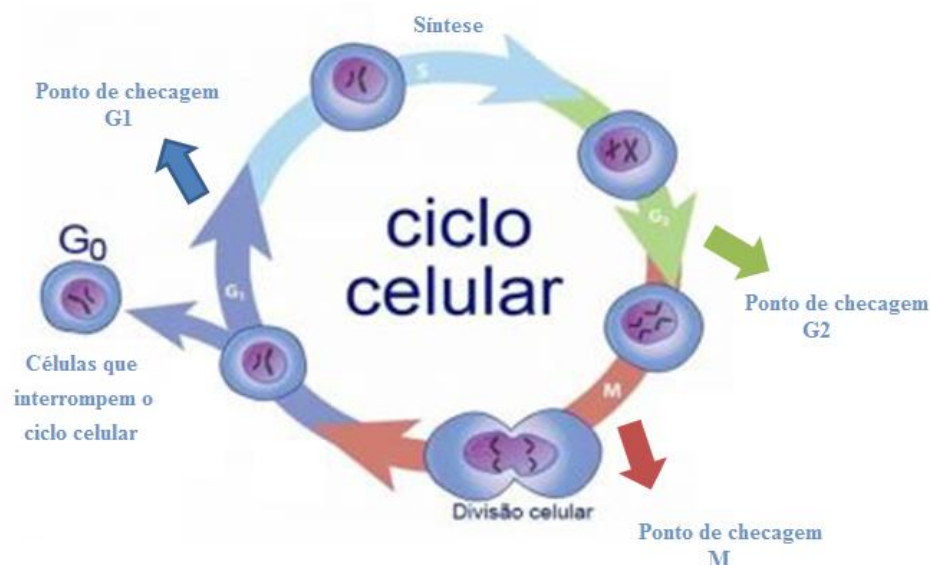
Apesar de vários estudos que avaliam parâmetros tanto clínicos, patológicos e moleculares em relação no prognóstico, até o momento, o estadiamento clinicopatológico das lesões, obtido do espécime cirúrgico na ressecção do tumor primário, constitui a informação prognóstica mais importante disponível para esses pacientes (WILMINK, 1997; INCA, 2007).

Torna-se, assim, evidente a necessidade de medidas públicas tanto como campanhas sobre a prevenção do câncer colorretal como também, investimentos em pesquisas em prognósticos que possam detectar o câncer de forma precoce e de terapias mais eficazes de combate ao CCR e que proporcione uma melhor qualidade de vida para o paciente.

### 1.3 CICLO CELULAR E ALVOS DE AGENTES ANTINEOPLÁSICO

O ciclo celular (Figura 5) é governado e regulado por uma intrincada rede de proteínas sendo sua progressão monitorada por *checkpoints* (pontos de checagem) capazes de interrompê-lo caso ocorram defeitos durante a síntese de DNA e a segregação cromossômica, prevenindo a transmissão de erros para as células-filhas, porém se não houver um reparo bem sucedido, esta célula poderá entrar em apoptose ou senescência. Tudo acontece em perfeita harmonia em que as vias celulares respondem a fatores externos por meio de uma cascata de sinalização que induz a célula a sair de uma fase e entrar em outra (MALUMBRES; BARBACID, 2009; WILLIAMS; STOEBER, 2012).

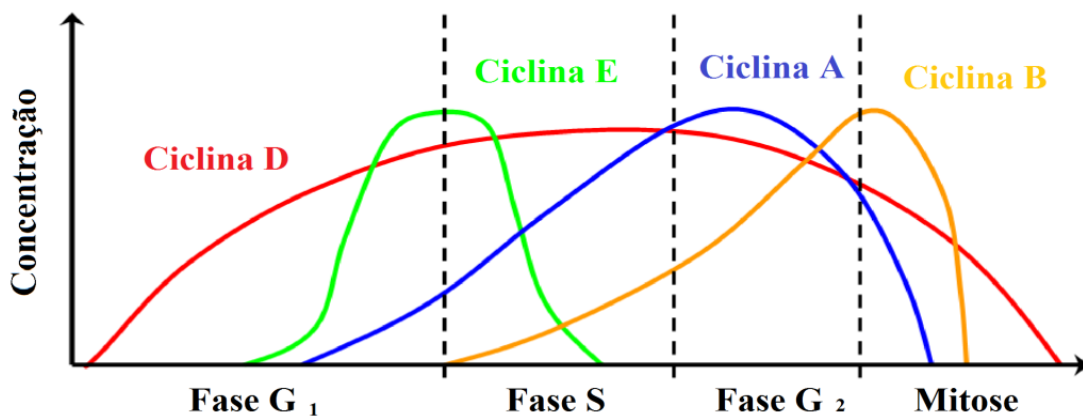
Figura 5. Esquema de fases do ciclo celular.



Fonte: Modificado de: <http://www.ciclocelular.com.br>

As cinases dependentes de ciclinas (CDKs, do inglês *cyclin-dependent kinases*) são os orquestradores desta progressão celular e elas são ativadas quando se ligam as ciclinas que possuem um padrão cíclico de serem sintetizadas e degradadas durante o ciclo celular. (ALBERTS *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2010; MALUMBRES; BARBACID, 2009). As ciclinas são sintetizadas somente em fases específicas, pois atuam de acordo com a necessidade (por isso são chamadas de facultativas) sendo destruídas de maneira cíclica logo após sua utilização. A ciclina D é sintetizada durante a fase G<sub>1</sub>, enquanto a E é produzida nesta mesma fase, porém em uma etapa mais tardia. A ciclina A é sintetizada tanto na fase S como na fase G<sub>2</sub>, enquanto a ciclina B tem seus níveis celulares presentes durante as fases G<sub>2</sub> e M (Figura 6) (BLAGOSKLONNY, 2001; PINHO, 1999; WEINBERG, 2008).

Figura 6. Níveis de ciclina durante o ciclo celular.



Fonte: Adaptado de (<<http://en.wikipedia.org/wiki/Cyclin>>)

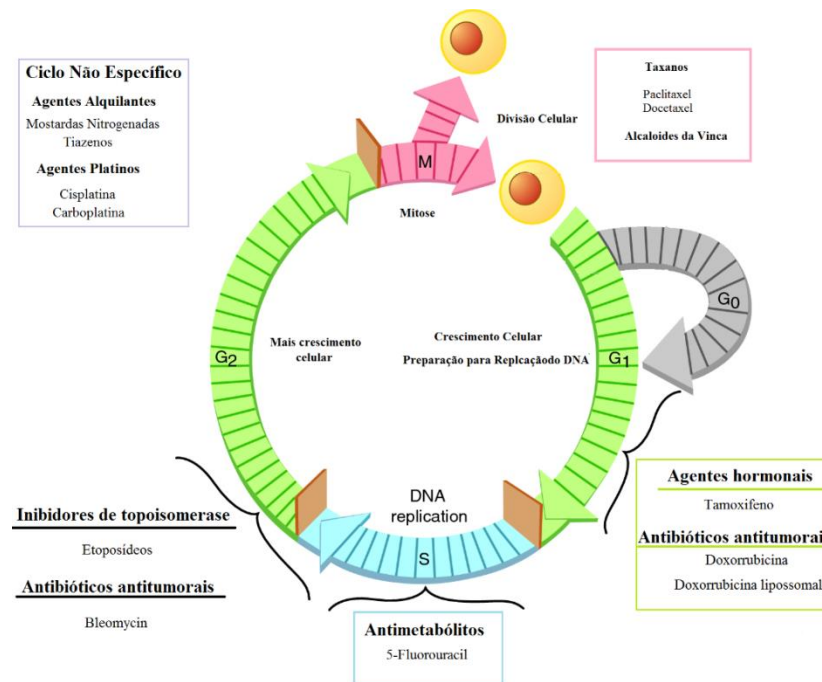
A regulação da ativação e desativação da atividade de CDKs nas etapas do ciclo é a chave para a homeostase tecidual e sua hiperativação poderá beneficiar o desenvolvimento de tumores através da indução desregulada da divisão celular (MALUMBRES; BARBACID, 2009). Em contrapartida para equilibrar esse sistema, existem moléculas conhecidas como inibidores de CDKs (iCDKs) que exercem seu papel controlando negativamente o ciclo, isto é, participam inibindo a função das CDKs (KUMAR *et al.*, 2010). Porém, as células tumorais adquirem capacidades funcionais por diferentes vias, em diferentes tempos durante o curso multifatorial da tumorigênese promovendo sua proliferação, sobrevivência e disseminação (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Com isso, o ciclo celular é uma das chaves de muitas

pesquisas que buscam agentes antineoplásicos que possam ter seu efeito sobre suas diferentes fases.

A quimioterapia do câncer consiste em um tratamento a base de fármacos, que interferem em diferentes processos tais como desenvolvimento, crescimento, disseminação e invasão de células cancerígenas (SOUZA et al., 2007). O tratamento pode ser realizado por mono ou poliquimioterapia, sendo que este último tem apresentado resultados mais eficientes, com respostas mais satisfatórias, com redução de riscos de resistência do paciente e atuando nas células por diferentes mecanismos de ação (CARVALHO, 2003). E quando a quimioterapia está aliada a outras estratégias como a cirurgia e/ou a radioterapia constituem as principais modalidades terapêuticas utilizadas no tratamento de pacientes com diferentes tipos de câncer (KUMMAR, 2004). Todavia, as drogas convencionais usadas no tratamento do câncer (agentes quimioterapêuticos) não apresentam seletividade, atingindo tanto as células cancerosas como as células saudáveis, o que impõe um limite para sua dosagem por conta de sua citotoxicidade não seletiva e por produzir efeitos aquém do que seria desejável.

A quimioterapia faz utilização de diversos tipos de compostos que são separados por seus diferentes grupos funcionais que fazem parte da composição estrutural de suas moléculas. Então, para facilitar o entendimento, Chabner e Calabresi(1995), classificaram os fármacos antineoplásicos baseando no ponto de interferência do mecanismo de ação das diferentes etapas da síntese do DNA, transcrição e tradução. Porém, alguns autores não concordaram com essa classificação, uma vez que o mecanismo envolvido na evolução tanto de uma célula normal como de uma potencialmente maligna são orquestrados por diversos fatores. Contudo, observou-se que a maior parte dos fármacos interferem nos ciclos metabólicos das células (CHABNER; LONGO; 1996; HANH; WEINBERG; 2002). Bruce et al. (1969) classificaram os quimioterápicos por sua atuação no ciclo celular. Desta forma, aqueles que atuam nas células que estão ou não no ciclo proliferativo foram denominados de fármacos não ciclo específico, enquanto que os agentes antineoplásicos que atuam em fases específicas do ciclo celular são denominados fármacos ciclo-celular específicos (Figura 7).

Figura 7. Atividade dos agentes quimioterápicos antineoplásicos, dependendo da fase do ciclo celular.



Fonte: Adaptado de Princípios de quimioterapia, Ginecologia de Williams, 2e .

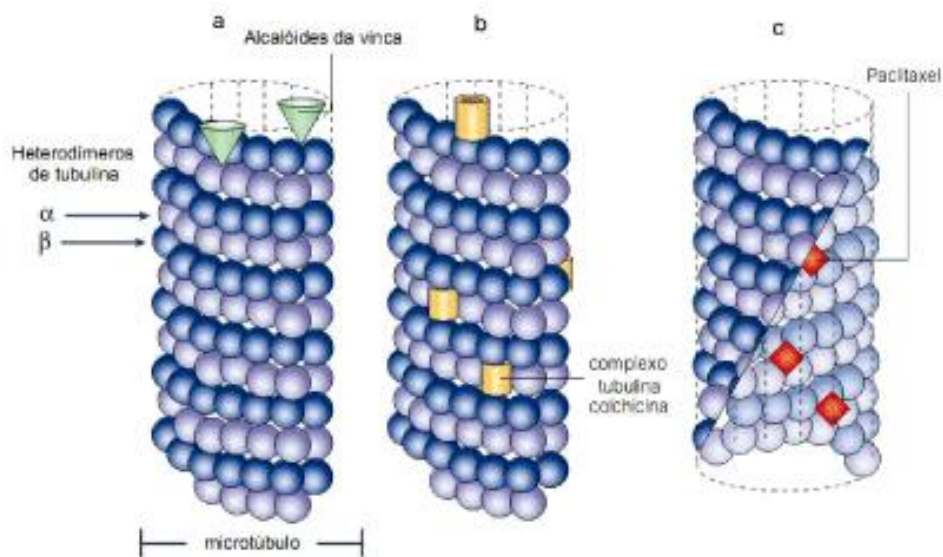
As células neoplásicas apresentam muitas diferenças metabólicas quantitativas quando comparadas as células normais. Como isso se tornam mais suscetíveis a ação de compostos, entre eles encontram-se os antimetabólitos ou análogos estruturais das bases nitrogenadas (OLIVEIRA; ALVEZ, 2002). Isto ocorre porque as células confundem o antimetabólito com o composto que utilizaria normalmente para os processos vitais das células ocasionando erros nesse processo e resultando na morte da célula. Esse tipo de quimioterápico age principalmente bloqueando bioquimicamente a síntese do DNA e, portanto, são restritos à fase S do ciclo celular (MURAD; KATZ, 2000).

Para o tratamento do câncer existem três diferentes classes de drogas anti-metabólicas as que agem como os antagonistas de purina, de pirimidina e do análogo do ácido fólico. Enquanto os antagonistas de purina inibem a síntese de nucleotídeo purina os antagonistas das pirimidinas inibem a síntese de nucleotídeo pirimidinas. Dentro deste grupo, respectivamente como exemplo encontramos 6-mercaptopurina, fármaco que é utilizado no tratamento contra leucemia linfóide aguda (LLA) e 5-fluoracil que já é bastante utilizado em diversos tipos de cânceres como de mama, cólon, estômago, pâncreas entre outros. O outro antimetabólito é antagonista do ácido fólico. Este bloqueia a atividade da enzima chamada diidrofolato

redutase (DHFR), impedindo que a célula possa sintetizar os nucleotídeos purina e pirimidina como seu representante encontramos o metotrexato que é utilizado no tratamento da leucemia linfóide aguda, câncer de mama, cabeça e pescoço entre outros (ALMEIDA et al, 2005).

Existem quimioterápicos que são inibidores mitóticos e conseguem promover a parada da mitose na metáfase porque sua ação ocorre na proteína tubulina que é responsável pela formação dos microtúbulos possibilitando, assim que ocorra a migração dos cromossomos. Deste modo, a droga se liga às proteínas microtubulares e, conseqüentemente, interrompe a divisão celular na metáfase. Neste grupo de drogas estão incluídos os alcalóides da vinca rósea (vincristina, vimblastina, vindesina e seus derivados sintéticos) e os derivados da podofilotoxina (VP-16, etoposídeo; e o VM-26, teniposídeo) (BRANDÃO, 2010) (Figura 8).

Figura 8. Diferentes fármacos antimitóticos em diferentes locais dos microtúbulos.



Fonte: Adaptado de Jordan; Wilson; 2004.

Os taxoídes também interferem na função normal de crescimento do microtúbulo, impedindo a divisão descontrolada da célula, atuando na dimerização da tubulina e estabilizando os túbulos resultando na proteção da despolimerização e no bloqueio da multiplicação celular gerando a perda da viabilidade celular (ROLIM, 2013).

Existem agentes antineoplásicos que possuem a capacidade de interagir com o DNA, e podem ser classificados de acordo com o seu mecanismo de ação, sendo eles os “venenos de topoisomerase” e os inibidores catalíticos (DEWEESE; OSHEROFF, 2009). Sendo os



primeiros caracterizados por agir aumentando a atividade da enzima ao formar uma ligação covalente entre essa e o DNA, promovendo desta forma o aumento nas quebras da molécula, resultando em intermediários que prejudicará o metabolismo celular, levando a eventos mutagênicos e letais. Sua ação poderá ser determinada através da inibição da atividade da enzima em religar a fita de DNA clivada ou aumentando os níveis de cisão, podem ser divididos como intercalantes ou não intercalantes de DNA. Já os inibidores catalíticos aumentam a atividade da enzima, impedindo a atividade da mesma, e conseqüentemente evitando a formação do complexo enzima-DNA, seja pela inibição da ligação da enzima com o DNA ou por impedir que a topoisomerase clive o DNA (JORGE, 2012).

#### **1.4 MORTE CELULAR**

A morte celular pode ser de dividida em dois grandes grupos, o que ocorre de forma acidental e o que é resultado de uma regulação (Comitê de Nomenclatura em Morte Celular) constituindo um processo normal e essencial para homeostasia do organismo, porém em condições adversas, vias de morte celular são estimuladas com objetivo de impedir a propagação de células mutadas ou danificadas que poderia levar a formação de tumores. A inativação destas vias é um evento comum em quase todos os tipos de câncer e o principal objetivo de vários tratamentos quimioterápicos é a reativação destas vias (TSCHAN; SIMON, 2010; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A morte celular regulada é responsável pelo equilíbrio entre a morte e a sobrevivência de células normais. Schweich e Merker (1973) foram os primeiros a classificar os tipos de morte celular em heterofagia, autofagia e morte celular sem digestão, em que posteriormente foram denominadas como apoptose, autofagia e necrose. As características que as diferenciam estão principalmente em suas alterações morfológicas (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Atualmente, os tipos de morte podem ser classificados de acordo com sua morfologia aparente (que pode ser apoptótica, necrótica, autofágica ou associado à mitose), critérios enzimológicos (com e sem o envolvimento de nucleases ou de classes distintas de proteases, como caspases, calpains, catepsinas e transglutaminases), aspectos funcionais (programados ou acidental, fisiológico ou patológico) ou características imunológicas (imunogênicas ou não imunogênicas) (MELINO, 2001) .

Apesar dessas diversificadas vias de morte a apoptose, necrose e autofagia são as mais estudadas e as mais descritas, as demais vias, ainda, são alvos de pesquisas pela comunidade científica, porém é sabido que a maioria delas, em parte, é executada pela maquinaria

molecular da apoptose ou necrose manifestando, assim, características bioquímicas ou morfológica dessas vias (KEPP *et al.*, 2011).

A apoptose é um tipo de morte celular caracterizada morfológicamente pela formação de “*blebs*” na membrana celular, redução do volume celular, fragmentação nuclear, condensação de cromatina e fragmentação do DNA cromossômico (GALLUZZI *et al.* 2007; COHEN, 1997). Enquanto que bioquimicamente, é definida como uma morte dependente de caspases (TAYLOR; CULLEN; MARTIN, 2008) com externalização da fosfatidilserina na membrana plasmática (MELLEN *et al.*, 2009; KENIS *et al.*, 2010; SEGAWA *et al.*, 2014).

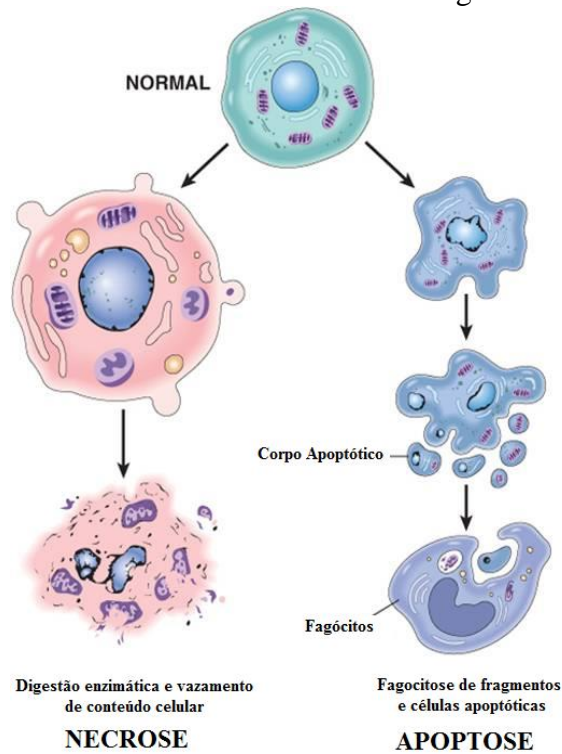
A apoptose é dividida em duas vias básicas de sinalização: a via intrínseca e a extrínseca. Na qual a primeira, também chamada de via mitocondrial, é ativada por vários estímulos intracelulares, incluindo danos ao DNA, privações de fatores de crescimento e estresse oxidativo. Essa via se baseia na formação de um complexo denominado apoptossoma que é composto de procaspase-9, fator de ativação de protease apoptótica (Apaf-1) e citocromo c além de uma série de membros da família BCL-2, como BAX, BAK, BCL-2 e BCL-XL que participam do controle da liberação do citocromo c regulando a permeabilização da membrana mitocondrial (GREEN; KROMER, 1998). A via extrínseca é induzida depois da ocorrência de sinais de estresse extracelular, pressentidos e propagados por receptores transmembranares específicos, que após a ligação de ligantes de morte como o FasL ou FaS, com os receptores há a trimerização e seus domínios de morte recrutam proteínas adaptadoras que irão recrutar procaspases iniciadoras (procaspases 8 e 10), formando um complexo de sinalização indutor de morte (DICS, do inglês *death-inducing signaling complex*). Depois de ativadas, as caspases iniciadoras clivam e ativam as caspases executoras até a indução da apoptose (GALLUZZI *et al.*, 2012; ALBERTS *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2010).

A necrose foi originalmente considerada como uma morte acidental não regulada. Porém, evidências de acumulação demonstraram que a necrose pode ser induzida e posteriormente pode prosseguir de maneira regular, como a apoptose, embora de forma independente de caspase. A necrose regulada é denominada necrose programada ou necroptose que para distingui-la da necrose causada por trauma físico ela é depende da atividade da Proteína Quinase e da interação com Receptor-1 (RIPK1) (KROEMER *et al.*, 2009), porém marcadores clássicos que estão presentes na apoptose, como condensação de cromatina e fragmentação nucleossomal de DNA não são visualizados na via de morte por necrose (BROWN; ATTARDI, 2005). Contudo, existem semelhanças entre a necrose e a apoptose, por que ambas externalizam a fosfatidilserina antes da permeabilização da membrana

plasmática, promovendo, desta forma o seu reconhecimento pelos fagócitos (GALLUZZI et al., 2012).

Os mecanismos responsáveis pela necroptose ainda estão em processo de identificação, sabe-se, contudo, que esses mecanismos podem ser desencadeados pelos mesmos ligantes que ativam a apoptose, como o Fator de Necrose Tumoral (TNF) em que o ligante TNF $\alpha$  se liga ao receptor TNFR1 resultando no recrutamento de proteínas de Domínio de Morte Associado à TNFR (TRADD), RIP-1, IAPs (Proteínas inibidoras de Apoptose), Fator Associado a TNFR2 (TRAF-2) e Fator Associado a TNFR5 (TRAF-5), que constituirão uma estrutura chamada de complexo I. As proteínas IAPs realizam a poliubiquitinação de RIP-1 que acionará a ativação de NF- $\kappa$ B. Todavia, quando RIP-1 sofre desubiquitinação o complexo se modifica passando a se chamar complexo II também denominado Complexo de Sinalização de Indução de Morte (DISC) (GALLUZZI et al., 2012). Esse complexo é composto por RIP-1, Proteína Quinase de Interação com Receptor- 3 (RIPK-3), TRADD, Domínio de morte associada ao CD95(FADD) e CASP8 (caspase-8). Porém, devido a condições genéticas ou farmacológicas a CASP8 (caspase-8) não pode ser ativada promovendo a fosforilação do RIP1 e RIP3 formando assim um complexo molecular chamado de necrossoma. Após a formação do necrossoma vários sinais pró-necróticos são ativados como: permeabilização da membrana lisossomal e liberação citosólica de hidrolases lisossomais, ativação das esfingomielinases (SMases) e conseqüentemente promovem alterações metabólicas nas mitocôndrias que resultam na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), que poderão danificar de forma direta macromoléculas, incluindo o DNA, proteínas, lípidos, e causará o decréscimo abrupto dos níveis de ATP (GALLUZZI et al., 2012; NIKOLETOPOULOU et al., 2013).

Figura 9. Progressão da morte celular. Características morfológicas de necrose e apoptose.



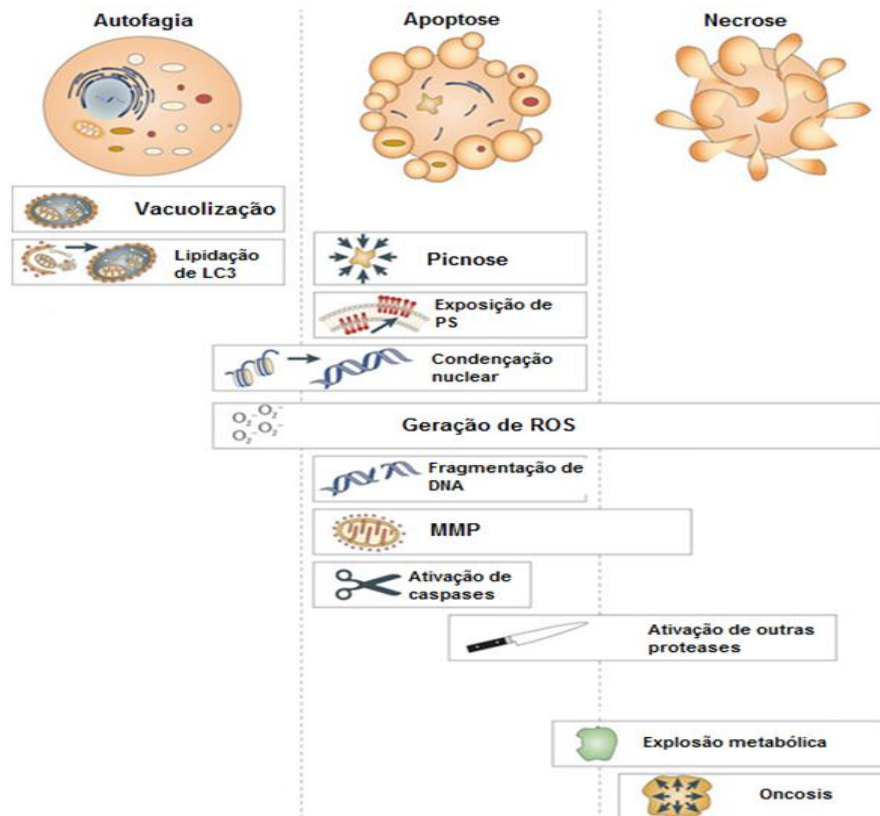
Fonte: <http://patologando.blogspot.com.br/2010/08/lesao-e-morte-celular.html>

A autofagia é um processo catabólico que promove a degradação dos componentes celulares por meio de um mecanismo lisossomal, é considerado um dos sistemas de degradação de proteína mais importante em células eucarióticas. A autofagia pode ser classificada microautofagia, autofagia mediada por chaperonas e macroautofagia. Sendo elas diferenciadas pelo modo de carrear cargas intracelulares para lisossomos. A macroautofagia é a mais estudada porque possui características intrínsecas, como a presença de vesículas de dupla membrana que carregam o material celular para os lisossomos. (TANABE et al. 2011; VIJAYAKURUP, et al., 2014).

É morfológicamente definida como um tipo de morte celular que ocorre na ausência de condensação da cromatina, porém é acompanhada de uma enorme vacuolização autofágica do citoplasma. Ela ocorre em resposta a um estresse metabólico que resulta na degradação de componentes celulares (DANIAL et al., 2004). Tem sido alvo molecular de estudo no câncer e o conhecimento de suas vias de sinalização vem sendo almejado por ser um processo celular de fundamental importância tanto na homeostase celular como também no conhecimento da tumorigênese e por ser uma via de resposta ao tratamento com determinados agentes quimioterápicos (WHITE; DIPAOLA, 2009).

A mTOR é uma proteína quinase bastante importante por controlar a tradução, progressão do ciclo celular e pela regulação negativa da autofagia é considerada a via clássica da autofagia. Porém, é conhecido que outras vias também controlam a autofagia. Uma delas é quando a autofagia é inibida devido à inativação do complexo Beclina-1/Vps34, isso ocorre quando o BCL-2 sequestra a Beclina-1. Além disso, ocorre a formação e expansão da membrana dos autofagossomos esse evento é mediado por sistemas de conjugação LC3 e Atg12. Em que o LC3 em sua forma citosólica, conhecida como LC3-I, sofre uma clivagem na porção C-terminal, quando um sinal pró-autofágico é reconhecido pela célula, sendo lipidificado para formar o LC3-II (SIVIERO, 2013). Com isso, a Beclina-1 e LC3 tornam-se marcadores específicos de autofagia (Figura 10) (KEPP et al., 2011).

Figura 10. Características das vias de morte celular autofágica, apoptótica e necrótica. LC3- cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos; PS- fosfatidilserina; ROS- espécies reativas de oxigênio.



Fonte: Adaptado de KEPP et al. 2011

## 1.5 NANOTECNOLOGIA COMO FERRAMENTA NO COMBATE AO CÂNCER

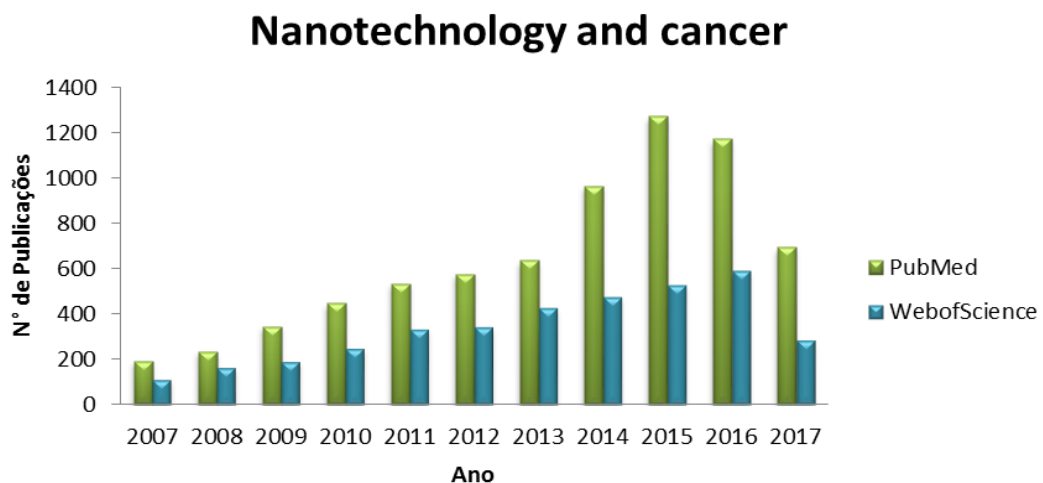
A nanotecnologia é vista na atualidade como um dos ramos mais promissores no campo científico. É uma ciência multidisciplinar por envolver várias áreas como a biologia, química, engenharia, física e que pode ser associada a ciências emergentes como a biotecnologia na constante busca por gerar produtos biotecnológicos de interesse para a indústria baseado nas necessidades da sociedade.

Nos últimos anos, a comunidade científica vem mostrando cada vez mais interesse pelo potencial dessa tecnologia, tanto o setor industrial propriamente dito, como a mídia clássica (BRASIL, 2011). Uma das áreas que sua aplicação tem se mostrado mais promissora é a área médica, chamada de nanomedicina, com o uso de nanomedicamentos, ou possibilitando cirurgias em escalas nanométricas, ou ainda através de moléculas capazes de transportar o fármaco para a célula ou órgão específico e até permitindo que o medicamento se comporte de forma que seja liberado aos poucos no organismo.

A nanotecnologia permite criar materiais em escala nanométrica ( $10^{-9}$ ) que apresentem propriedades físico-químicas distintas permitindo a criação de nanomedicamentos e nanocarreadores que podem ser utilizados no diagnóstico, na prevenção, na terapia ou em produtos direcionados para a saúde (FALLEIROS et al., 2001).

Um mapeamento de publicações nos últimos 10 anos (2007-2017) em duas plataformas de pesquisas o PubMed e *Web of Science* utilizando os termos “Nanotechnology AND cancer” foram encontrados 7.545 e 3.687 artigos, respectivamente (Figura 11).

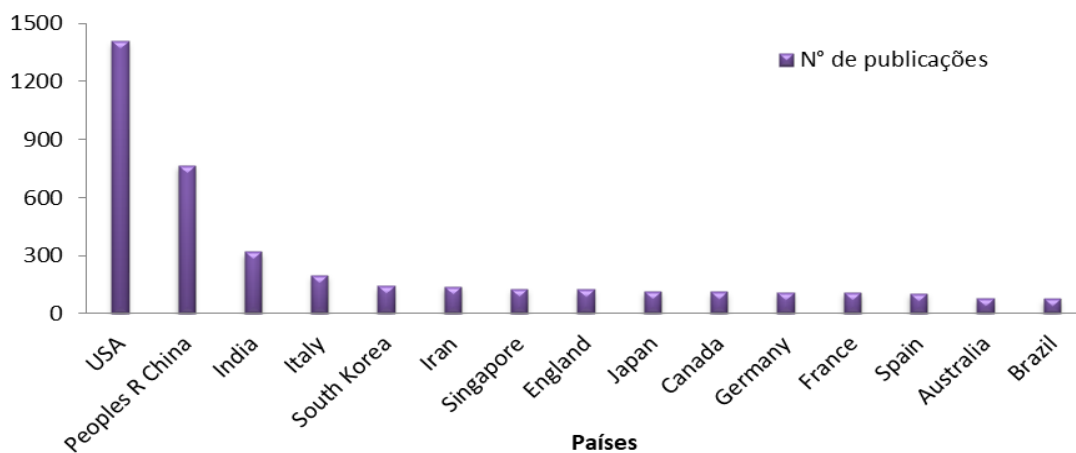
Figura 11. Progressão anual de artigos publicados ao longo de 10 anos nas bases PubMed e *Web of Science*, associando os termos “Nanotechnology AND cancer”.



Fonte: Autoria própria (2017)

Dados mostram que países como os EUA lideram em número de publicações nessa área de nanotecnologia (1.407), seguida pela China (767), mostrando assim grandes investimentos nesta área. O Brasil está na 15ª posição em pesquisas que utilizam a nanotecnologia voltado para cura ou diagnóstico do câncer segundo dados do *Web of Science* (Figura 12).

Figura 12. Número de publicações com os termos “Nanotechnology AND cancer” na base *Web of Science*.



Fonte: Autoria própria (2017)

Diversos trabalhos vêm descrevendo os benefícios do “Universo Nano” na terapêutica e isto se deve principalmente ao fato do seu sistema de entrega de fármacos apresentar vantagens como: proteção da degradação precoce e aumento da absorção, uma vez que facilita a sua difusão pelo epitélio vascular. Além de disso, o sistema nano consegue ultrapassar algumas barreiras enfrentadas por determinados fármacos como o poder de penetração e/ ou distribuição em células/tecidos alvo. Outro benefício é a possibilidade de realização de entrega simultânea de vários fármacos o que permitem controlar o seu uso e ao mesmo tempo diminuir os efeitos adversos, por regular espacial e temporalmente a sua liberação (ALLEN; CULLIS, 2004).

Atualmente, alguns nanomedicamentos estão sendo testados em ensaios clínicos de doença-alvo como o câncer, AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) dentre outras. As nanopartículas de albumina e o fármaco paclitaxel, encontram-se entre estes nanomedicamentos. Estudos já apontam o desenvolvimento de sistemas nanoparticulados como os principais candidatos para a vetorização dos fármacos, já que, além da vetorização

aumentar a concentração terapêutica no local do tecido tumoral (KARRA; BENITA, 2012), a manipulação de diversos parâmetros do nanossistema, como o tamanho da partícula, a natureza da superfície, o arranjo espacial, composição dos monómeros, bem como o peso molecular, permitem um melhor controle para obtenção de características farmacocinéticas desejáveis (ALEXIS; PRIDGEN, 2008).

Dentre os nanossistemas empregados na entrega de fármacos a nanotecnologia associada à farmacologia resultou no desenvolvimento de nanopartículas metálicas; micelas; vesículas; lipossomos; dendrímeros, conjugados fármaco-polímero; conjugado proteína-polímero, nanotubos de carbono, entre outros sistemas de liberação na terapêutica do câncer e de infecções.

## **1.6 COPOLÍMERO DE ÁCIDO LÁTICO E GLICÓLICO (PLGA)/LIPOSSOMAS COMO CARREADORES DE DROGAS CONTRA O CÂNCER**

As nanos e micro-partículas poliméricas são carreadoras constituídas de polímeros não antigênicos que podem ser naturais (albumina, quitosana, heparina) ou sintéticos, copolímero de ácido lático e glicólico (PLGA), copolímero de N-(2-hidroxipropil) e metacrilamida (HPMA), copolímero de poliestireno e anidrido maleico (SMA), polietilenoglicol (PEG), polímero de ácido glicólico (PGA)]. Formulações com o polímero PLGA têm sido amplamente utilizadas no diagnóstico e tratamento do câncer (BOLHASSANI et al., 2011).

O poli (ácido lático-co-glicólico) é um copolímero sintetizado através da copolimerização de dois monómeros diferentes de ácido glicólico e ácido lático. Os PLGAs são geralmente reconhecidos pela proporção de monómeros utilizado como, por exemplo, PLGA 50:50 identifica um copolímero cujos a composição é 50% de ácido lático e 50% de ácido glicólico (VASIR; LABHASETWAR, 2007; DANHIER et al., 2012). Ele é um dos polímeros mais utilizados para o desenvolvimento de nanomedicamentos porque sua hidrólise no corpo produz monómeros metabólitos biodegradáveis, ácido lático e ácido glicólico (ACHARYA; SAHOO, 2011) que são metabolizados no corpo através do ciclo de Krebs e removido como dióxido de carbono e água (JAIN, 2000; PANYAM et al., 2002; DINARVAND et al., 2011) resultando em toxicidade sistêmica mínima (ACHARYA; SAHOO, 2011). As nanopartículas em PLGA são comumente usadas para o encapsulamento de diversos medicamentos relacionados ao câncer e sua entrega bem sucedida in vivo (KUMARI et al., 2010).

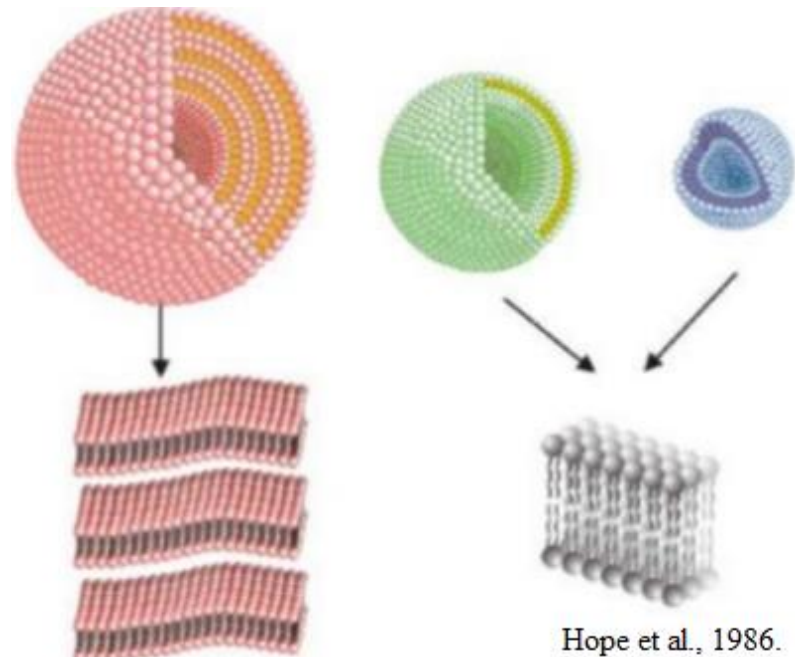


Lipossomas são vesículas microscópicas compostas de uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, separadas por um meio aquoso com capacidade de encapsular substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas. Na qual as hidrofílicas ficam no compartimento aquoso e enquanto as lipofílicas permanecem inseridas ou adsorvidas na membrana. Além disso, os lipossomas apresentam característica como biodegradabilidade, biocompatibilidade e não imunogenicidade tornando-os altamente versáteis para pesquisa, na utilização terapêutica e aplicações analíticas (EDWARDS; BAEUMNER, 2006; NEW, 1990; PUISIEUX *et al.*, 1995). Sua constituição é basicamente de fosfolipídeos (podendo ser de natureza sintética ou natural) sendo os tipos mais utilizados nas formulações os que apresentam uma forma cilíndrica como as fosfatidilcolinas, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e esfingomiélin, que tendem a formar uma bicamada estável em solução aquosa. Porém, as fosfatidilcolinas são as mais empregadas em pesquisa que utilizam como base as formulações lipossômicas, porque esta apresenta estabilidade frente a variações de pH e/ou concentração de sal no meio.

Os lipossomas são um dos nanocarreadores mais seguros e efetivos dos nanossistemas empregados atualmente na nanotecnologia, pois são vesículas compostas por uma bicamada lipídica unilamelar quando formados por uma única bicamada lipídica ou multilamelar quando são constituídos por múltiplas bicamadas em torno do compartimento aquoso interno com função de veicular uma concentração necessária e determinada de um fármaco (anestésicos, vacinas, bactericidas, antivirais, etc.), em um local ou órgão específico (PEREIRA, 2012).

Sua classificação pode ser de acordo com o tamanho das vesículas multi ou unilamelares que podem ser denominados como lipossomas multilamelares grandes – MLV (*multilamellar vesicles*) unilamelares pequenos - SUV (*small unilamellar vesicles*) e lipossomas unilamelares grandes - LUV (*large unilamellar vesicles*) (Figura 13). Ou estar relacionado ao método de preparo podendo ser caracterizados como: REV (vesículas obtidas por evaporação em fase reversa), FPV (vesículas obtidas em prensa de French) e EIV (vesículas obtidas por injeção de éter) (LASIC, 1998; VEMURI, RHODES, 1995).

Figura 13. Representação quanto ao tamanho das vesículas sendo a cor rosa MLV, a cor verde LUV e a azul SUV.



Fonte: Hope et al. 1986.

Os lipossomas tem ganhado grande destaque porque além de promover proteção aos fármacos contra a degradação por enzimas plasmáticas eles podem apresentar biocompatibilidade com as células, promovendo a liberação lenta e controlada da droga e com isso reduzindo uma possível toxicidade sistêmica além de aumentar a eficácia da droga e minimizar seus efeitos adversos (SPUCH; NAVARRO, 2011). Além disso, formulações multifuncionais estão sendo projetadas para melhorar a seletividade de localização, permitindo assim maior especificidade em tipos distintos de tecido. Chen et al. (2015) usaram um lipossoma modificado com ácido glicirretínico (GA) para carregar oxaliplatina (OX) para estudos de biodistribuição direcionados ao fígado e os resultados sugeriram que os lipossomas não apresentam sinais de necrose epitelial.

Com isso, os lipossomas mostram que não só aumentam a absorção intracelular de drogas, mas também podem ser usados para modificar agentes anticancerígenos, antibióticos e DNA. Liu et al. (2014) utilizando uma plataforma A iaram um transportador de doxorrubicina que realizou aumento do efeito tumoricida do fármaco e reduziu os efeitos adversos sistêmicos. A plataforma de lipossomas de RNA é outra estratégia promissora para aumentar a eficácia terapêutica (SAWANT; TORCHILIN, 2011). Recentemente, as protocélulas foram projetadas para incorporar vários tipos de modificações e com isso alcançar um sistema abrangente de entrega de nanodrogas. Os agentes de

quimioterapia, o RNA de interferência curta e as nanopartículas, por exemplo, podem ser acoplados ou encapsulados em um núcleo de sílica nanoporosa para simular o tratamento de quimioterapia com administração de fármaco específica ao local. A bicamada lipídica de suporte também pode ser decorada com moléculas visando à superfície, tais como peptídeo fusogênico e polietilenoglicol, de acordo com o tipo de tumor ou vascularização.

Além disso, esse nanossistema lipossomal, pode ser uma ferramenta promissora na terapia gênica contra o câncer, pois podem ser utilizados como vetor não-viral para a administração de genes formando o complexo lipossomas/DNA (LEE; LEE 2012). Felgner et al. (1987) desenvolveram um lipossoma incorporado a um oligodesoxinucleótido anti-senso específico para mRNA de proteína 2 (Grb2) ligado ao receptor do fator de crescimento (L-Grb2). Estes lipossomas inibiram a expressão da proteína Grb2, que promoveu a redução da proliferação celular de leucemias positivas para BCR-ABL e ao avaliar o tempo de ação observou-se que houve um sobrevivência prolongada em camundongos com xenoinxertos de leucemias positiva para BCR-ABL (TARI, et al. 2007).

O início de sua ação irá depender da forma que os lipossomas interagem com a célula, porém a adsorção acontece com praticamente qualquer tipo de célula. A velocidade com que uma droga é liberada de um lipossoma adsorvido depende do tamanho e da composição da membrana lipídica, do tipo de droga encapsulada e da natureza da célula (OSTRO, 1987a). Após a adsorção, as vesículas lipídicas podem sofrer processos de endocitose, sendo englobadas pelas células, em troca de lipídios com a membrana celular, ou por meio de fusão com a célula, onde a bicamada lipídica dos lipossomas íntegra com a membrana celular e o conteúdo aquoso da vesícula são anexados ao fluido citoplasmático (OSTRO, 1987b).

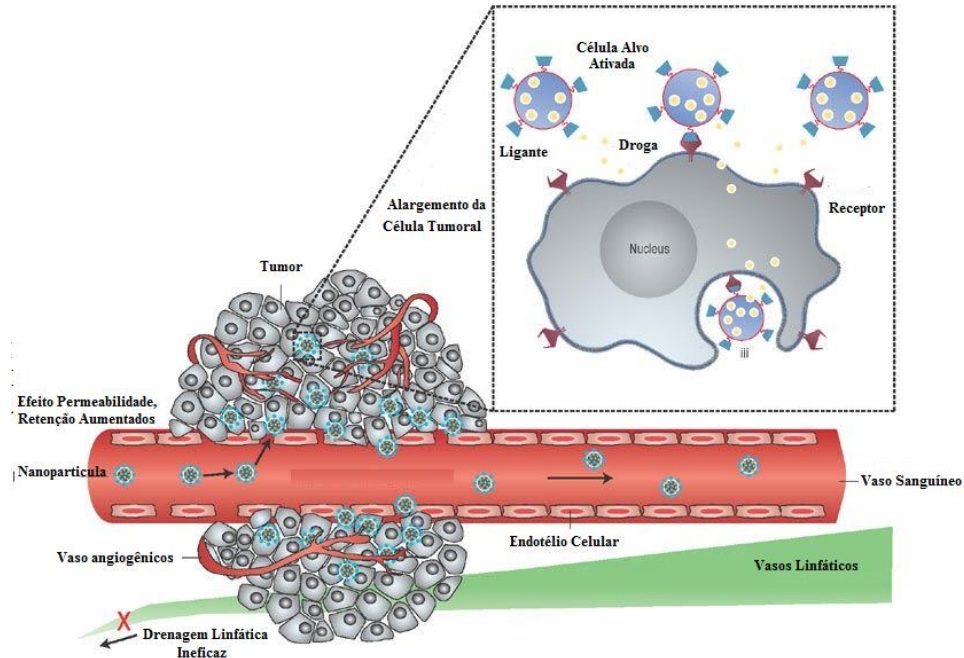
A utilização de lipossomas como veículo de fármacos contra diversas doenças, como o câncer, já estão disponíveis no mercado (Doxorrubicina lipossomal peguilada (Doxil®), por exemplo), ou já se encontram em diferentes estágios de testes clínicos como lipossomas contendo oxaliplatina que se encontra na fase I (OLIVEIRA et al, 2012). Outro exemplo que se pode dar é o paclitaxel que apresenta baixa solubilidade em água e clinicamente é administrado dissolvido em Cremophor EL e etanol, porém essa combinação causam efeitos secundários graves. Testes utilizando o paclitaxel em formulações lipossômicas provaram ser uma boa abordagem para eliminar este veículo e melhorar a eficácia antitumoral do fármaco (CROSASSO et al, 2000).

Os lipossomas são carreadores lipídicos de fármacos e apresentam uma melhora acentuada da farmacocinética do fármaco sendo considerado um dos mais promissores

sistemas de liberação. Porém, uma das desvantagens é que eles são rapidamente eliminados pelo sistema reticular endotelial, então para contornar esse problema os lipossomas sofrem modificações em sua superfície permitindo assim, sua permanência por um período maior na circulação. Uma das alterações realizadas é a inclusão de componentes hidrofílicos naturais como o monossialogangliosido GM1 e fosfatidilinositol, ou de polímeros hidrofílicos sintéticos, especificamente os polietilenoglicóis (PEG) (SAGRISTÁ et al., 2000; TORCHILIN, 2005). Outra forma é promover o direcionamento ativo com a adição de anticorpos ou de pequenas moléculas protéicas.

Além disso, os fármacos encapsulados em nanopartículas de 50 a 800 nm não são capazes de atravessar a parede dos vasos de regiões não inflamadas do organismo, pois este espaço é de apenas 15 a 30nm, contudo regiões inflamadas ou mesmo aquelas onde estão os tumores, as células endoteliais são menos unidas entre si quando comparadas as células de regiões não inflamadas, com isso possibilita o acúmulo de nanopartículas no tecido tumoral vizinho ao vaso sanguíneo (Figura 14) (KHAWAR et al. 2015; PER et al. 2007).

Figura 14. Acúmulo de nanopartículas em tecido tumoral nas proximidades dos vasos sanguíneos.



Fonte: <https://images.nature.com/full/natureassets/nnano/journal/v2/n12/images/nnano.2007.387-f1.jpg>

## 1.7 SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS E SISTEMAS BIOLÓGICOS

A triagem virtual é uma técnica computacional que vem sendo utilizada na identificação de moléculas com potencial terapêutico, além de otimizar o tempo e reduzir custos na pesquisa este método estabelece um perfil experimental completo da relação estrutura-atividade (REA) para compostos sintetizados.

A modelagem computacional, ou experimentação *in silico*, desempenha, atualmente, papel fundamental na investigação e compreensão das propriedades de sistemas nanométricos e na construção de novas moléculas com potencial farmacológico e na compreensão das interações moleculares que ocorrem em sistemas biológicos. A evolução do poder computacional, tanto do ponto de vista de *hardware* quanto do desenvolvimento de algoritmos, e níveis teóricos cada vez mais detalhados baseados na estrutura eletrônica, tornou factível a simulação das propriedades físicas e químicas dos fármacos. O processamento em paralelo e o incremento da capacidade dos métodos teóricos e do *software* têm levado a resultados marcantes nos cálculos de propriedades estruturais, eletrônicas, ópticas e dinâmicas (mais recentemente) de complexos sistemas biológicos (SHERRILL, 2010; MARCH; MATTHAI, 2010).

### 1.7.1 ADME/TOX E PHARMMAPER

A descoberta de drogas é um esforço complexo e caro que normalmente requer várias etapas que entre elas a seleção das doenças, hipótese de alvos, identificação de compostos por *screening*, otimização do alvo, testes pré-clínicos, testes clínicos e otimização farmacogenômica. Tornando-se assim, necessárias técnicas que possam facilitar o processo de descoberta e otimização do fármaco.

Estudos farmacológicos são de fundamental importância por permitirem conhecer detalhadamente os princípios pelos quais os alvos moleculares reconhecem, interagem e se associam com moléculas ativadoras ou inibidoras. Com isso a biologia computacional tem dois ramos distintos: conhecimento e descoberta ou mineração de dados que pode extrair padrões ocultos de grandes quantidades de dados experimentais, formando assim hipóteses como resultados. A análise baseada em simulação testa hipóteses com experiências *in silico*, fornecendo previsões a serem testadas por estudos *in vitro* e *in vivo* (KITANO, 2002).

Desta forma a investigação *in silico* permite prever rotas metabólicas desde a estabilidade metabólica global de um composto, até a avaliação da energia de ligação das enzimas metabolizadoras. Podendo estabelecer comportamentos mais complexos como o destino metabólico de um fármaco, desde informações da química computacional e as técnicas de visualização gráfica, além de prever com a maior precisão possíveis cálculos de afinidade da interação receptor-ligante, promovendo a revelação de novas estruturas (SIPPL, 2002). Esses cálculos são parte fundamental nos projetos de descoberta e desenvolvimento de novas drogas. (BOYER et al., 2007)

Uma das primeiras etapas desse processo é a utilização de ferramentas que permitem a seleção de moléculas a partir da previsão de suas propriedades ADME/Tox, evitando potenciais problemas relacionados com algumas propriedades dessas moléculas, como toxicidade, não solubilidade e baixa absorção, ou ainda para alertar potenciais problemas que podem ser verificados experimentalmente (CZODROWSKI et al., 2009). Estes resultados fornecem *in silico* uma previsão preliminar do comportamento *in vivo* de um composto e com isso permite avaliar seu potencial terapêutico. Um dos softwares que permite essa informação é *Fafdrugs3*, pois ele possui a combinação de diversos fatores, isto é, uma variedade de ensaios experimentais que caracterizam cada aspecto dos processos. As ferramentas envolvidas incluem desde métodos físicoquímicos a ensaios biológicos usando frações subcelulares, cultura celular primária, linhagens celulares imortalizadas, tecidos e órgãos inteiros. Os dois desafios principais enfrentados por esses ensaios na fase de descoberta são: Taxa de transferência maior e menor tempo para a recuperação de dados, ambos resultantes da necessidade de visualizar rapidamente um grande número de compostos, porém, novos formatos de ensaios ADME-Tox *in vitro* e o avanço tecnológico vêm superando esse desafio. (YU; ADEDOYIN, 2003)

Outra etapa importante da predição *in silico* consiste na identificação de potenciais candidatos-alvo para as pequenas moléculas (medicamentos, produtos naturais ou outros compostos recém-descobertos com alvos de ligação não identificados) usando abordagem de mapeamento de farmacóforo. Sendo este um arranjo espacial um dos recursos essenciais para uma molécula interagir com um alvo específico. Um servidor que permite esse mapeamento é PharmMapper, servidor *web* de acesso livre projetado que possui um grande número de base de dados de farmacóforo (ou seja, PharmTargetDB) selecionados cuidadosamente dos TargetBank, BindingDB, DrugBank e banco próprio de dados de potenciais alvos de drogas que inclui mais de 7000 modelos de farmacóforos baseados em receptores (cobrindo mais de

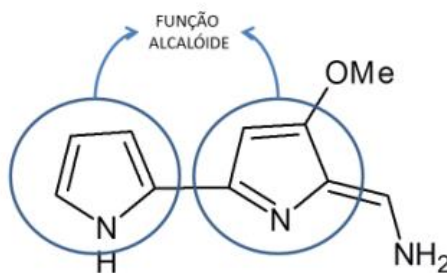
1500 informações de alvos de drogas). Este servidor encontra automaticamente as melhores posições de mapeamento da molécula de consulta contra todos os modelos de farmacóforo no PharmTargetDB e lista os melhores *hits* com anotações de destino apropriadas, bem como as posições alinhadas da molécula respectiva são apresentadas.

## 1.8 ALCALÓIDES: TAMBJAMINAS E PRODIGIOSINA

As Tambjamins pertencem ao grupo de alcalóides que foram isolados de bactérias e invertebrados marinhos, incluindo bryozoários, nudibranquios e ascídias (1-5). Estruturalmente as Tambjamins pertencem ao grupo que apresenta o núcleo (Z)-1-(4'-metóxi-1H,5'H-2,2'-bipirrol-5'-ilideno) metanamina (Figura 15) que inclui vários compostos antitumorais, tais como os pertencentes à família da prodigiosina tripirrolíca, grupo de pigmentos vermelhos produzidos por microorganismos (*Serratia* spp. e Actinomycetos) que apresentam propriedades antibacterianas, antifúngicas, antimaláricas e citotóxicas (MONTANER; PÉREZ-TOMÁS, 2003; FRANCISCO et al., 2007).

As Tambjamins parecem estar relacionadas com o mecanismo de defesa química dos organismos aos quais são obtidas (CARTÈ; FULKNER, 1986; MERVIN et al., 1999). Vários desses alcalóides possuem um amplo espectro de propriedades farmacológicas incluindo antimicrobiana e atividades imunossupressoras. (LINDQUIST; FENICAL, 1991; TANIGAKI et al., 1999; CAVALCANTI et al., 2008) 9,10. Nosso grupo de pesquisa demonstrou que além dessas atividades as substâncias apresentavam também, atividade citotóxica contra várias linhagens de células tumorais (PIKERTON, et al., 2010; NEPOMUCENO, 2012).

Figura 15. Núcleo químico característico da classe tambjamina.

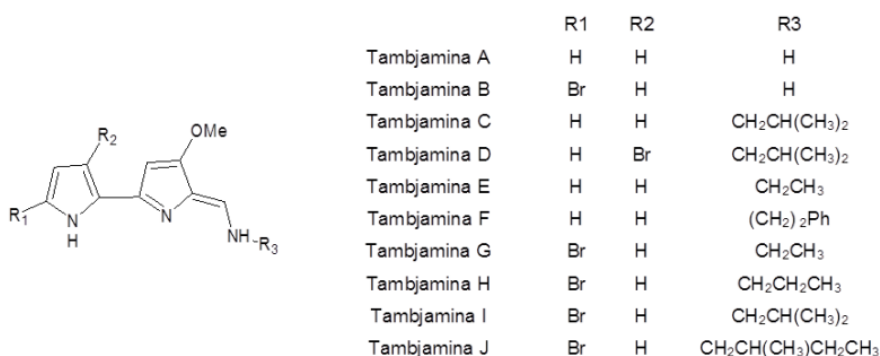


Fonte: Nepomuceno (2012).

Nepomuceno, 2012, testou 10 alcalóides bipirrolícos pertencentes à classe das tambjamins, identificados por letras do alfabeto (A-J) e descritos na figura 16 e mostrou que

asinúmeras alterações estruturais das tambjamins possibilitam várias propriedades biológicas. Trabalhos demonstraram que as tambjamins atuam como intercalantes de DNA, especialmente na presença de Cu (II) permitindo que esses compostos se liguem ao DNA e realizem sua clivagem. Provavelmente, essa capacidade intercalante está relacionada, em parte, com o potencial citotóxico desses alcalóides (MANDERVILLE, 2001).

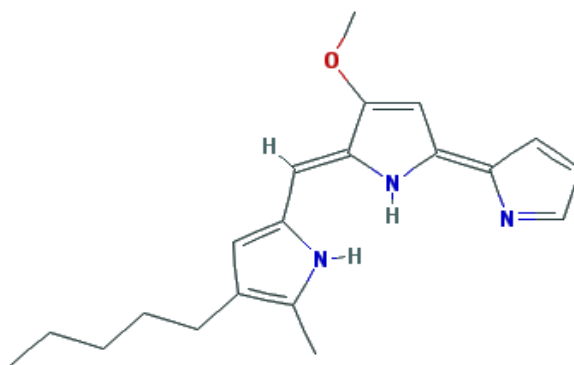
Figura 16. Estrutura química dos primeiros 10 alcalóides bipirrólicos descobertos pertencentes à classe das Tambjamins.



Fonte: Nepomuceno (2012).

Outro alcaloide bastante estudado é a Prodigiosina em virtude, também, do seu potencial como uma droga quimioterapêutica e vem demonstrado forte efeito citotóxico contra linhagens celulares tumorais humanas hematopoiéticas, gastrointestinais, de mama e de pulmão através de processos indutores de apoptose (PÉREZ-TOMÁS et al., 2003).

Figura 17. Estrutura da Prodigiosina, alcaloide tripirrólico.



Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>



## 2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

O câncer é uma patologia de alta incidência e uma das principais causas de morte em todo mundo (WHO, 2012). Segundo a Organização Mundial de Saúde, mesmo com o conhecimento dos fatores de risco e dos diversos recursos disponíveis para diagnóstico e tratamentos de cânceres há uma estimativa de crescimento na incidência dessa doença para as próximas décadas mundialmente. Porém, mais de 70% das mortes por câncer ocorreram em países de baixa e média renda (WHO, 2012).

Devido à complexidade patológica do câncer as terapias utilizadas muitas vezes são de associações de quimioterápicos de origens e mecanismos de ação diferenciados (GOODMAN; GILMAN, 2012) ou a busca por novas substâncias ativas que possam ser usadas contra o câncer. Uma das substâncias encontradas com perfil anticâncer foi o alcaloide biperólico extraído de organismos marinhos denominado de Tambjamins. Essa substância apresentou efeito antiproliferativo em diversas linhagens tumorais, porém não apresenta seletividade. Além da busca por novos protótipos, diversificadas estratégias estão sendo incluídas na criação de poderosas ferramentas computacionais na busca de novas moléculas ativas e a incorporação da biotecnologia por meio de fármacos encapsulados contra o câncer. Isto porque os estudos *in silico*, ou baseados em técnicas computacionais vem atuando de forma significativa em simulações de dinâmica molecular para investigar estrutura e função de biomoléculas e seus respectivos complexos, e interações moleculares no processo de planejamento racional de fármacos.

Atualmente, esta técnica tem sido bastante utilizada para auxiliar e complementar o planejamento de novos ligantes de um alvo terapêutico, bem como estimar a sua potência (KLEIN; SHINODA, 2008; SHERRILL, 2010; MARCH; MATTHAI, 2010).

Além disso, a nanotecnologia vem sendo considerada outra importante estratégia utilizada na oncologia, pois sua utilização vem sendo realizada com sucesso tanto no diagnóstico como na prevenção e no tratamento do câncer, mostrando resultados promissores em relação à medicina tradicional (JAIN; STYLIANOPOULOS, 2010). Isto porque formulações favorecem a alteração das características de solubilidade de substâncias ativas, auxiliam sua estabilidade, diminuem sua degradação, controlam sua biodisponibilidade, favorecerem sua concentração no local de ação, melhoraram sua eficácia terapêutica, além de diminuir seus efeitos indesejados (KITA; DITTRICH, 2011; ADAIR et al, 2010). Por tanto, esses sistemas nanoencapsulados com capacidade de liberação controlada de drogas tem superado as limitações e inconvenientes das formulações convencionais (CUKIERMAN; KHAN 2010)

Em tratamentos quimioterápicos estes sistemas podem contribuir para a liberação do fármaco especificamente no alvo, reduzindo os efeitos adversos, além de alterar a farmacocinética e farmacodinâmica das drogas (HU et al., 2011; CUKIERMAN; KHAN, 2010). Sistemas lipossomais de liberação de drogas, incluindo as nanopartículas apresentam ainda o potencial de se acumular preferencialmente nas proximidades da massa tumoral, devido a hipervascularização tumoral, ao processo de permeabilidade aumentada e retenção (*Enhanced Permeability and Retention –EPR*) (HU et al., 2011).

Neste contexto, pretendem-se encontrar por simuladores computacionais possíveis alvos das Tambjamins (I e J)e, além disso, encapsular os alcaloides sintéticos metoxipirrólicos em PLGA e/ou lipossomas. Posteriormente avaliar a caracterização (físico-química e biologicamente) desses nanossistemas, pois essas substâncias apresentaram resultados comprovados de seu potencial antitumoral, porém com muitos efeitos adversos. Com isso pretende-se melhorar tanto a biodisponibilidade como a eficácia terapêutica além de reduzir a toxicidade para posteriores estudos *in vivo*.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Encapsular e caracterizar os nanossistemas contendo Tambjamins I e J e avaliar seu efeito antiproliferativo, genotóxico e mutagênico *in vitro* sobre linhagens celulares tumorais e não tumorais.

#### 3.2 Objetivos específicos

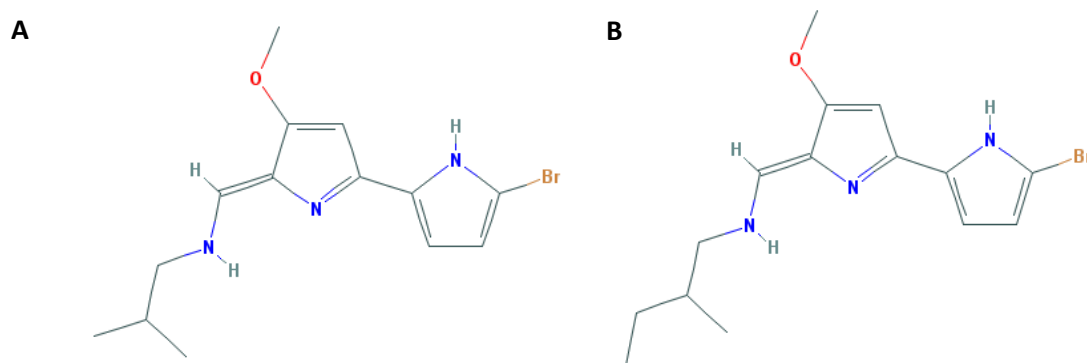
- Realizar estudo de prospecção tecnológica com a classe das Tambjamins (I e J);
- Preparar as nanopartículas de PLGA e/ou Lipossoma contendo as Tambjamins I e J sintéticas;
- Caracterizar do ponto de vista químico, físico e físico-químico os nanossistemas;
- Determinar a citotoxicidade dos alcalóides Tambjamina I e Tambjamina J encapsuladas em lipossomas contra linhagens celulares humanas (tumorais e não tumorais);
- Avaliar o efeito das Tambjamins (I e J) nos nanossistemas contra linhagens celulares humanas (tumorais);
- Determinar o efeito das drogas livre e encapsuladas sobre a progressão do ciclo celular;
- Avaliar o padrão de morte celular envolvido na atividade citotóxica das Tambjamins em células de câncer colorretal humano HCT-116;
- Avaliar efeito dos compostos sobre a despolarização mitocondrial;
- Avaliar efeito genotóxico/mutagênico dos compostos;
- Avaliar *in silico* o potencial farmacológico desses compostos e potenciais alvos moleculares.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Esquema metodológico experimental

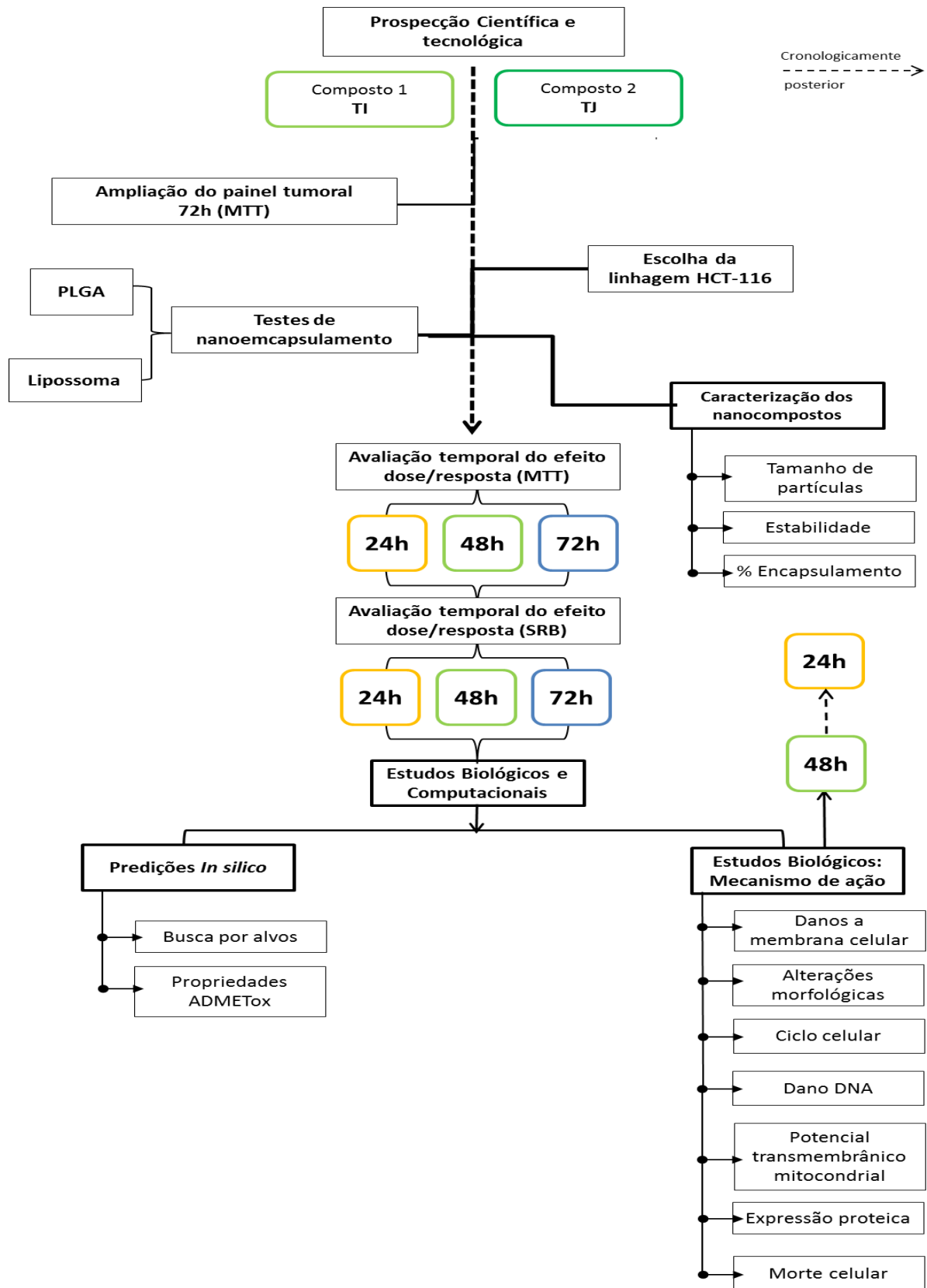
Os dois alcalóides bipirrólicos foram sintetizados e cedidos para realizaçãodos testes de atividade citotóxica, utilizando o método do MTT (3-(4,5-dimatil-2-tiazol)-2,5-difenilbrometo de tetrazólio) e então determinação da atividade biológica. Os compostos foram sintetizados pelo grupo de química, Research School of Chemistry - Institute of Advanced Studies da Australian National University, supervisionado pelo Prof. Martin Banwell da National Australian University (ANU), que vem colaborando com o grupo de pesquisadores do LabNOE/UFC. As Tambjamins I e J (Figura 18) apresentaram atividade citotóxica considerável e foram escolhidas para serem encapsuladas porque apresentaram toxicidade em células *in vitro*, além disso, a Tambjamina J utilizada em testes *in vivo*, realizados em estudos prévios do grupo, apresentou elevada toxicidade (NEPOMUCENO, 2012). Após o encapsulamento com lipossoma foi realizada a caracterização das nanopartículas testadas avaliando o potencial zeta, tamanho de partícula, taxa de encapsulamento e morfologia dos nanossistemas. Posteriormente foi realizado testes de citotoxicidade em linhagens de células tumorais e não tumorais, comparando a droga livre e encapsulada. Realizou-se, também, ensaio de monitoramento da proliferação e viabilidade em tempo real (XCelligence) e citometria de fluxo. Na avaliação da morfologia celular utilizou-se da técnica de microscopia óptica. O esquema metodológico experimental descrito está representado graficamente na figura 19.

Figura 18. Estrutura química das Tambjamins analisadas no presente estudo. (A) Tambjamina I e (B) Tambjamina J.



Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

Figura 19. Esquema metodológico experimental das avaliações realizadas para concretização dos objetivos propostos no trabalho.

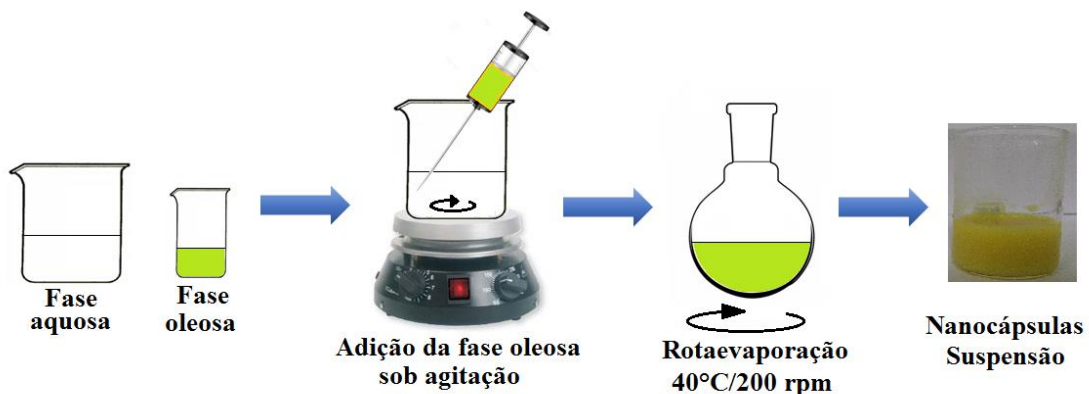


Fonte: Autoria própria (2017).

## 4.2 Formulação de nanopartículas em PLGA

O preparo das nanopartículas de PLGA encapsulada com as Tambjamins seguiram os seguintes passos: (a) o polímero de ácido láctico e glicólico (PLGA 50:50) da sigma, óleo de soja (UltraPur soja da empresa Natural Products & Technologies), o princípio ativo (algum dos fármacos) e o fosfolípido de soja foram, cada um, dissolvidos em solvente (acetona, diclorometano, metanol ou combinação entre eles). Todas estas soluções orgânicas foram em seguida misturadas e mantidas à temperatura ambiente sob agitação magnética a 150 rpm durante 10 min (fase orgânica). A fase aquosa consistiu de Poloxamer<sup>®</sup> 188 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e trealose 10% dissolvidos em 50 mL de solução tampão de fosfato (pH 7,4) a 0,2 M, em seguida, a solução orgânica foi gradualmente gotejada na fase aquosa sob agitação magnética a 150 rpm durante 30 min. Posteriormente, a acetona foi removida sob pressão reduzida a 40°C e a suspensão coloidal foi concentrada até um volume final de 10 mL por remoção da água em condições semelhantes (Figura 20) (SANTOS et al., 2005).

Figura 20. Ilustração do processo de nanoencapsulamento de Tambjamins (TI e TJ) em polímero de ácido láctico e glicólico (PLGA) pelo método de emulsão simples (o/a).



Fonte: Autoria própria (2017).

## 4.3 Formulação de nanopartículas lipossomais

As substâncias de Tambjamine I (TI) e J (TJ) sintetizadas e doadas pelo Prof. Dr. Martin Banwell, do Instituto de Química da Universidade Nacional da Austrália. Os reagentes usados para formação de nanossistemas foram fosfatidilcolina de soja (PC) (Lipoid-S 100) (Ludwigshafen, Alemanha). Colesterol (CHOL  $\geq 99\%$  de pureza), octadecilamina (ODA  $\geq 97\%$  de pureza) e Trealose (Sigma-Aldrich; Steinheim, Alemanha). Clorofórmio e metanol

(Merck, Pennsylvania, EUA). Doxorrubicina e Prodigiosina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Meio RPMI-1640, DMEM, penicilina e estreptomicina (Gibco; Invitrogen, Carlsbad, CA). Soro bovino fetal (FBS) (Cultilab; Campinas, SP).

Os lipossomas foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico a partir de adaptação do protocolo proposto por Lira et al, 2009. O primeiro passo consiste na dissolução sob agitação de Fosfatidilcolina de soja, Colesterol (CHOL), Octadecylamine (AS) e Tambjamina (I ou J) em solução de clorofórmio/metanol 3:1 (v/v). Após a total solubilização de todos os constituintes da solução orgânica foi rotoevaporada da IKA (RV10 CONTROL) sob pressão reduzida para remoção do solvente e obtenção do filme lipídico seco. Em seguida foi realizada a hidratação o filme lipídico adicionando solução de fosfato pH 7,4 adicionado 0,1% de Trealose e a suspensão lipossomal foi sonicada na sonda de ultrassom (modelo Q125, marca QSonica, ) a 200 W durante tempo (segundos), amplitude de 20% e ciclos pulsados (ciclo ON e Ciclo OFF) para obter vesículas unilamelares pequenas (SUV) (Figura 21).

Figura 21. Ilustração do processo de nanoencapsulamento de Tambjamins (TI e TJ) em lipossoma pelo método de hidratação do filme lipídico.



Fonte: Autoria própria (2017).

### **4.3.1 Caracterização dos nanossistemas para liberação de drogas anticâncer**

#### **4.3.1.1 Distribuição do tamanho de partículas e potencial zeta**

O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, sendo este influenciado por mudanças na interface com o meio dispersante, que pode ser por influenciado pela dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou por adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (MAGENHEIM; BENITA, 1991; MOSQUEIRA, 2000). O módulo de seu valor relativamente alto é de grande importância, pois representa boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal devido às altas forças

repulsivas e conseqüentemente a tendência a evitar agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes.

A análise do Potencial Zeta permite medidas de controle de qualidade, uma vez que permite avaliar o efeito causado pela formação de cargas elétricas nas interfaces, fenômeno denominado de eletrocinética.

A análise da distribuição do tamanho das nanopartículas foi realizada utilizando um equipamento de espalhamento dinâmico de luz, onde a fonte de luz (laser de 10 mW, He-Ne com comprimento de onda de 633 nm) é posicionada em um ângulo fixo de 90°. A medida do potencial zeta foi realizada utilizando-se o aparelho Zetasizer 3000 HSA da Marven Instruments, onde, no interior da célula eletroforética foi injetados 5 mL da suspensão coloidal.

#### *4.3.1.2 Eficiência da encapsulação*

Para este fim foi utilizado a leitura do filtrado em membrana Millipore 0,20 µm (Millipore, USA) para calcular quanto de Tambjamina estava dentro dos lipossomas (tambjamina encapsulada). A eficiência de encapsulação da foi determinada pela técnica de filtração usando unidades (Millipore, EUA) uma alíquota de amostra lipossomal (1 ml) foi diluída em água MilliQ (1 ml) e posteriormente transferida para unidades filtrantes (Millipore®). O filtrado (líquido que passou pela membrana Millipore contendo somente Tambjamina livre) foi dosado em UPLC (ultra-performance liquid chromatography- Acquity (Waters, Manchester, UK)). A quantidade de Tambjamina encapsulada foi obtida a partir da diferença entre a quantidade total dosada na formulação e aquele obtido no filtrado nesta etapa experimental.

Desta forma foram calculados após a leitura do filtrado do eppendorff em UPLC/Q-TOFMS/MS (valor “y”) foi posto na curva padrão usando a equação da mesma forma como na dosagem da Tambjamina e comparando com a curva de Tambjamina livre (sem nanoencapsulação) com concentrações de 0,05 a 1 µg/mL em MeOH grau UPLC.

#### *4.3.1.3 Estudo de estabilidade*

Para avaliar a estabilidade dos nanossistemas lipossomais contendo as drogas foram utilizados períodos de tempo determinados (7 dias – 12 meses). As formulações foram, a cada



intervalo de tempo, testadas *in vitro* e avaliadas quanto às características organolépticas e morfológicas.

#### 4.3.1.4 Avaliação da estabilidade acelerada e ao longo prazo das formulações

O teste de estabilidade acelerada avalia as condições de estresse a que as formulações foram submetidas a partir da sua fabricação, transporte e armazenamento. Após 24h da preparação, as formulações foram centrifugadas a 6000 rpm, 4 °C por 1 hora para simular a passagem acelerada do tempo, assim foram submetidas a agitação mecânica por 48 horas a  $37 \pm 1$  °C, para simular condições de transporte (LIRA *et al.*, 2009; ANCHIÊTA-JUNIOR *et al.*, 2014; MORENO *et al.*, 2014). Para monitoramento das formulações ao longo do tempo, o teste de estabilidade foi iniciado logo após o preparo das formulações e o ao longo dos dias. Os parâmetros avaliados foram: aspecto macroscópico, variação do pH e tamanho das partículas (LIRA *et al.*, 2009).

#### 4.3.1.5 Análise morfológica dos nanossistemas

A disposição dos nanossistemas em solução foi observada sob microscopia óptica sob aumento de 40x após preparo dos nanossistemas, após 24 horas de armazenamento em temperatura ambiente. Foi avaliado formação de cristais, aglomeração dos lipossomas e homogeneidade da formulação.

## **4.4 Avaliação da atividade citotóxica *in vitro***

### **4.4.1 Obtenção e cultivo de células**

A maioria das linhagens utilizadas nesse trabalho foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (*United States- National Cancer Institute*, US-NCI) e 3T3 foi pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células tumorais e não tumorais foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning®, 25 cm<sup>2</sup>, volume de 50 mL e 75 cm<sup>2</sup>, volume de 250 mL), utilizando o meio de cultura RPMI 1640 ou DMEM (Gibco®) específico para cada linhagem utilizada, suplementados com 10 % de soro fetal bovino (SBF, Gibco®) e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). Todas as linhagens foram mantidas em incubadoras de células (NUAIRE TS Autoflow®) a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade.

### **4.4.2 Avaliação da atividade citotóxica em linhagens celulares *in vitro* (MTT)**

A avaliação da citotoxicidade das amostras foi realizada por meio do ensaio de MTT que consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazólio (MTT) solúvel em água, de cor amarela, em cristais insolúveis de formazan, de cor púrpura. A conversão do MTT ocorre apenas em células viáveis e metabolicamente ativas, através da ação de enzimas desidrogenases mitocondriais, fato que permite a quantificação indireta da porcentagem de células vivas (MOSMANN, 1983). O produto insolúvel formado pode ser dissolvido por alguns solventes e sua quantificação é realizada a partir de absorbância, utilizando um espectrofotômetro.

Para essa finalidade as linhagens utilizadas foram plaqueadas em placas de 96 poços, sendo as concentrações de plaqueamento específicas para cada tipo de célula (Tabela 1). Após 24h de incubação em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, foram adicionadas às placas as substâncias diluídas em meio completo em concentrações que variaram de 0,3 a 30µM para as substâncias Tambjamins I e J para o controle positivo, Doxorubicina (DOX, Sigma®)(0,3µM). As placas foram reincubadas por 72 horas em estufa sob condições de cultivo padrão. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas a 1500 rpm por 15 min e os sobrenadantes removidos e posteriormente, foram adicionados em 150 µL da solução de MTT (0,5 mg/mL), diluído em RPMI 1640, em cada poço, e, então, as placas foram incubadas por mais 3h. Passado o último tempo de incubação, as placas foram novamente centrifugadas,

sendo, desta vez, a 3.000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi desprezado. A absorbância foi medida, após dissolução do precipitado com 150  $\mu$ L de Dimetilsulfóxido (DMSO, Dinâmica) P.A., a leitura foi realizada em espectrofotômetro de placa (Beckman Coulter Inc., modelo DTX-880), no comprimento de onda de 595nm. A leitura foi realizada utilizando o programa *Multimode Detection Software* (Beckman Coulter Inc.). Análise dos dados foi realizada, a partir de três experimentos independentes, e suas  $CI_{50}$ (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e respectivos  $\pm$  desvio padrão (DP) da porcentagem de inibição do crescimento celular foram calculados usando o programa *GraphPad Prism 6*.

Tabela 1. Lista de linhagens utilizadas com suas origens e concentrações de plaqueamento.

<b>Linhagem Celular</b>	<b>Doença</b>	<b>Organismo</b>	<b>Concentração de Plaqueamento (cél/mL)</b>
<b>K-562</b>	Leucemia Mielóide Crônica	Humano	$3,0 \times 10^5$
<b>SF-295</b>	Glioblastoma	Humano	$1,0 \times 10^5$
<b>PC-3</b>	Adenocarcinoma de Próstata	Humano	$1,0 \times 10^5$
<b>HCT-8</b>	Carcinoma colorretal	Humano	$7,0 \times 10^4$
<b>HCT-116</b>	Carcinoma colorretal	Humano	$7,0 \times 10^4$
<b>SW-620</b>	Carcinoma colorretal	Humano	$1,0 \times 10^5$
<b>NCI-460</b>	Carcinoma hepatocelular	Humano	$4,0 \times 10^4$
<b>MCF7</b>	Adenocarcinoma de mama	Humano	$1,0 \times 10^5$
<b>HEPG2</b>	Carcinoma hepatocelular	Humano	$1,0 \times 10^5$
<b>PC9</b>	Adenocarcinoma de pulmão	Humano	$0,9 \times 10^5$
<b>3T3</b>	Fibroblasto	Murino	$1,0 \times 10^5$
<b>L929</b>	Fibroblasto	Murino	$1,0 \times 10^5$

Fonte: Autoria própria (2017).

#### **4.4.3. Avaliação da atividade proliferativa in vitro (SRB)**

Após as análises dos dados de 72h, foram escolhidas as linhagens para os testes com as substâncias encapsuladas. Para os estudos posteriores apenas uma linhagem foi escolhida e avaliada em diferentes tempos (24 e 48 horas) e nos demais testes.

O ensaio de sulforodamina B (SRB) foi desenvolvido por Skehan *et al.* (1990). Esse teste depende da absorção do corante de aminoxantina rosa carregado negativamente, sulforodamina B (SRB), por aminoácidos básicos nas células. A resposta da atividade

proliferativa deve ser calculada a partir da relação do número de células, quanto maior o número de células, maior quantidade de corante absorvido, após a fixação, quando as células são lisadas, o corante liberar mais intensa mostrando assim uma maior absorbância.

A metodologia de manutenção, plaqueamento, tratamento e tempo de avaliação foram os mesmos utilizados no teste de MTT.

Após cada período de avaliação as células foram então fixadas com ácido tricloroacético 10% por uma hora a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, a placa lavada em água deionizada e seca para adição de 80 µL de SRB (0,1 %) diluída em ácido acético e incubadas por 30 min em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. O excesso de corante foi removido com ácido acético 1% seguido de secagem das placas e adição de 200 µL tampão Tris Base 10 mM para solubilizar o corante ligado às proteínas de membrana das células fixadas. As placas foram submetidas à agitação por 10 minutos para dissolução das proteínas coradas e a leitura foi realizada em leitor óptico de microplacas na absorbância de 570nm (Beckman Coulter Inc., modelo DTX-880).

Os dados foram submetidos à análise estatística, sendo analisadas as absorbâncias das amostras-teste (T), do controle negativo (CN), do branco das amostras-teste (B) e do início da incubação, ou seja, antes da adição das amostras teste (T<sub>0</sub>). Usando essas absorbâncias, a resposta celular à incubação com as amostras-teste pode ser um estímulo do crescimento celular, uma inibição do crescimento, ou ainda, não ocorrer nenhum efeito da amostra-teste sobre as células. Se  $T > CN$  a amostra-teste estimulou o crescimento celular. Se  $T \geq T_0$  e  $< CN$ , a amostra-teste inibiu o crescimento celular, ou seja, houve um efeito citostático. Para estas condições, o cálculo do crescimento celular (%) é realizado pela fórmula  $100 \times [(T - T_0) / (CN - T_0)]$ . Se  $T < T_0$ , a amostra-teste induziu morte celular, ou seja, efeito citocida e pode ser calculada por  $100 \times [(T - T_0) / T_0]$  (MONKS *et al.*, 1991). O crescimento celular (%) obtido por meio da aplicação das fórmulas em programa Excel, foi utilizado na elaboração de gráficos por regressão não linear, tipo sigmoidal empregando-se o programa de análise de programa Prisma versão 6.0 (*GraphPad Software*). Os valores abaixo de 100% e 50 acima de zero representam inibição de crescimento, enquanto os valores negativos representam morte celular.

#### **4.4.4 Avaliação da alteração na viabilidade celular no painel de células DT40 – ATP-lite**

A linhagem de células de linfócito B de galinha, DT40 é uma excelente ferramenta por investigar as deficiências, efeitos e mecanismos de reparo de substâncias anticancerígenas isto porque apresenta uma eficiência de transfecção específica maior do que células de mamíferos além de possuir uma alta taxa de proliferação (semelhante à observada em células cancerosas) (MAED et al., 2014; BUERSTEDDE; TAKEDA, 1991). Com isso a realização de deleções genéticas são comparativamente fácil de serem conseguidas nessas células por apresentar alta eficiência de integração direcionada (BUERSTEDDE; TAKEDA, 1991; YAMAZOE et al., 2004), possuem, ainda, várias características que as tornam particularmente adequadas para estudos que envolvem vias de reparo do DNA.

Primeiramente porque as células DT40 são capazes de proliferar mais rapidamente do que qualquer linhagem celular de mamífero podendo se dividir até três vezes por dia (HORI et al., 2008; ZHAO et al., 2007). Em segundo lugar elas apresentam durante o crescimento logarítmico, aproximadamente 70% de suas células estão na fase S, fator este contrastante com as células dos mamíferos (~50%) (TAKAO et al., 1999). Isto faz com que os mutantes de reparo de DNA isogênico de células DT40 proporcionem uma oportunidade de rastrear vários tipos de produtos químicos para genotoxicidade, comparando as taxas de proliferação celular (ou a extensão da citotoxicidade) em diferentes mutantes de reparo de DNA isogênico com os resultados obtidos para células de tipo selvagem. Em terceiro, as células DT40 não possuem o ponto de checagem G1 / S que estão normalmente presente nas células de mamíferos resultando em células sensíveis à indução de dano do DNA por substâncias químicas genotóxicas e, em comparação com células de mamíferos, a atividade de reparo do DNA contribui em maior medida para a sua sobrevivência. Com estas características as células DT40 e as células tumorais podem dividir características análogas quanto à resposta celular a agentes genotóxicos (MAEDE et al., 2014) tornando um ensaio apropriado para triagem.

As linhagens de células DT40 usadas neste estudo foram obtidas do banco de linhagens do *Laboratory of Molecular Pharmacology* e haviam sido anteriormente cedidas pelo *Laboratory of Radiation Genetics, Graduate School of Medicine* da Universidade de Kyoto. Todas as linhagens mutantes (*knock-in*) haviam sido anteriormente certificadas por *Southern blotting* e/ou PCR em tempo real e/ou *Western blotting*. Para realização dos experimentos, as células foram descongeladas e mantidas em incubadora de CO<sub>2</sub> a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em meio RPMI-1640 (11875-093; Invitrogen) suplementado com

1% de soro de galinha (16110-082; Invitrogen), 10% de soro fetal bovino (100-106; Gemini Bio-Products),  $10^{-5}$  mol/L  $\beta$ -mercaptoetanol (M-3148; Sigma-Aldrich) e 1% penicilina/streptomicina (15140-122; Invitrogen).

O ATPlite é um sistema que monitora o ATP se baseando na enzima luciferase do vagalume (*Photinus pyralis*). É um ensaio de luminescência alternativo a ensaios colorimétricos e fluorométricos para avaliação quantitativa da proliferação e citotoxicidade em cultura de células. O ATP é um sinal de viabilidade celular por existir em todas as células vivas com metabolismo. À medida que as células sofrem necrose ou apoptose, a concentração de ATP diminui rapidamente. A Luciferase e D-luciferina contidas no kit ATP Lite reagem com ATP para produzir fluorescência. Com isso, o seu monitoramento pode ser usado para acessar os efeitos citocidas, citostáticos e proliferativos de um amplo espectro de drogas e compostos biológicos.

Primeiramente as células em suspensão das linhagens DT40 foram observadas em microscópio invertido para verificação da confluência, sendo então coradas com solução de Azul de Trypan 0,4% para contagem e verificação da viabilidade celular em contador automático de células (COUNTESS®, Invitrogen). Apenas as linhagens com viabilidade superior a 90% eram utilizadas para cultivo em placas.

Para a realização do experimento duzentas células da linhagem DT40 foram cultivadas em 20  $\mu$ L de meio de cultura em placas de 384 poços (#6007680; Perkin Elmer Life Sciences), e então foram adicionados 20  $\mu$ L de meio de cultura contendo os compostos. Os poços das bordas das placas não foram utilizados, para evitar o erro associado à evaporação, sendo então preenchidos com PBS ou meio de cultura. As placas foram incubadas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por 72 horas, permitindo que as células selvagens (*wild-type*) não tratadas (C-) dupliquem cerca de nove vezes.

A viabilidade celular foi mensurada usando o kit ATPlite 1-step (Perkin Elmer Life Sciences). Em resumo, 20  $\mu$ L da solução de ATPlite foi adicionado a cada poço das placas de 384 poços. Após cinco minutos a luminescência é mensurada pelo leitor de placa Envision 2104 Multilabel Reader (Perkin Elmer). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Em uma placa de 384 poços é possível examinar a sensibilidade de dois compostos em até sete linhagens ao mesmo tempo. Células do tipo selvagem (*wild-type*) são incluídas em cada placa. Para avaliar a sensibilidade relativa de cada mutante (*knock-in*) em relação à célula selvagem, as curvas de sensibilidade são desenhadas assumindo a viabilidade de 100%

para as células não-tratadas, sob condições em que o número de células em cada poço foi relacionado linearmente com a intensidade de luminescência. Os valores de  $CI_{90}$  (concentração inibitória de 90%) para cada composto e linhagem celular foram determinados pelo gráfico de viabilidade vs concentração do composto. A  $CI_{90}$  para cada mutante foi dividida pela  $CI_{90}$  do tipo selvagem cultivada na mesma placa. A média dos quocientes de pelo menos três experimentos independentes, realizados em triplicata, para cada linhagem, foi calculada. Os valores da média foram então convertidos em escala logarítmica (base 2) e plotados em um mesmo gráfico de barras, utilizando o programa GraphPad Prism 6.

As tambjamins I e J foram avaliadas em 17 linhagens mutantes pertencentes as vias relacionadas à reparo de DNA. A lista de todos os genes deletados/mutados e respectivas vias encontra-se descrito na tabela 2.

Tabela 2. Linhagens DT40 utilizadas e respectivas alterações nas funções gênicas (deleção/mutação) em vias de reparo de dano de DNA.

<b>Linhagem celular</b>	<b>Função do gene deletado (mutado) e anotação</b>	<b>Referência</b>
<b>KU70</b>	Junção de pontas não-homólogas (NHEJ)	TAKADA et al.(1998)
<b>Ligase IV</b>	Junção de pontas não-homólogas (NHEJ)	ADACHI et al.(2001)
<b>DNA-PKcs</b>	Junção de pontas não-homólogas (NHEJ)	FUKUSHIMA, et al.(2001)
<b>ATM</b>	Checkpoint de controle de Dano	TAKAO et al.(1999)
<b>RAD54</b>	Recombinação homóloga (HR)	BEZZUBOVA et al.(1997)
<b>BRCA1</b>	Recombinação homóloga (HR)	MARTIN et al.(2007)
<b>BRCA2</b>	Recombinação homóloga (HR)	HATANAKA et al.(2005)
<b>RAD18</b>	Ligase E3 do PCNA, Reparo pós-replicação	YAMASHITA et al. (2002)
<b>PARP1</b>	Detecção de dano de DNA, poly (ADP-ribose)ation, reparo de SSB e DSB	HOCHEGGER et al. (2006)
<b>TDP1</b>	Remoção de complexos de clivagem de Top1 (Top1cc)	MURAI et al.(2012)
<b>TDP2</b>	Remoção de complexos de clivagem de Top2 (Top2cc)	ZENG et al.(2011)
<b>CtIPs/-/-</b>	Remoção de Top1cc e Top2cc por sua atividade endonuclease (mutação S322A)	NAKAMURA et al. (2010)
<b>FANCD2</b>	Reparo de crosslinks entre fitas, HR	YAMAMOTO et al.(2005)

<b>FANCE</b>	Reparo de crosslinks entre fitas, HR	HUANG et al.(2014)
<b>POLZ</b>	DNA polimerase de síntese por translesão	SONODA etal.(2003)
<b>EXO1</b>	Reparo por emparelhamento errôneo (MMR)	HOA etal.(2015)

Fonte: Pinheiro (2017).

#### ***4.4.5 Estudos do padrão de morte celular e efeitos sobre a progressão do ciclo celular***

As células foram plaqueadas e mantidas por 24 h em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade para adesão celular. Após este tempo, as células foram incubadas com as substâncias na forma livre e encapsuladas em lipossoma, nas concentrações de 2,5 e 5 µM para TI e 2,4 e 4,2 µM para TJ, enquanto as formas encapsuladas foram testadas somente nas concentrações de 5µM (LTI) e 4,2µM (LTJ) durante um período de 24 e 48 h. Estas concentrações foram baseadas na concentração inibitória média (CI<sub>50</sub>) determinada pelos ensaios de MTT e SRB após 48 h de incubação. A doxorrubicina e prodigiosina foram utilizadas como controle positivo nas concentrações de 0,3 µM e 1 µM, respectivamente. O controle negativo foi tratado com o mesmo volume de DMSO, veículo utilizado para diluição das substâncias, do poço com a maior concentração da droga teste, no qual a concentração de DMSO foi mantida abaixo de 0,1%.

#### ***4.4.6 Análise morfológica: coloração diferencial por panótico rápido***

Uma das metodologias utilizadas que permite avaliar o possível padrão de morte celular causado pelas substâncias testadas é a análise morfológica das células após tratadas e coradas com o kit panótico rápido (Laborclin®). A visualização das características morfológicas é permitida por meio da coloração diferencial do citoplasma e do núcleo, uma vez que um dos corantes os tiazinas possui a capacidade de marcar o núcleo em cor azulada devido ao seu caráter alcalino. Enquanto, o citoplasma é corado de vermelho devido ao caráter ácido. As células HCT-116 foram plaqueadas em placas de 24 poços com e sem lamínulas circulares na concentração de 0,5 x 10<sup>5</sup> células/mL e incubadas por 24 e 48 h com as Tambjamins I e J tanto na forma livre como encapsulada. TI nas concentrações (2,5 e 5 µM) e TJ (2,4 e 4,2 µM). A concentração das substâncias encapsuladas sempre foi correspondente a maior concentração da substância livre. A doxorrubicina e a prodgiosina



foram utilizadas como controle positivo nas concentrações de 0,3 e 1,0  $\mu\text{M}$ . Os controles negativos foram tratados apenas com o veículo (DMSO) e com lipossoma placebo (LB) sempre utilizando o volume correspondente a maior concentração testada. Decorrido os períodos de incubação, as células, da placa sem lamínula, foram avaliadas e fotografadas com aumento 20x antes da coloração para observar as principais alterações ocorridas pelas células após tratamento. Adicionalmente, foi retirado o meio de cada poço e as células foram tripsinizadas por 3 minutos, as células foram transferidas para eppendorfs e centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 1 mL de PBS. Para promoção da adesão celular nas lâminas, 70  $\mu\text{L}$  da suspensão de células foram adicionados a uma Citocentrífuga (modelo CT-2000, Cientec). Posteriormente, tanto as lamínulas circulares como as lamínulas geradas a partir da citocentrífuga foram fixadas com solução de triarilmetano a 0,1%, coradas com solução a 0,1% de xantenos e com solução de 0,1% de tiazinas (Laborclin®). O tempo de imersão em cada solução foi de aproximadamente 40 e 30 segundos, para o fixador e o primeiro corante respectivamente, sendo o último corante o tempo ajustado por amostra, a fim de otimizar os achados citológicos. As lâminas e lamínulas foram lavadas com água destilada para remover o excesso de corante. Depois de secas, a montagem se deu por lamínulas fixadas com Entellan® em lâminas previamente identificadas pelo respectivo tratamento. A análise morfológica do núcleo e do citoplasma celular ocorreram com o auxílio de um microscópio óptico (ZEISS) com aumento de 200X. As alterações foram registradas por fotografia (AxionVision) e as imagens escolhidas para exposição representavam o que se mostrava mais constante nas lâminas.

#### ***4.4.7 Monitoramento dinâmico da proliferação e viabilidade celular em tempo real- Xcelligence System***

O XCELLigence System RTCA DP (*Dual Plate*) é um equipamento que utiliza um sistema eletrônico de leitura, denominado impedância que permite tanto quantificar quanto monitorar de forma dinâmica e livre da proliferação e viabilidade celular em tempo real. As células foram plaqueadas em placas de 16 poços que contêm sensores microeletrônicos e com a interação das células com esses biossensores eletrônicos e permitem uma resposta de impedância que não apenas indica o status de viabilidade celular como também está correlacionado com o número de células no poço.

Esse sistema não é um processo invasivo, fazendo com que as células permaneçam em seu mais normal estado fisiológico durante o ensaio de proliferação e citotoxicidade. Seguindo o protocolo estabelecido por Maranhão (2016), para HCT-116 foram plaqueadas 5000 células/poço em 190  $\mu\text{L}$  de meio na placa. As características como aderência, disposição e proliferação das células foram monitoradas a cada 30 minutos pelo sistema RT-DP e 24 horas depois do plaqueamento, quando as células estavam em sua fase de crescimento logarítmica, elas foram tratadas com 10  $\mu\text{L}$  dos compostos na forma livre (5,0  $\mu\text{M}$  TI e 2,4 e 4,2  $\mu\text{M}$  TJ) e encapsuladas (5,0  $\mu\text{M}$  LTI e LTJ) foram dissolvidos em meio de cultura ajustando-os para as concentrações previamente determinadas. As células do controle foram tratadas com DMSO, o qual serviu de veículo para a substância livres, sendo que a concentração final de DMSO não excedeu 0,1% em nenhum tratamento. A doxorubicina (0,3  $\mu\text{M}$ ) e lipossoma placebo (LB), foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente. A análise de dados foi realizada pelo o índice celular de cada ponto foi definido como  $(R_n - R_b) / 15$ , onde  $R_n$  é a impedância do poço com célula e  $R_b$  é a impedância do poço apenas com o meio. As curvas de crescimento foram comparadas para uma possível elucidação do mecanismo de citotoxicidade.

#### **4.4.8 Citometria de fluxo**

Citometria de fluxo é uma ferramenta que possibilita analisar ciclo celular por meio da mensuração do conteúdo de DNA, integridade de membrana, além da medição de outras marcações com fluorocromos específicos (DARZYNKIEWICZ; ZHAO, 2014). A técnica permite a obtenção de dados relativos ao tamanho e a granularidade da célula.

Seu princípio está na incidência de uma fonte de luz laser que intercepta cada partícula. A dispersão da luz fornece moléculas ou estruturas de interesse podem ser estudadas por marcação com fluorocromos ou anticorpos monoclonais acoplados a fluorocromos.

O princípio básico da citometria resume-se à passagem individual de células que são conduzidas em um canal de corrente fluída e na utilização de uma radiação laser direcionada. O feixe de luz produzido pelo laser excita substâncias fluorescentes (fluorocromos) presentes nas células, emitindo uma luz que possui um comprimento de onda característico. Os sistemas ópticos e eletrônicos coletam essa luz excitada e as converte em parâmetros de dispersão de luz e fluorescência emitida.

Dentre os parâmetros estão o *Forward Scatter* (FSC) captado pelo detector frontal ao feixe, responsável pela mensuração do tamanho relativo da célula, e o *Side Scatter* (SSC) captado pelos espelhos laterais, responsável por medir a granulidade e complexidade celular. Quando analisados conjuntamente esses parâmetros levam a uma ideia da alteração da morfologia celular. Além disso, a detecção da fluorescência emitida pelos diversos marcadores classifica cada célula como um evento (FERRAZ, 2000; SHAPIRO, 2004; BACAL; FAULHABER, 2003).

Para todos os ensaios de citometria, as células HCT-116 foram plaqueadas em placas de 24 poços na concentração de  $0,5 \times 10^5$  células/mL. Os tratamentos com as Tambjamins foram realizados nas concentrações TI (2,5 e 5  $\mu\text{M}$ ), TJ (2,4 e 4,2  $\mu\text{M}$ ), LTI (5  $\mu\text{M}$ ) e LTJ (4,2  $\mu\text{M}$ ). A doxorubicina (0,3  $\mu\text{M}$ ) e prodigiosina (1,0  $\mu\text{M}$ ) (apenas no tempo de 48 h) foram utilizadas. Os tratamentos foram avaliados nos tempos de 24 e 48 horas. As células do controle negativo receberam a mesma concentração de solvente (DMSO) e de lipossoma placebo (LB) que a maior concentração da substância testada. Após transcorridas 24 e 48h de tratamento, as células foram transferidas para tubos eppendorfs e centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante resultante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 1 mL de PBS. As células foram analisadas utilizando o citômetro Guava easyCyte™.

Para todos os ensaios de citometria de fluxo foram avaliados 10.000 eventos por cada replicata de cada amostra. Cada experimento foi realizado por pelo menos três vezes em triplicata.

A determinação da viabilidade celular verificou o status de integridade da membrana baseando-se na capacidade do corante fluorescente, iodeto de propídeo (PI), de se ligar ao DNA de células cuja membrana plasmática esteja rompida. Células marcadas pelo corante emitem uma alta fluorescência vermelha quando excitado pelo laser, já as células com membrana íntegras foram consideradas viáveis por emitem baixa fluorescência (SHAPIRO, 1995).

Para a realização do experimento uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  de suspensão de células de cada grupo foi incubada com 50  $\mu\text{L}$  de uma solução de PI a 50  $\mu\text{g/mL}$  (diluído em PBS). Após 20 minutos, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo (Guava easyCyte™). Os dados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por teste de Tukey, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

#### **4.4.9 Avaliação do ciclo celular e fragmentação de DNA**

O conteúdo de DNA é a mais frequente forma de medida do estado celular. Análise do conteúdo de DNA revela a ploidia celular e provê informações sobre em que fase do ciclo encontra-se uma célula e, ainda, permite estimar a frequência de células apoptóticas, as quais são caracterizadas pelo conteúdo de DNA fragmentado. A distribuição das células dentro das principais fases do ciclo celular é baseada em diferenças no conteúdo de DNA entre a fase pré-replicativa ( $G_0/G_1$ ), as células que realmente apresentam o DNA replicado (S) e a fase pós-replicativa e mitótica ( $G_2+M$ ) (DARZYNKIEWICZ *et al.*, 2010).

Neste teste o PI é o responsável pela marcação do DNA. Inicialmente, a membrana plasmática das células foi permeabilizada por um detergente, permitindo que o iodeto de propídeo se ligue ao DNA de todas as células. Como cada fase do ciclo celular é caracterizada por uma quantidade diferente de DNA, o PI se intercala proporcionalmente à medida de DNA, permitindo a mensuração das fases do ciclo celular.

Uma alíquota de 300  $\mu\text{L}$  da suspensão de células de cada grupo foi incubada com 30  $\mu\text{L}$  de uma solução de PI a 50  $\mu\text{g/mL}$  e 3  $\mu\text{L}$  de uma solução de lise (10% de Triton X-100 e 10% de Citrato de Sódio), correspondendo a uma concentração final no tubo eppendorf de 0,1% de Triton X-100 e 5  $\mu\text{g/mL}$  de PI. Após o período de incubação por 40 minutos no escuro, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo (GuavaEasyCite<sup>®</sup>, Merk).

Os gráficos do ciclo celular foram analisados no programa ModFit LT<sup>®</sup> versão 4.1 (Verity Software House). Os dados gerados pelo programa foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por teste de Tukey, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

#### **4.4.10 Avaliação da externalização da fosfatidilserina- anexina V**

Nos primeiros estágios da apoptose ocorrem mudanças na superfície celular. Uma dessas alterações na membrana plasmática é a translocação da fosfatidilserina (PS) do interior da membrana para a camada mais externa, tornando, assim, a PS mais exposta. A Anexina V é uma proteína ligante de fosfolipídeos dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  com alta afinidade pela PS (VERMES *et al.*, 1995).

Neste ensaio foram utilizados dois corantes distintos que permitem a diferenciação de células viáveis, apoptose inicial e apoptose tardia/ necrose pela coloração diferencial captada

por fluorescência. Um dos corantes é Anexina-V que quando conjugada à ficoertrina (PE, do inglês *Phycoerythrin*) emite uma fluorescência amarela. Outro corante utilizado foi o 7-AAD capaz de penetrar as membranas celulares desintegradas e ligar-se ao núcleo, emitindo fluorescência vermelha. A estratégia de dupla coloração fornecida pelo reagente Guava® Nexin permite a identificação de quatro populações distintas: células consideradas viáveis, sem nenhuma marcação; células consideradas em apoptose inicial, caracterizadas por apenas fluorescência amarela; células em apoptose tardia ou necrose, reconhecidas pelos dois corantes; e células vermelhas que são consideradas debris.

Para essa análise, uma alíquota de 50 µL da suspensão de células em PBS de todos os grupos foi incubada com 50 µL da solução de Guava® Nexin (Guava Technologies). Após 20 minutos de incubação na ausência de luz, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (Guava easyCyte™). A fluorescência da anexina V conjugada com a PE foi mensurada por fluorescência amarela (583 nm) e o 7-AAD na fluorescência vermelha (680 nm). Os dados foram expressos como média ± E.P.M de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os grupos testados, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por teste de Tukey, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

#### ***4.4.11 Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial: Rodamina 123***

A rodamina 123 é um corante fluorescente catiônico que tem afinidade por mitocôndria quando seu potencial transmembrânico está inalterado, emitindo, como resultado, uma alta fluorescência quando excitadas pelo laser. Alterações no potencial mitocondrial levam ao efluxo da rodamina de dentro da mitocôndria, gerando eventos que emitirão menor fluorescência quando comparado às células que possuem mitocôndrias íntegras e polarizadas.

A avaliação desse processo foi realizada a partir de uma alíquota de 100 µL de suspensão de não células tratadas e tratadas com os compostos experimentais TI (2,5 e 5,0 µM) e TJ (2,8 e 4,2 µM) que foram incubadas com 200 µL da solução de rodamina na concentração de 1 µg/mL. Após 15 minutos de incubação, no escuro, as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm/5 min. O sobrenadante foi descartado e 100 µL de PBS foi adicionado em cada amostra, que foram reincubadas por mais 30 minutos no escuro, para posterior análise no citômetro de fluxo. Doxorubicina (0,3 µM) foi utilizada como controle positivo (CURY-BOAVENTURA; POMPEIA; CURI, 2004).

#### 4.4.12 Determinação da fosforilação de H<sub>2</sub>AX

A avaliação dos danos causados por determinadas substâncias capazes de promover quebras de cadeia simples e/ou quebras de cadeia dupla vem sendo incorporado em testes avaliativos de citotoxicidade. A  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX tem sido considerada a principal proteína sinalizadora que está envolvida a resposta ao dano sobre o DNA e/ou o efeito do reparo de DNA, permitindo que se estabeleça uma correlação entre dano de DNA, *checkpoints* de ciclo celular e iniciação de apoptose (BONNER et al., 2008; SMITH et al., 2010).

Para esse ensaio foi utilizado o kit *Millipore's FlowCollect™ Histone H2A.X Phosphorylation Assay* permite o monitoramento da ativação fosfo-específica da histona H<sub>2</sub>AX em uma população de células em cultura. Este kit é composto por um anticorpo anti-fosfo-Histona H2AX (Ser139) conjugado com Alexa Fluor® 488. As células HCT-116 foram cultivadas em placas de 12 poços na concentração de  $2,5 \times 10^5$  células/mL (500.000 células/poço), seguindo protocolo recomendado pelo fabricante. Os tratamentos com os compostos seguiram tempos de incubação de 6h e 24h; e concentrações utilizadas foram de 5  $\mu$ M e 4,2  $\mu$ M para TI e TJ, respectivamente.

Após os tempos de incubação com as drogas teste, as células foram tripsinizadas, centrifugadas (1500 rpm/4 min) e lavadas com 1 mL de Tampão de Lavagem, posteriormente foram novamente centrifugadas (1500 rpm/4 min) e ressuspensas em 260 $\mu$ L de Tampão de Fixação. Em seguida, as células foram incubadas em gelo durante 20 minutos, e logo centrifugadas (1500 rpm/4 min) a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 500  $\mu$ L de Tampão de Ensaio. Após a ressuspensão os tubos foram novamente centrifugados (1500 rpm/4 min) a 4°C e o sobrenadante descartado para uma nova ressuspensão (280  $\mu$ L) agora em Tampão de Permeabilização gelado. Posteriormente, as amostras foram incubadas em gelo por 20 minutos. Após incubação, seguiu-se de centrifugação a 1500 rpm por 4 min a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 1 mL de Tampão de Ensaio. Desse volume, 200 $\mu$ L foram transferidos para um novo tubo de 0,5 mL, centrifugado (1500 rpm/4 min) a 4 °C e o sobrenadante descartado. O pellet foi lavado com 200 $\mu$ L de Tampão de Ensaio e novamente centrifugado a 1500 rpm/4 min/4 °C. Após fixação e permeabilização das células, o pellet foi ressuspendido em 95 $\mu$ L de Tampão de Ensaio e 5 $\mu$ L do anticorpo Anti-Histona H2AX conjugado com Alexa Fluor® 488. As células foram, então, incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos, protegidas da luz. Após a incubação, foram adicionados aos tubos 100  $\mu$ L de Tampão de Ensaio e então

foram centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 200 µL/tubo de Tampão de Ensaio, centrifugado a 1500 rpm/5 min a 4 °C e, após descarte do sobrenadante, novamente ressuscitado em 200µL de Tampão de Ensaio. As amostras foram então imediatamente analisadas por citometria de fluxo (Guava easyCyte™) usando o canal de fluorescência verde. Um total de 10.000 eventos foram analisados por amostra. Os dados foram expressos como média ± E.P.M de experimento realizado em triplicata.

#### **4.4.13 Testes de genotoxicidade/mutagenicidade**

O teste cometa conhecido como *single-cellgel eletrophoresis* (SCGE) teste cometa é um ensaio que detecta danos genotóxico, além de monitorar os efeitos induzidos por radiação ou substâncias químicas (HARTMANN, et al, 2003)

A análise de dano de DNA pelo método alcanilo foi realizada seguindo o protocolo descrito por Singh et al. (1988), abrange um pH maior que 13 a fim de induzir a desnaturação da molécula de DNA e detectar lesões de diversas naturezas, desde quebras de fita simples e duplas, sítios álcalo-lábeis, sítios de reparo por excisão e ligações cruzadas. A outra versão é a neutra que abrange pH entre 7,0 e 8,5 e detecta apenas quebras de fita dupla em DNA ou ligações cruzadas entre DNA e DNA, DNA e proteína ou DNA e xenobiótico.

Para isto, as células HCT-116 foram plaqueadas em placas de 24 poços na concentração de  $0,5 \times 10^5$  células/mL. Os tratamentos da Tambjamins foram TI (2,5 e 5 µM), TJ (2,4 e 4,2 µM) e doxorubicina (0,3 µM) por 24 horas. Após esse período, o ensaio do cometa alcalino foi realizado de modo a permitir análises de possíveis lesões oxidativas no DNA que após o procedimento de lise celular.

Para o preparo das lâminas, estas foram cobertas previamente com agarose de ponto de fusão normal (0,5%) a temperatura de 60°C em solução de PBS livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , mantidas a temperatura ambiente para solidificação da agarose de baixo ponto de fusão. As células de HCT-116 plaqueadas de cada tratamento foram centrifugadas e o pellet foi ressuscitado em agarose de baixo ponto de fusão (1,5%) a 37°C e adicionadas as lâminas pré cobertas com agarose de ponto de fusão normal. Posteriormente as lâminas foram cobertas com lamínulas para melhor distribuição das células na lâmina, e foram mantidas a 4°C para solificação da agarose. Após solidificação da agarose foi removida e as lâminas imersas na solução de lise

(2,5 M NaCl, 10mM Tris, 100 mM EDTA, 1% N-Lauroyl sarcosine a pH 10, 1% Triton X 100 e 10% DMSO) protegida da luz à temperatura de 4°C por no mínimo 1 hora.

Foram realizadas modificações no ensaio de cometa alcalino, para realização de análises de possíveis lesões oxidativas do DNA. Assim, após o procedimento de lise celular as lâminas foram incubadas com diferentes endonucleases capazes de reconhecer bases nitrogenadas (purínicas ou pirimídicas) no DNA. Cada lâmina foi incubada com apenas uma única enzima por vez. As endonucleases utilizadas foram: Formamidopirimidina DNA-glicosilase (FPG), uma enzima de reparação de excisão de bases que reconhece e remove uma grande variedade de purinas oxidadas no DNA e Endonuclease III (Endo III), uma timina-glicol-DNA-glicosilase que age via excisão de bases removendo pirimidinas oxidadas, em especial timinas, no DNA.

Após lise celular as lâminas foram lavadas com solução tampão (40 mM HEPES, 100 mM KCl, 0,5 mM EDTA, 0,2mg/mL BSA, pH 8,0). Posterior a lavagem as laminas foram secas em ambiente fora da presença de luz e em seguida encubadas com enzimas FGP (70 µL, 35°C, 30 min) Endo III (50µL, 35°C, 30 min) e hOGG-1 (1:500, 37°C, 40 min) de acordo com as recomendações do fabricante (New England Biolabs Inc. EUA), com modificações.

As lâminas removidas da solução de lise foram neutralizadas por 15 min na solução de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5). Em seguida 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 300 mA a baixa temperatura, 4°C. Após a corrida eletroforética, as lâminas foram retiradas e mergulhadas na solução de neutralização por 5 min. As lâminas foram fixadas com etanol a 100% após corrida.

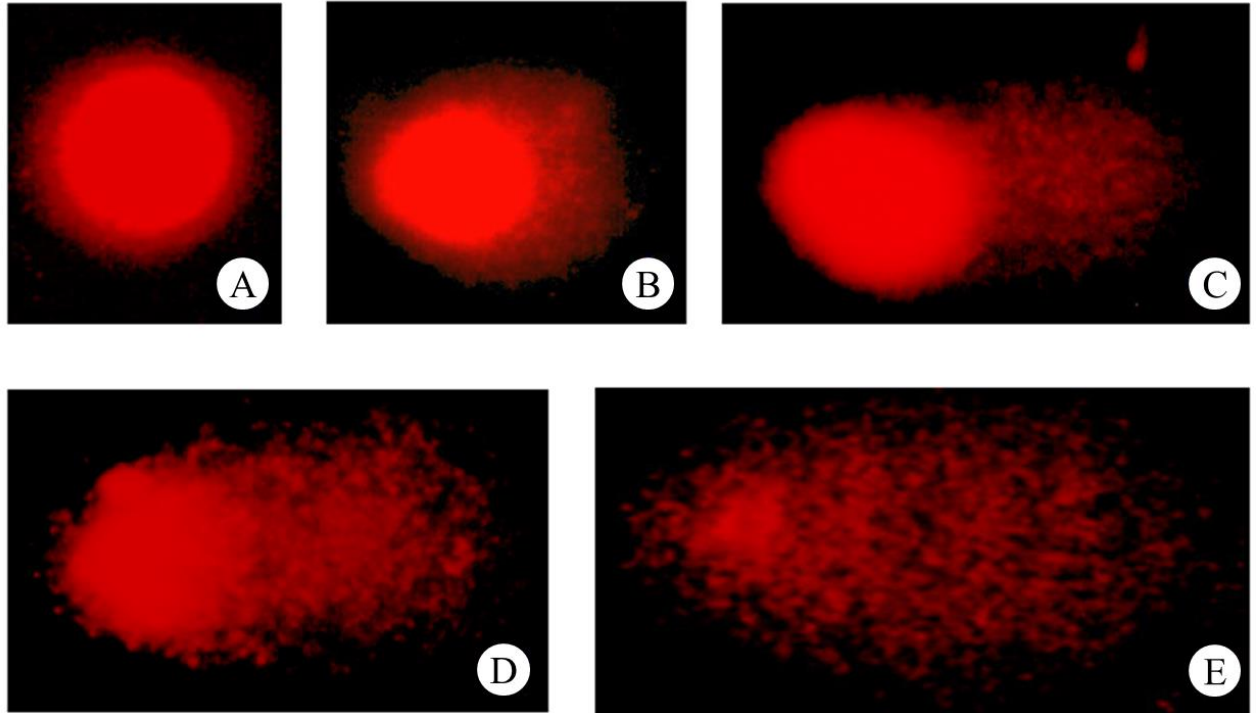
Após fixação, para análise aplicou-se 30 µL da solução de Brometo de Etídio (20µg/mL) e cobriu-se com lamínula para análise em microscópio de fluorescência (Zeis) equipado com filtro de excitação de 515-560 nm. . A análise foi realizada de acordo com o padrão de escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa (BURLINSON *et al.*, 2007; HARTMANN; SPEIT, 1997; TICE *et al.*, 2000). Todos os procedimentos foram conduzidos na ausência de luminosidade (luz causa dano de DNA).

A análise foi realizada de acordo com o padrão de escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa indicando grau de perda de DNA. Foram contados 100 cometas para cada replicata 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 21.



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%). O doxorubicina (0,3  $\mu$ M) foi utilizado como controle positivo e o controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO) utilizado para dissolver as substâncias, o qual foi mantido abaixo de 0,1% (Figura 22).

Figuras 22. Representação dos cometas corados com brometo de etídeo e visualizados no microscópio de fluorescência. (A) Grau 0, (B) Grau 1, (C) Grau 2, (D) Grau 3, (E) Grau 4.



Fonte: Modificada de Speit, Hartmann, 1999.

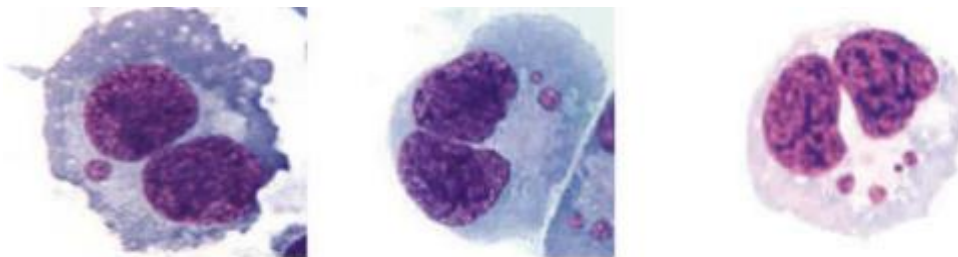
Os dados foram analisados a partir da média e desvio-padrão. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos e dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Tukey com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) no programa GraphPad Prism versão 6.0.

A metodologia de ensaio de micronúcleo foi modificada por Fenech e Morley (1985) empregando citocalasina B. A citocalasina B é inibidor da polimerização da actina requerida para a citocinese (CARTER, 1967), induz o bloqueio da citocinese, porém não bloqueia a divisão nuclear, resultando no acúmulo de células binucleadas a partir de células que passaram por um ciclo de divisão, independente do grau de sincronia e proporção de células em divisão (FENECH, 2000).

O ensaio foi realizado de acordo com Matsuoka et al. (1992) com modificações. As células HCT-116 foram plaqueadas em placas de 24 poços na concentração de  $0,5 \times 10^5$  células/mL. Os tratamentos da Tambjamins foram TI (2,5 e 5  $\mu\text{M}$ ), TJ (2,4 e 4,2  $\mu\text{M}$ ) e doxorrubicina (0,3  $\mu\text{M}$ ) por 4 horas. Posteriormente, os poços foram lavados com RPMI em seguida foi aplicado em cada poço o inibidor de citocinese citocalasina B (Sigma – C 6762 – 3  $\mu\text{g/mL}$ ) e a placa voltou para a estufa, onde permaneceu por 21 h. Posteriormente, as culturas foram centrifugadas (1000 rpm/5min) e o sobrenadante desprezado. Em seguida, as células foram ressuspensas em solução hipotônica de KCl (0,075M) gelada ( $4^\circ\text{C}$ ) por 3 minutos sendo posteriormente fixadas com metanol/ácido acético (3:1) gelado ( $4^\circ\text{C}$ ). De duas a quatro gotas do material fixado foram transferidas para as lâminas de microscopia lâminas limpas e depois de secas foram coradas com uma solução Giemsa (5%) por 7 minutos. A doxorrubicina (0,3 $\mu\text{M}$ ) foi utilizada como controle positivo.

As lâminas foram analisadas com auxílio de microscópio óptico binocular com aumento 100 vezes. Os critérios adotados para a identificação dos micronúcleos foram os descritos por Fenech (2003) (Figura 23). Assim, somente células binucleadas (2000/ lâmina) com núcleos intactos, com tamanhos aproximadamente iguais e com o esmo padrão de coloração foram analisadas. Os dados gerados foram avaliados a partir da média  $\pm$  E.P.M. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Tukey ( $p < 0,05$ ) utilizando o prisma versão 6 (GraphPad software, San Diego, Ca, EUA).

Figura 23. Fotomicrografia de linfócito binucleados portando micronúcleos.



Fonte: Fenech et al, 2003.

#### **4.4.14 Avaliação da expressão proteica utilizando a técnica de WESTERN BLOT**

Western blot é uma importante técnica usada na biologia molecular que permite identificar proteínas específicas provenientes de uma complexa mistura de proteínas extraídas de células. Nessa técnica as proteínas são separadas baseadas em seu peso molecular através de um gel de eletroforese e para a detecção da expressão proteica utiliza-se um anticorpo mono ou policlonal específico para a mesma (MAHMOOD & YANG, 2012).

A técnica baseia-se na extração de proteínas através da lise celular, seguida de uma separação em um gel de eletroforese. Posterior a esse passo, as proteínas separadas são, então, transferidas para uma membrana, produzindo as bandas para cada proteína. Como o anticorpo só se liga às proteínas de interesse, apenas a banda marcada é visível. A espessura de cada banda corresponde à quantidade de proteína. A membrana é, então, incubada com anticorpos específicos para as proteínas investigadas e a revelação das bandas é realizada por sondas do anticorpo secundário ligadas a peroxidase (MAHMOOD & YANG, 2012; MACPHEE, 2010).

Os anticorpos utilizados no experimento foram caspase 3, caspase 8 e caspase 9. Além de p21, p53, AKT, BAX e as ciclinas D1 e E1. O anticorpo  $\beta$ -actina (Cell Signaling Technology®) foi utilizado como referência experimental. Os anticorpos secundários anti-mouse IGg (Cell Signaling Technology®) e anti-rabbit IGg (Cell Signaling Technology®) ligados peroxidase foram utilizados como anticorpos secundários para detecção da proteína. Os anticorpos foram solubilizados de acordo com as instruções do fabricante (BSA 5% ou Leite desnatado 5%), diluídos em 1:1000, exceto a  $\beta$ -actina e os anticorpos secundários que foram diluídos em 1:2000.

Para esse experimento, as células HCT-116 foram tratadas com duas concentrações das Tambjamins TI e TJ. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo na concentração de 0,3  $\mu$ M. O controle negativo recebeu a mesma concentração de DMSO que a concentração mais alta da substância testada. O período de tratamento foi de 24 h. As células HCT-116 foram plaqueadas na concentração de  $0,7 \times 10^5$  células/ mL em placas de seis poços. Para a extração de proteínas, o sobrenadante e as células, após tripsinização, foram colocados em um tubo falcon e centrifugados a 2000 rpm por 5 minutos. Decorrido o tempo, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com PBS. O pellet foi transferido para um tubo eppendorf e ressuspendido em tampão RIPA *Lysis Buffer* (Milipore) 1X acrescido de coquetel de inibidores de proteases (1:100 v/v), ortovanodato de sódio (1:100 v/v) e PMSF (1:100 v/v). Em seguida, as amostras foram colocadas em gelo e sonicadas três

vezes por 60 segundos com um intervalo de 2 minutos entre as sonicações. Terminado este processo, as amostras foram lisadas gentilmente por 15 minutos em gelo. A mistura foi centrifugada a 14.000xg por 15 minutos. O sobrenadante resultante foi transferido para um novo tubo para futura quantificação.

Após a lise celular e extração proteica, a quantificação de proteínas totais foi realizada através de um ensaio colorimétrico utilizando um kit DC Protein Assay (BioRad *Laboratories*), o qual se baseia no método de Lowry. Para calibração do método foi realizada uma curva padrão de BSA (0,2 – 2 mg/mL, Sigma) diluída em tampão RIPA completo. Com o auxílio de uma placa de 96 poços cada amostra foi testada em triplicata utilizando-se 5 µL por replicata. Ao branco foi adicionado somente tampão RIPA completo. Incluiu-se em todos os poços 25 µL do reagente A' (2 % de reagente S + 98 % de reagente A) seguido de 200 µL de reagente B (BioRad *Laboratories*). As amostras foram incubadas por 10 minutos na ausência de luz sob leve agitação. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 620 nm.

A curva da BSA foi gerada por regressão linear no programa *GraphPadPrism* versão 6.0. Os pontos foram plotados em gráfico de absorbância versus quantidade de proteínas e foi gerada uma equação linear. Os valores de absorbância obtidos foram aplicados a equação da curva para determinação da concentração proteica.

A separação das proteínas foi baseada em seus pesos moleculares realizada em géis de poliacrilamida em um sistema vertical (TOWBIN, STAEHELIN; GORDON, 1979). O processo utiliza de dois tipos de géis, um deles representa o gel de concentração onde as proteínas são depositadas inicialmente, e o segundo gel é representado pelo gel de separação ou gel de resolução onde as proteínas são separadas. O gel de concentração apresenta uma malha mais fina com uma concentração final de 5 % de poliacrilamida (Tris-HCl 0,5 M e pH 6,8). O gel de separação apresenta uma malha mais fechada devido a sua maior concentração de poliacrilamida, 12,5% (Tris-HCl 0,5 M e pH 6,8). Para a montagem do sistema vertical (BioRad, modelo mini-PROTEAN® Tetra Cell), o gel de concentração foi colocada sobre o gel de separação, o pente foi retirado e as amostras foram aplicadas nos poços.

O marcador molecular *Full-Range Rainbow Marker* (12-225 kDa; GE Healthcare) foi utilizado para monitorar a separação de proteínas e posterior identificação das bandas. Em cada poço foi aplicado um montante de 50 µg de proteínas totais da amostra, desnaturada pelo tampão *Blue Juice 5X* (5:1 v/v; Invitrogen). A corrida eletroforética foi realizada a uma voltagem constante de 100 V e amperagem livre (para duas placas; fonte elétrica PowerPac®,

modelo HCPower Supply) à temperatura ambiente, utilizando tampão de corrida para eletroforese. O tempo de corrida durou aproximadamente em 1h e 30 min. Posteriormente, as proteínas foram transferidas do gel para membranas de PVDF *Hybond-P* (GE Healthcare) previamente ativadas com metanol e então posta em contato com o gel entre papéis de filtros e esponjas. A eletrotransferência foi realizada em aperagem de 0,4 A por 1 h sob refrigeração (fonte elétrica PowerPac<sup>®</sup>, modelo HCPower Supply).

Após a transferência, as membranas foram incubadas por 1 hora em solução de leite desnatado a 5% para bloqueio de ligações inespecíficas após esse tempo as membranas foram lavadas três vezes com TBS-Tween 0,1% (TBS-T) e uma vez com TBS para a retirada do leite. A incubação com anticorpo primário ocorreu em *overnight* a 4 °C sob agitação constante. Para a retirada do anticorpo primário, foram realizadas três lavagens com TBS-T e uma com TBS e depois a membrana foi incubada por 1 hora com o anticorpo secundário correspondente a cada anticorpo primário diluído em solução de leite desnatado a 5% em TBS sob agitação constante. Todos os anticorpos secundários eram acoplados a uma enzima peroxidase. Transcorrido o tempo de incubação, o anticorpo secundário foi retirado e mais três lavagens de TBS-T e uma de TBS foram realizadas. Para revelação das bandas foi utilizado peróxido de hidrogênio e luminol.

A peroxidase acoplada ao anticorpo secundário decompõe o peróxido de hidrogênio em radicais livres que interagem um o luminol, gerando quimioluminescência (LEONG & FOX, 1988).

Em seguida as membranas foram fotografadas por um captor de imagens (GE Healthcare, modelo ImageQuant<sup>®</sup> 300) utilizado para captação da quimioluminescência gerado pelo método de detecção de bandas. As imagens foram editadas no próprio programa.

## 4.5 Estudos *in silico*

### 4.5.1 Parâmetros de ADMETOX

O ADMETOx – Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade são parâmetros importantes no processo de pesquisa e desenvolvimento de fármacos. Esses parâmetros estão sendo estudados cada vez mais cedo durante a fase de pesquisa, permitindo que moléculas consideradas candidatas sigam no processo de desenvolvimento e moléculas consideradas não candidatas sejam descartadas sem um gasto maior de recursos durante os testes pré-clínicos e clínicos. Neste sentido, tal avaliação possibilita o desenvolvimento de fármacos focado em poucas moléculas, aquelas com maior probabilidade de alcançar o sucesso nas fases clínicas. (KAPETANOVIC et al., 2011). Lipinski (2000) afirmou que uma molécula *drug-like* é definida como um composto que possui parâmetros ADMETOx suficientemente aceitáveis para continuar durante a fase clínica 1, ele examinou somente propriedades estruturais que afetariam as propriedades físico-químicas das moléculas. Atualmente o termo *drug-like* foi expandido e tem sido associado a várias outras propriedades que afetam os parâmetros ADMETOx (KAPETANOVIC et al., 2011; VAN DE WATERBEEMD; GIFFORD, 2003; WANG *et al.*, 2015) (Tabela 3).

Tabela 3 – Propriedades de avaliação dos parâmetros ADMETOx.

<b>Propriedades Estruturais</b>	Ligações de Hidrogênio	Superfície Polar
	Lipofilicidade	$pK_a$
	Peso Molecular	Reatividade
<b>Propriedades Físico-Químicas</b>	Solubilidade	Estabilidade química
	Permeabilidade	
<b>Propriedades Bioquímicas</b>	Metabolismo Fase 1 e Fase 2	Transporte ( <i>Uptake</i> / Efluxo)
	Ligação a Proteínas e Tecidos	
<b>Propriedades Farmacocinéticas e toxicológicas</b>	Eliminação	Tempo de meia-vida
	Biodisponibilidade	Interação droga-droga
	DL <sub>50</sub>	

Fonte: Autoria própria (2017).

Esses parâmetros são analisados em várias etapas, baseados em experimentação *in vitro* e *in vivo* e após realização desse último teste caso os resultados deem negativos as moléculas testadas deveriam ser descartadas e um novo projeto reiniciado.

#### **4.5.2 Estudo avaliação de potenciais alvos: PHARMMAPER**

O servidor PharmMapper é um servidor web de acesso livre projetado para identificar potenciais candidatos alvo para as pequenas moléculas (medicamentos, produtos naturais ou outros compostos recém-descobertos com alvos de ligação não identificados) usando abordagem de mapeamento de farmacóforo. Sendo este um arranjo espacial dos recursos essenciais para uma molécula interagir com um alvo específico.

O PharmMapper possui um grande número de base de dados de farmacóforo (ou seja, PharmTargetDB) selecionados cuidadosamente do TargetBank, BindingDB, DrugBank e banco de dados de potenciais de alvo de drogas incluindo mais de 7.000 modelos de farmacóforo baseados em receptores (cobrindo mais de 1.500 informações de alvos de drogas). Este servidor encontra automaticamente as melhores posições de mapeamento da molécula de consulta contra todos os modelos de farmacóforo no PharmTargetDB e lista os melhores *hits* com anotações de destino apropriadas, bem como as poses alinhadas da molécula respectiva são apresentadas (LIU et al., 2010). Para avaliação dos ligantes foram enviados ao provedor *online* as duas tambjamins e a prodgiosina no formato SDF, em seguida os arquivos foram organizados de acordo com os maiores *z'score*, que representa maior probabilidade de interação com os compostos.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Tambjamins: Prospecção Científica e Tecnológica

Atualmente, a realização de prospecção científica e tecnológica constitui uma ferramenta básica e essencial na orientação e na promoção da inovação. Pois, ela constitui um ponto de partida por realizar o mapeamento de forma sistemática de diversas informações sobre “assunto pesquisado” e, assim contribuir de maneira significativa tanto para a pesquisa como para a indústria, economia ou para a sociedade como um todo. Além disso, ela nos permite observar as principais mudanças tecnológicas ocorridas, uma vez que o conhecimento e o desenvolvimento tecnológico avançam de forma acelerada, com isso, a prospecção torna-se um ponto de partida para a construção e para a compreensão das forças que orientarão as inovações futuras podendo indicar quais serão as mudanças necessária para que produto inovador possa ser aceito no mercado e pela sociedade em geral (TANA; LIMA; MOURÃO, 2014).

A prospecção foi realizada com finalidade de fazer o mapeamento das patentes e artigos relacionados com Tambjamins e câncer, bem como farmacologia e citotoxicidade, o levantamento foi realizado no mês de julho e baseado na pesquisa de patentes e artigos científicos, realizados a partir dos pedidos de patentes depositados no banco de dados do European Patent Office (Espacenet), na World Intellectual Property Organization (WIPO), United States Patent and Trademark Office (USPTO), Patentes da América Latina e Espanha (LATIPAT) e no Banco de dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) do Brasil. O levantamento em bases de dados de periódicos da Capes foi realizado no ISI Web of Science, Pubmed, Science Direct e Scopus.

Na pesquisa foram utilizados como palavras-chave: “tambjamine; tambjamines; tambjamine AND câncer, tambjamines AND câncer; tambjamine AND cytotoxic; tambjamines AND cytotoxic; tambjamine ou AND pharmacology AND tambjamines AND pharmacology”. Sendo válidos os que apresentassem os termos descritos nos campos de pesquisa: “title and abstract” e para a base WIPO foi utilizado “full text”.

Ao avaliar essas principais bases de depósitos foram encontrados 16 documentos no total em pesquisas sobre as tambjamins, e foi verificado que alguns foram publicados em mais de uma base e através do uso de mais de uma palavra-chave permitindo concluir a existência de apenas cinco patentes (Tabela 4). A primeira foi publicada em 2012 intitulada de “*Copper II complexes of phenanthroline and their use in cancer treatment*” e e a a



área química e a subárea de química orgânica. A invenção refere-se a um complexo de Cu II no qual o íon cobre é ligado ao dicarboxilato aromático, não aromático ou alifático através de um átomo de oxigênio de um dos grupos carboxilato e da utilização desse complexo metálico como nucleases auto-ativadoras para tratar câncer e outros distúrbios proliferativos. As outras quatro patentes são: “*Processes and host cells for genome, pathway, and biomolecular engineering*”, “*Protective cover and related method*”, “*Processes and host cells for genome, pathway, and biomolecular engineering*” e “*Tambjamines and b-ring functionalized prodiginines*”.

A patente “*Protective cover and related method*” está classificada como grande área da física e seu objetivo é proteção de materiais marinhos contra microorganismos. As outras duas patentes que possuem o mesmo nome estão ligadas a subárea da bioquímica e subárea da engenharia genética, estando uma delas relacionada aos processos de isolamento, preparação ou purificação do DNA ou RNA, enquanto que a outra envolve a área de introdução de material genético exógeno usando vetores e hospedeiros para os mecanismos de regulação da expressão gênica. A patente “*Tambjamines and b-ring functionalized prodiginines*” descreve métodos de síntese e utilização de compostos e divulgação da funcionalização desses compostos com anel B contra malária.

Pode-se perceber que existem poucas patentes com Tambjamins e que, apenas uma delas está vinculada ao tratamento do câncer, este fato pode estar relacionado ao tempo de obtenção da patente, sendo um processo bastante demorado, podendo inclusive ser apontado como um dos grandes empecilhos pelos inventores, o que pode comprometer a inovação no país.

Tabela 4. Distribuição de patentes sobre Tambjamins depositadas nos bancos ESPACENET, USPTO e WIPO.

PALAVRA-CHAVE	RESULTADOS		
	ESPACENET	USPO (PatFT/AppFT)	WIPO
Tambjamine	0	0/2	5
Tambjamines	1	0/0	2
Tambjamine AND câncer	0	0/0	2
Tambjamines AND câncer		0/0	1
Tambjamine AND cytotoxic	0	0/0	2
Tambjamines AND cytotoxic		0/0	1
Tambjamine AND pharmacology	0	0/0	0
Tambjamines AND pharmacology	0	0/0	0

Fonte: Autoria própria (2017)

Ao avaliar os números de publicações científicas das substâncias Tambjamins nos diferentes bancos de dados, utilizando as mesmas palavras-chaves foram encontradas no Pubmed 17 artigos, *Web of Science* (30) e *Scienccedirect* (10). Para as pesquisas realizadas com as palavras-chaves presente no campo “topic” na base *Web of Science* e “title/abstract/key” para *Scienccedirect* (Tabela 5) foi observado que a plataforma *Web of Science* foi o diretório que apresentaram o maior número de publicações, assim como e a palavra chave *Tambjamine*, com isso foi realizada uma análise mais detalhada levando em consideração esses dados obtidos.

Tabela 5. Distribuição de artigos sobre Tambjamins encontrados nas bases *Pubmed*, *Web of Science* e *Scienccedirect*.

Palavra-chave	Resultados		
	Pubmed	Web of science	Scienccedirect
<b>Tambjamine</b>	17	30	10
<b>Tambjamins</b>	9	15	10
<b>Tambjamine AND câncer</b>	7	9	4
<b>Tambjamins AND câncer</b>	4	5	4
<b>Tambjamine AND cytotoxic</b>	5	5	3
<b>Tambjamins AND cytotoxic</b>	3	3	3
<b>Tambjamine AND pharmacology</b>	10	0	0
<b>Tambjamins AND pharmacology</b>	6	0	0

Fonte: Aatoria própria (2017)

Na busca das principais áreas (Tabela 6) com essa terminologia foi verificado que a área química multidisciplinar é a área que possui a maior quantidade de artigos (12) publicados, seguido da área de química orgânica (5), biologia molecular e bioquímica (4) e oncologia (3). As demais áreas com dois artigos publicados foram farmácia farmacológica, ciências multidisciplinares, microbiologia e química medicinal, e áreas como ecologia, toxicologia, biologia celular dentre outras apresentaram apenas um trabalho com essa palavra chave (Tabela 6). Os três trabalhos que possuem a associação das terminologias “tambjamins AND cancer” trazem artigos que relatam a ação e o mecanismos de modulação do pH intracelular promovido pelas Tambjamins no combate a células de câncer de pulmão, dois desses artigos pertencem ao mesmo grupo de pesquisa da Universidade de Barcelona. Cavalcante et al. (2008) avaliaram a ação da Tambjamina D em células de pulmão (hamster-V79) e com os testes realizados verificaram seu efeitos citotóxicos e genotóxicos, além disso, foi observado que os resultados são de natureza dependente da concentração na célula testada

e que a Tambjamina D parece induzir a morte celular através de apoptose e de suas propriedades pró-oxidante. Ao avaliar o diretório ScienceDirect a pesquisa realizada com a terminologia “*Tambjamine*” ou “*Tambjamines*” sempre apresenta resultados idênticos, fato não observado nas demais bases de dados, pois sempre os periódicos com a terminologia “*Tambjamines*” associadas ou não as demais palavras chaves estão contidas na terminologia no singular.

Tabela 6. Publicações por área de concentração na base *Web of Science*.

<b>Título do artigo</b>	<b>Área de concentração</b>	<b>Autores</b>	<b>Ano</b>
<b>QSAR analysis of substituent effects on tambjamine anion transporters</b>	• Chemistry multidisciplinary	KNIGHT, N.J. et al	2016
<b>Biosynthesis of Two Dihydropyrrole-Polyketides from a Marine-Derived <i>Penicillium citrinum</i></b>	• Chemistry multidisciplinary	ROMMINGE R, S P; et al	2012
<b>Secondary metabolites from nudibranchs <i>Tambja stegosauriformis</i>, <i>Hypselodoris lajenis</i> and <i>Okenia zoobotryon</i> and from Bryozoans <i>Zoobotryon verticillatum</i> AND <i>Bugula dentata</i> from the brazilian coastline</b>	• Chemistry multidisciplinary	PEREIRA, F.R.; et al	2012
<b>The role of lipophilicity in transmembrane anion transport</b>	• Chemistry multidisciplinary	S AGGIOMO, V. et al	2012
<b>Tambjamine alkaloids and related synthetic analogs: efficient transmembrane anion transporters</b>	• Chemistry multidisciplinary	INGLESIAS, P.H et al	2012
<b>Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Synthetically Derived Tambjamines C and E-J, BE-18591, and a Related Alkaloid from the Marine Bacterium <i>Pseudoalteromonas tunicata</i></b>	• Chemistry multidisciplinary • Biochemistry molecular biology	PIKERTON, D.M.; et al	2010
<b>Natural products from the ascidian <i>Botrylloides giganteum</i>, from the sponges <i>Verongula gigantea</i>, <i>Ircinia felix</i>, <i>Cliona delitrix</i> and from the Nudibranch <i>Tambja eliora</i>, from the Brazilian CHEMISTRY MULTIDISCIPLINARY coastline</b>	• Chemistry multidisciplinary	GRANATO, A.C.; et al	2005
<b>Molecular orbital study of tambjamine E and analogues.</b>	• Chemistry multidisciplinary	SKAWINSKI, W.J.; et al	2005
<b>The synthesis of a combinatorial library using a tambjamine natural product template</b>	• Chemistry multidisciplinary	DAVIS, R.A.; et al	2001
<b>Structure-activity relationships in copper-mediated DNA cleavage by tambjamine alkaloids and related polypyrroles.</b>	• Chemistry multidisciplinary	MANDERVILLE, R.; et al	1998
<b>Copper-mediated nuclease activity of a tambjamine alkaloid</b>	• Chemistry multidisciplinary	BORAH, S.; ET AL	1998
<b>New tambjamine alkaloids from the marine bryozoan <i>bugula-dentata</i></b>	• Chemistry multidisciplinary	BLACKMAN, A.J.; LI, C.P	1994
<b>Transmembrane anion transport and cytotoxicity of synthetic tambjamine analogs</b>	• Chemistry organic	HERNANDO, E.; et al	2014
<b>Total synthesis and biological evaluation of tambjamine K and a library of unnatural analogs</b>	• Chemistry organic; Chemistry medicinal	ALDRICH, L.N.; et al	2010

<b>A New cytotoxic tambjamine alkaloid from the Azorean nudibranch <i>Tambja ceutae</i></b>	• Chemistry organic; Chemistry medicinal	CARBONE, M. et al.	2010
<b>Isolation and structure elucidation of a novel yellow pigment from the marine bacterium <i>Pseudoalteromonas tunicate</i></b>	• Chemistry organic	FRANKS,A.; et al.	2004
<b>DNA binding by 4-methoxypyrrolic natural products. Preference for intercalation at AT sites by tambjamine E and prodigiosin</b>	• Chemistry organic	MELVE,M.S.; F.E.; et AL	1999
<b>Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Synthetically Derived Tambjamins C and E-J, BE-18591, and a Related Alkaloid from the Marine Bacterium <i>Pseudoalteromonas tunicate</i></b>	• Biochemistry molecular biology; Chemistry multidisciplinary	PINKERTON, D.M.; et at.	2009
<b>Cytotoxic and genotoxic effects of tambjamine D, an alkaloid isolated from the nudibranch <i>Tambja eliora</i>, on Chinese hamster lung fibroblasts</b>	• Biochemistry molecular biology; Toxicology • Pharmacology pharmacy	CAVALCAN TI, B.C.; et al.	2008
<b>BE-18591 as a new H<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> symport ionophore that inhibits immunoproliferation and gastritis</b>	• Biochemistry molecular biology	TANIGAKI, K.; et al.	2002
<b>Copper-nuclease efficiency correlates with cytotoxicity for the 4-methoxypyrrolic natural products</b>	• Biochemistry molecular biology; Chemistry inorganic nuclear	MELVIN, M.S.; et al.	2001
<b>Novel Indole-based Tambjamine-Analogues Induce Apoptotic Lung Cancer Cell Death through p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activation</b>	• Oncology	MANUEL-MANRESA,P. ; et al.	2017
<b>Characterization of the type of cell death induced by novel tambjamine analogs in lung cancer</b>	• Oncology	RODILLA, A.M.; et al	2014
<b>Effects of novel anticancer tambjamine analogs on lung cancer cell lines and human lung primary cultures</b>	• Oncology	MANUEL-MANREZA,P. et al.	2014
<b><i>Caenorhabditis elegans</i> employs innate and learned aversion in response to bacterial toxic metabolites tambjamine and violacein</b>	• Multidisciplinary sciences	BALLESTRIE RO, F.; et al	2016
<b>New tambjamine class alkaloids from the marine ascidian <i>atapozoa</i> sp and its nudibranch predators - origin of the tambjamins in <i>atapozoa</i></b>	• Multidisciplinary sciences	LINDQUIST, N.; FENICAL,W.	1991
<b>Identification of Compounds with Bioactivity against the Nematode <i>Caenorhabditis elegans</i> by a Screen Based on the Functional Genomics of the Marine Bacterium <i>Pseudoalteromonas tunicata</i> D2</b>	• Microbiology; • Biotechnology applied microbiology	BALLESTRIE RO, F.; et al.	2010
<b>The use of functional genomics for the identification of a gene cluster encoding for the biosynthesis of an antifungal tambjamine in the marine bacterium <i>Pseudoalteromonas tunicate</i></b>	• Microbiology	BURKE, C. et al.	2007
<b>A molecular orbital study of tambjamine E and analogues</b>	• Physics atomic molecular chemical; • Chemistry physical	SKAWINSKI, et al.	2004
<b>Defense of ascidians and their conspicuous larvae - adult vs larval chemical defenses</b>	• Ecology	LINDQUIST, N.; HAY, M.E.;	1992

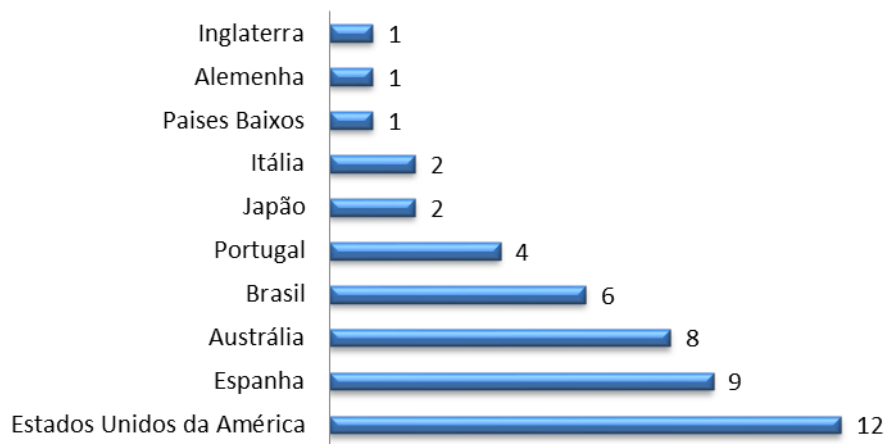
		FENICAL, W.	
<b>BE-18591 as a new H<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> symport ionophore that inhibits immunoproliferation and gastritis</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cell biology;</li> <li>• Biophysics;</li> <li>• Biochemistry</li> </ul>	TANIGAKI, K.; et al	2002
	Molecular Biology		

Fonte: Autoria própria (2017).

Quando se avaliou o número de publicações por países, os EUA foi o país que mais publicou com as Tambjaminsas, o Brasil encontra-se na quarta posição em número de publicações com a classe (Figura 24).

Figura 24. Número de publicações na base de dados *Web of Science* por país.

### Número de Publicações/ Países



Fonte: Autoria própria (2017).

Apesar do crescente interesse da comunidade científica pelas atividades biológicas das Tambjaminsas esses alcaloides ainda são pouco explorados e desta forma tornam-se necessários investimentos para conhecer seu potencial farmacológico total e seus mecanismos de ação, pois com os poucos trabalhos realizados com essas substâncias percebe-se que elas apresentam bons resultados contra as células tumorais e uma relevante atividade contra fungos e bactérias, além de ter apresentado ação contra a leishmaniose. Podendo ser útil desde o tratamento de doenças negligenciadas até a promoção de alternativas contra uma das doenças que mais mata em todo o mundo, o câncer.

## 5.2 Formulação de nanopartículas em PLGA

### 5.2.1 Caracterizações físico-químico dos nanossistemas em PLGA

O estudo para estabelecer o preparo adequado de nanopartículas de PLGA contendo tambjamins foi realizado, para isto, escolheu-se para o nanoencapsulamento das substâncias a técnica de emulsificação seguido da evaporação do solvente [emulsão simples (o/a)]. As variações iniciais dos protocolos envolveram mudanças no solvente, na quantidade dos reagentes, na rotação durante o preparo das emulsões (150 e 200 rpm) e o uso de duas temperaturas (25 e 37°C). Cruzando estas mudanças testaram-se diversos protocolos, porém, nenhuma das alterações metodológicas apresentadas obteve sucesso para o encapsulamento das tambjamins utilizando o sistema PLGA (Tabela 7). A solubilização incompleta foi um dos principais problemas observados havendo formação de um gel não homogêneo, outro problema observado foi a não dissolução dos compostos e consequente não incorporação ao nanossistema, havendo formação de precipitado ou aparecimento de cristais das substâncias. Melo (2016) praticamente não conseguiu encapsular o fármaco Oxaliplatina(OXP) nas nanopartículas de PLGA, independente da proporção fármaco/polímero testada. Este problema também foi relatado por Cohen-Sela et al. (2009) obtiveram uma baixa taxa de encapsulação em seus experimentos utilizando o mesmo método e polímero para encapsulação de fármacos hidrofílicos.

Estudos prévios realizados pelo nosso grupo (COSTA et al., 2016) conseguiram realizar o encapsulamento por PLGA da substancia Nor-beta-Lapachona, contudo as taxas de encapsulamento foram baixas (~19%).

As características químicas dos compostos a serem encapsulados, assim como o aumento da quantidade de lipídeos (HWANG et al. 2012) são determinantes para escolha do método e eficiência do processo de encapsulamento.

O método de PLGA não foi efetivo para o encapsulamento das Tambjamins, uma vez que não houve formação de nanossistemas estáveis.

Tabela 7. Composições metodológicas utilizadas para o nanoencapsulamento PLGA. A numeração de 1 a 14 indicam a quantidade de protocolos que foram testados a partir da modificação da composição.

Composição	Alterações metodológicas													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>PLGA (mg) 50:50</b>	200	200	200	200	150	100	100	75	75	200	200	100	100	100
<b>Cetona (mL)</b>	20	20	20	20	10	10	10	10	10	0	20	20	10	10
<b>Metanol (mL)</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	20	20	10	10
<b>Epikuron (mg)</b>	100	100	100	75	75	75	75	75	75	100	100	100	75	75
<b>Óleo de soja (mL)</b>	250	250	250	250	200	150	150	150	150	250	250	250	100	50
<b>Tambjamina I (mg)</b>	10	5	2	10	5	2	5	2	5	-	-	-	-	5
<b>Tambjamina J (mg)</b>	10	5	2	5	5	2	5	5	5	10	5	2	5	5
<b>PVA* 2% (mL)</b>	40	40	40	40	40	40	25	25	25	40	40	40	40	40

Fonte: Autoria própria (2017).

### 5.3 Formulação de nanopartículas em lipossoma

#### 5.3.1 Caracterizações físico-químicas dos nanossistemas de Lipossoma

As nanopartículas lipídicas foram padronizadas seguindo o protocolo e metodologias descritos na tabela 8. As nanopartículas produzidas não apresentaram cristais da droga ou deposição da mesma no fundo do recipiente por até oito meses de armazenamento em temperatura ambiente. Nesse período também não foi observado formação de precipitado, nem de aglomerados ou mudança de coloração. A estabilidade foi perdida após período de 12 meses de formulação, sendo esta submetida semanalmente ao processo de congelamento, descongelamento e mensalmente a avaliação da atividade de citotoxicidade as substâncias encapsuladas que mantiveram a CI50. Porém, ao fazer o teste de estabilidade acelerada, que submete os lipossomas preparados a condições de estresse simulando a passagem acelerada do tempo, a composição apresentou precipitado, menor que 0,1  $\mu\text{L}$  para ambas as substâncias encapsuladas. Alguns procedimentos foram determinantes para a formação do filme lipídico com os compostos encapsulados. Dentre os parâmetros testados, podemos destacar a relação entre a quantidade de fosfatidilcolina de soja, aumento da quantidade do composto e a redução da temperatura (Tabela 8).

As características químicas dos compostos a ser encapsulados, assim como o aumento da quantidade de lipídeos (HWANG et al. 2012) são determinantes para escolha do método e eficiência do processo de encapsulamento.

O presente trabalho demonstrou que, embora após muitos ajustes, o sistema de PLGA não foi adequado para o encapsulamento das Tambjamins I e J. Contudo, o sistema lipossomal, com os ajustes adequados dos constituintes permitiu o nanoencapsulamento de ambos os compostos.

Tabela 8. Composições metodológicas utilizadas para o nanoencapsulamento em lipossomas. A numeração de 1 a 10 indicam a quantidade de protocolos que foram testados a partir da modificação da composição até a formação do filme e alteração do tempo de sonicação/repouso.

Composição	Alterações metodológicas									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Fosfatidilcolina de soja (PC) (Lipoid) (mg)</b>	237	311	237	237	237	237	255	237	237	237
<b>Colesterol (CHOL) (Sigma) (g)</b>	34,1	44,7	34,1	34,1	34,1	34,1	17	34,1	34,1	34,1
<b>Diestearilamina (SA) (Sigma) (mg)</b>	11,3	14,8	11,3	11,3	11,3	-	11,3	11,3	11,3	11,3
<b>Tambjamina (TJ) (mg)</b>	5	5	1	2	2	2	2	5	10	10
<b>Temperatura (°C)</b>	45	45	50	45	45	45	55	37	37	37
<b>Tamanho (nm)</b>	42	55	42	42	42	42	55	40	40	40
<b>Formação de filme</b>	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	SIM	SIM
<b>Sonicação (tempo) (sonicando/repouso)</b>	-	-	-	-	-	-	-	30s/ 30s	60s/ 60s	90s/ 90s

Fonte: Autoria própria (2017).

### 5.3.2 Tamanho de partículas

O tamanho das partículas lipossomais é influenciado por diversos parâmetros, como a composição da formulação (mistura dos tensoativos, propriedades estruturais dos lipídios e fármaco incorporado), métodos de produção e as condições estabelecidas para produção, como tempo de preparo, temperatura entre outros (Tabela 8).

No presente trabalho, a relação sonicação/repouso foi mais determinante para o tamanho das nanopartículas geradas (Tabela 9). Tanto o Potencial Zeta, como o tamanho de



partículas gerados variaram com o tempo de sonicação. Por apresentar um menor tamanho de partícula LTI (121 nm) e LTJ (117 nm) o tempo de 90 segundos de sonicação/repouso foi escolhido para dar continuidade à caracterização, taxa de encapsulamento e aos ensaios *in vitro*.

Os lipossomas contendo as Tambjaminsas (I ou J) apresentaram tamanho com diâmetros médios de  $0,12 \pm 0,02$  e  $0,117 \pm 0,016$   $\mu\text{m}$ , respectivamente, enquanto o placebo apresentou de  $0,67 \pm \mu\text{m}$ . Foi observado, que mesmo seguindo as mesmas condições de preparo, o sistema lipossomal LTJ apresentou tamanhos de partículas menores quando comparado com os LTI, fato que provavelmente está relacionado às propriedades químicas de cada uma das Tambjaminsas e a maneira como o sistema de encapsulação foi gerado.

Tabela 9. Avaliação do tamanho das partículas e Potencial Zeta das nanoemulsões de Tambjaminsas em lipossomas.

Fonte: Autoria própria (2017).

Substâncias	Médias de 10 leituras				
	Tempo de Sonicação (60 sonicando/60 repouso)		Tempo de Sonicação (90 sonicando/90 repouso)		
	Potencial Zeta (mV)	Tamanho da partícula (nm)	Potencial Zeta (mV)	Tamanho da partícula (nm)	Taxa de encapsulamento (%)
<b>LTI</b>	+40	164	+ 86	121	93
<b>LTJ</b>	+34	160	+71	117	97
<b>LB</b>	+30	120	+70,1	67	-

Ao avaliar a estabilidade das cargas, através do potencial zeta, os lipossomas placebo (LB) apresentaram um potencial de  $+70,1 \pm 0,35$  mV enquanto que os nanossistemas contendo as Tambjaminsas foram +86 e +71 mV para LTI e LTJ, respectivamente (Tabela 9). Com esta análise, pode-se prever a estabilidade física de sistemas coloidais que segundo a literatura, valores a partir de  $|30|$  mV demonstram uma boa estabilidade física do sistema coloidal, inclusive durante a estocagem, valores próximos a  $|60|$  mV são considerados ótimos (CHEN, et al. 2006). No presente estudo, os lipossomas contendo as Tambjaminsas apresentaram valores de Potencial Zeta acima de  $|60|$  mV e como esperado, os nanossistemas permaneceram estáveis após os processos de avaliação durante o período de 12 meses.

Uma das maneiras de avaliar a eficiência do encapsulamento é através do cálculo de rendimento do processo. Esse processo é influenciado tanto pela concentração dos lipídios

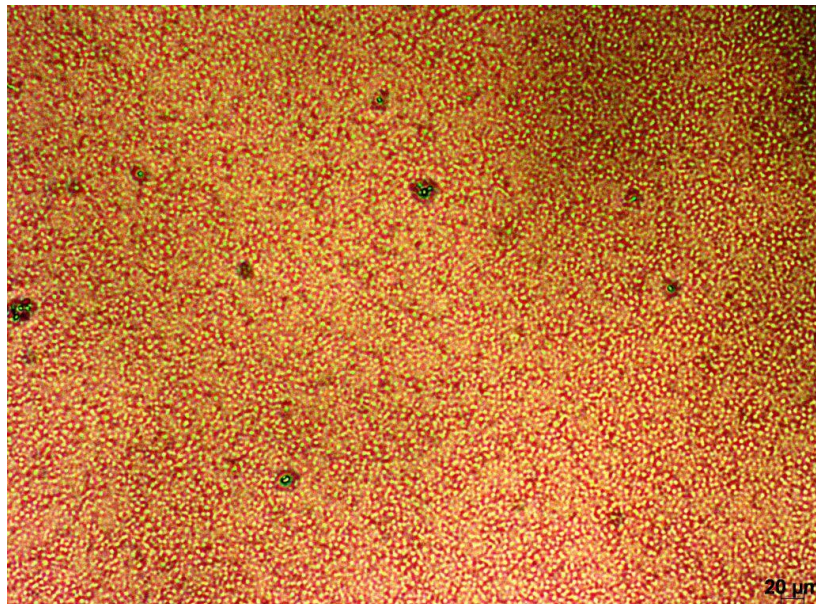
como pelo tamanho (diâmetro) dos lipossomas (HEEREMANS et al., 1995; HWANG et al., 2012). Segundo HWANG et al. (2012) a taxa de encapsulamento pode ser elevada com o aumento da concentração de lipídios, pois este reflete um maior volume interno disponível. Os lipossomas com Tambjamins apresentaram taxa de encapsulamento de 97% (LTJ) e 93% (LTI), utilizando as mesmas condições de preparo.

Os dados gerados a partir de ambos os sistemas aponta o método de hidratação do filme seguido de sonicação um método eficiente para o encapsulamento de Tambjamins em lipossomas, pois com essa metodologia foi possível encapsular ambos os compostos trabalhados, os sistemas gerados apresentaram-se estáveis e com uma taxa de encapsulamento maior que 93% (tabela 9).

### 5.3.3 Análise morfológica

Na análise em microscópio óptico (Figura 25) foi possível à visualização dos nanossistemas em pequenas esferas uniformes sem a presença de cristais da droga, bolhas, filamentos e/ou aglomerado de lipossomas.

Figura 25. Processo de incorporação de tambjamins em lipossoma pelo método de hidratação do filme lipídico. Imagem gerada a partir de microscópio óptico invertido no aumento de 40x.



Fonte: Autoria própria (2017).

#### 5.4 Avaliação da atividade citotóxica, em linhagens celulares, das Tambjamins na forma livre e encapsuladas em Lipossomas

A atividade antitumoral das Tambjamins esta relacionada à substância e ao seu radical, pois cada um deles pode agir de forma diferente, isto pode ser observado em outros estudos de citotoxicidade que utilizam as Tambjamins. Todas as tambjamins, exceto a Tambjamina A apresentam citotoxicidade frente a diversas linhagens tumorais (GRANATO, 2005). As Tambjamins I e J testadas neste trabalho apresentaram  $CI_{50}$  que variaram de 3,2  $\mu$ M (HL60) a 11,7  $\mu$ M (MCF7) (Tabela 10). Valores compatíveis para a classe, como previamente descrito pelo nosso grupo (NEPOMUCENO, 2012).

Tabela 10. Atividade citotóxica em diferentes células de câncer, expressa em  $CI_{50}$  para droga Tambjamina I, Tambjamina J livres e doxorubicina (Dox) (controle positivo) após 72h de incubação.

Linhagem (Origem)	CI <sub>50</sub> $\mu$ M (intervalo de confiança 95%)		
	TI	TJ	Doxorubicina
<b>SF295</b> (Glioblastoma)	<b>5,55</b> (4,97- 6,23)	<b>6,02</b> (5,40-6,70)	<b>0,25</b> (0,22-0,28)
<b>HCT-116</b> (Cólón)	<b>5,0</b> (4,7- 6,8)	<b>4,2</b> (3,5- 4,8)	<b>0,11</b> (0,08-0,14)
<b>HCT-8</b> (Cólón)	<b>2,3</b> (1,9- 2,7)	<b>4,1</b> (3,6-4,6)	<b>0,23</b> (0,19-0,25)
<b>SW620</b> (Cólón)	<b>8,0</b> (7,4- 8,6)	<b>6,0</b> (5,5- 6,5)	<b>0,07</b> (0,03-0,11)
<b>HEPG2</b> (Hepatocarcinoma)	<b>10,9</b> (9,9- 12,0)	<b>8,7</b> (7,9- 9,6)	<b>0,21</b> (0,17-0,25)
<b>HL60</b> (Leucemia)	<b>3,2</b> (2,8- 3,7)	<b>3,6</b> (3,1- 4,1)	<b>0,02</b> (0,01-0,02)
<b>K562</b> (Leucemia)	<b>5,50</b> (5,10- 5,90)	<b>4,5</b> (4,1- 4,9)	<b>0,46</b> (0,45-0,47)
<b>PC3</b> (Próstata)	<b>5,40</b> (4,69- 6,79)	<b>4,12</b> (3,5- 4,84)	<b>0,44</b> (0,43-0,45)
<b>MCF7</b> (Mama)	<b>11,7</b> (10,7- 12,7)	<b>9,9</b> (9,2- 9,6)	<b>0,17</b> (0,16-0,18)
<b>3T3</b> (Fibroblastos não transformados)	<b>8,9</b> (7,9- 10,0)	<b>8,1</b> (7,3- 9,0)	<b>0,61</b> 0,48 to 0,76
<b>L929</b> (Fibroblastos não transformados)	<b>7,7</b> (6,9-9,3)	<b>5,9</b> (5,3-6,4)	<b>0,66</b> (0,49- 0,83)

Fonte: Autoria própria (2017).

Ao comparar as  $CI_{50}$  das drogas livres e encapsulada (Tabela 11), a relação foi diferente entre os dois compostos após o processo de encapsulamento. Houve diferenças

estatísticas entre as CI50 na maioria das linhagens testadas entre o composto TI livre o nanossistema (LTI), exceto para linhagem HCT116 (TI 5,0  $\mu\text{M}$ ) e (LTI 4,69  $\mu\text{M}$ ). Enquanto que a Tambjamina J não houve diferença estatística entre TJ e LTJ em praticamente todas as linhagens, exceto SW620 (TJ 6,0  $\mu\text{M}$ ) e (LTJ 5,16  $\mu\text{M}$ ) e PC3 (TJ 4,2  $\mu\text{M}$ ) e (LTJ 6,91  $\mu\text{M}$ ).

Foi observada influência nos resultados de  $\text{CI}_{50}$  entre as diferentes origens celulares quando tratadas com as Tambjaminsas I e J. Esse dados corroboram com os achados de Carbone et al. (2010) trabalhando com a Tambjamina K encontrou variação na resposta do composto nas diferentes linhagens testadas. Em seu trabalho encontrou valor de  $\text{CI}_{50}$  (0,0035  $\mu\text{M}$ ) para linhagem de Adenocarcinoma de colorretal humano (CaCo-2) enquanto que Aldrich, et al. (2010) testou a mesma Tambjamina K contra a linhagem de câncer colorretal (HCT-116) encontrou uma  $\text{CI}_{50}$  de 13,7  $\mu\text{M}$ , enquanto que neste trabalho foi encontrado 5,0 e 4,2  $\mu\text{M}$  para Ti e Tj, respectivamente. Granato et al (2005) avaliando a citotoxicidade da Tambjamina D observou que o composto apresentou elevada  $\text{CI}_{50}$  (13,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) na linhagem HL60 enquanto que Nepomuceno (2012), avaliando outras Tambjaminsas contra a mesma linhagem encontrou valores de  $\text{CI}_{50}$  bem mais baixos, tambjamina C (2,29  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), E (90,15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), F (2,26  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), G (2,51  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), H (6,23  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), I (0,61  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e J (0,49  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) a 3,42 (2,59 - 4,52)  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Desta forma, as Tambjaminsas I e J previamente estudadas pelo nosso grupo (NEPOMUCENO, 2012) já haviam mostrado, excelente perfil citotóxico contra diversas linhagens tumorais, dentre elas HL60. Cantalice (2014) comparou o efeito citotóxico das tambjaminsas (I e J) e prodgiosina testadas contra as linhagens tumorais HepG2, MCF-7 e HL 60 tendo encontrado valores de  $\text{CI}_{50}$  de 3,4, 5,1 e 1,7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , para a prodgiosina, respectivamente, enquanto que as tambjaminsas apresentaram 3,5 e 2,9  $\mu\text{g}/\text{mL}$  HepG2, 3, 79 e 3,33  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para MCF-7 e 1,05 e 1,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para I e J, respectivamente.

Tabela 11. Atividade citotóxica em diferentes células de câncer, expressa em  $\text{CI}_{50}$  para drogas livres Tambjaminsas I (TI), Tambjamina J (TJ) e encapsuladas LTI e LTJ. Doxorubicina (Dox) (controle positivo) após 72h de incubação.

Linhagem (Origem)	$\text{CI}_{50}$ $\mu\text{M}$ (intervalo)				
	TI	TJ	LB	LTI	LTJ
<b>SF295</b> (Glioblastoma)	<b>5,55</b> (4,97- 6,23)	<b>6,02</b> (5,40-6,70)	-	<b>12,31</b> (11,69-13,02)	<b>6,17</b> (5,87-6,75)

<b>HCT-116</b> (Colorretal)	<b>5,0</b> (4,7-6,8)	<b>4,2</b> (3,5- 4,8)	-	<b>4,69</b> (4,10-5,34)	<b>4,06</b> (3,50-4,72)
<b>SW620</b> (Colorretal)	<b>8,0</b> (7,4-8,6)	<b>6,0</b> (5,5- 6,5)	-	<b>6,23</b> (5,49-7,09)	<b>5,16</b> (4,57-5,94)
<b>PC3</b> (Próstata)	<b>5,4</b> (4,69-6,79)	<b>4,12</b> (3,5-4,84)	-	<b>9,25</b> (7,42-11,54)	<b>6,91</b> (5,66-8,07)
<b>NCIH460</b> (Pulmão)	<b>5,4</b> (4,80-6,06)	<b>5,8</b> (5,15-6,74)	-	<b>8,02</b> (6,82-9,38)	<b>6,23</b> (5,64-6,88)
<b>L929</b> (Fibroblastos não transformados)	<b>7,7</b> (6,9-9,3)	<b>5,9</b> (5,3-6,4)	-	<b>8,1</b> (7,33-8,13)	<b>5,8</b> (4,90-9,95)

Fonte: Autoria própria (2017).

No presente trabalho as CI<sub>50</sub> das Tambjamins I e J apresentadas contra a linhagem HCT116 não apresentaram diferença entre os compostos livres e os encapsulados. Mostrando, assim, que além da linhagem trabalhada, o tipo de substância e seus respectivos radicais (Adição de grupo metil para tambjamina J), influenciaram na citotoxicidade e no efeito desses compostos quando apresentados na forma dos nanossistemas lipossomais. O lipossoma placebo (LB), livre de droga, não apresentou citotoxicidade frente a nenhuma das linhagens testadas (dose sempre  $\geq$  tratamento utilizando lipossoma contendo droga).

A linhagem a HCT116 foi a que apresentou melhor sensibilidade quando comparado os tratamentos tanto com os compostos livres quanto com os compostos encapsulados em lipossomas, para as duas Tambjamins, em relação às demais linhagens. As diferenças nas CI<sub>50</sub>, dos compostos livres e encapsulados, podem estar relacionadas às vias de mecanismos de ação que podem apresentar-se diferente entre as linhagens celulares. Testes realizados por LIM et al. (2000) demonstraram diferentes níveis de acumulação de mitoxantrona lipossômica em tumores de carcinoma de cólon humano (LS180) em comparação com tumores de câncer de pele não melanoma (A431). Essa descoberta foi atribuída à absorção de lipossomas mais rápida na linhagem celular LS180 quando comparada a linhagem A431.

Uma característica inerente aos sistemas lipossomais é a possibilidade de entrada nas células por adsorção e endocitose, ou até mesmo um mecanismo de fusão, que são características que podem diminuir ou eliminar os efeitos colaterais apresentados quando testados *in vivo* utilizando a droga livre em camundongos (NEPOMUCENO, 2012). No presente estudo de citotoxicidade *in vitro* a ação das Tambjamins livres ou encapsuladas em lipossomas na linhagem celular HCT-116 foram semelhantes.

Após o *screening* nas linhagens tumorais e não tumorais com as substâncias livres e encapsuladas, considerando os valores de citotoxicidade de ambas as formas (Tabela 11) escolheu-se a linhagem HCT116 para os demais testes de avaliação do efeito antiproliferativo

e de mecanismo de ação das Tambjamins. Essa escolha se deve a menor CI<sub>50</sub> apresentada no teste de MTT tanto na forma livre como na forma encapsulada.

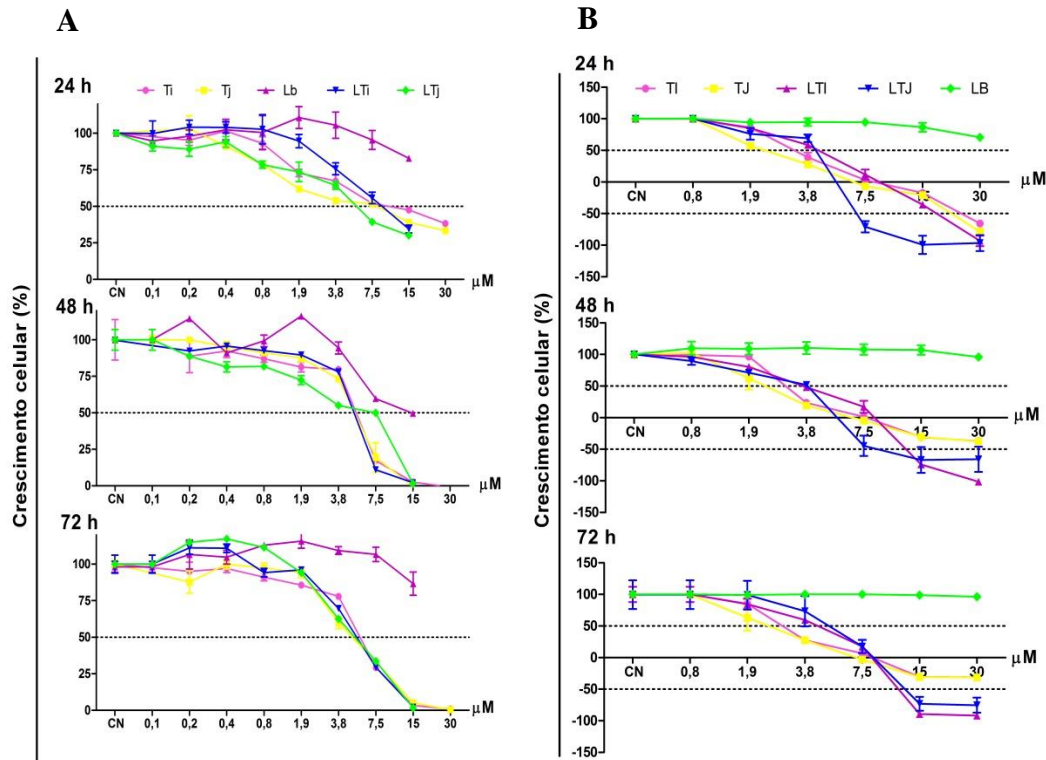
Alterações na viabilidade celular foram avaliadas para determinar o efeito antiproliferativo (citostático) ou citotóxico desses compostos. O ensaio do MTT não fornece diferenças entre a análise citotóxica e citoestática, por essa razão foi realizado o ensaio de SRB e o mesmo foi comparado ao MTT, ambos realizados nos tempos de 24, 48 e 72h de incubação com as drogas livres e encapsuladas na linhagem HCT116 (Figura 26, Tabela 12).

Tabela 12. Comparação do perfil antiproliferativo/citotóxico das Tambjamins na forma livre e encapsulada, através do ensaio de Sulfurodamina B (SRB) e comparação com o ensaio de MTT, realizados na linhagem tumoral HCT-116 tratada por 24, 48 e 72h.

Ensaio	Substâncias	Tempo		
		24 h	48 h	72 h
SRB	TI	<b>2,23</b> (2,29-3,35)	<b>2,70</b> (2,25-3,23)	<b>2,59</b> (2,30-2,92)
	LTI	<b>3,30</b> (2,06-5,2)	<b>2,98</b> (1,88-2,63)	<b>3,34</b> (1,7-6,2)
	LB	>30	>30	>30
	TJ	<b>2,7</b> (1,67-2,97)	<b>2,7</b> (1,74-5,09)	<b>2,3</b> (1,92-2,78)
	LTJ	<b>3,35</b> (1,35-7,90)	<b>2,98</b> (1,87-4,12)	<b>3,99</b> (1,90-8,38)
	MTT	TI	<b>10,92</b> (8,3-14,4)	<b>4,6</b> (3,2-6,4)
MTT	LTI	<b>8,47</b> (6,0-9,2)	<b>4,13</b> (3,6-4,7)	<b>4,5</b> (3,7-5,4)
	LB	>30	>30	>30
	TJ	<b>6,21</b> (4,5-8,5)	<b>4,2</b> (3,5-4,9)	<b>4,1</b> (3,6-4,9)
	LTJ	<b>4,69</b> (3,5-5,6)	<b>3,2</b> (2,3-4,45)	<b>4,3</b> (3,1-5,8)

Fonte: Autoria própria (2017).

Figura 26. Comparação do perfil antiproliferativo/citotóxico das Tambjamins na forma livre (TI e TJ) e encapsuladas (LTI e LTJ), através dos ensaios de (A) MTT e (B) Sulforodamina B (SRB), na linhagem tumoral HCT-116 tratadas por 24, 48 e 72h.



Fonte: Autoria própria (2017)

O ensaio de SRB mostrou que as substâncias testes podem ter iniciado seu efeito antiproliferativo já em 24 horas de exposição. Resultado não observado no ensaio de MTT, que apresentou resultados de  $CI_{50}$  mais elevados neste tempo. Alguns fatores podem ser responsáveis por essa diferença de  $CI_{50}$  na avaliação pelas duas técnicas. Um dos fatores seria a o efeito dos compostos sob as células tratadas, que podem interferir na via mitocondrial, causando alteração do potencial mitocondrial, que pode ser um fator determinante ao ensaio de MTT. O ensaio do SRB, por outro lado, tem os valores de  $CI_{50}$  determinados proporcionalmente à quantidade de resíduos de aminoácidos de proteínas celulares, que também está relacionado ao número total de células (VICHA; KIRTIKARA, 2006), mas que não sofrem influência do efeito dos compostos, seja pela inibição da proliferação celular ou alteração do potencial mitocondrial, esses fatores não alteram a precisão dos resultados por essa técnica. Por outro lado, o ensaio do MTT no tempo de 24h para as tambjamins pode ter sido influenciado por essas alterações, tanto do potencial mitocondrial, como na redução do

número de células que interferem diretamente na quantidade de formazan gerada e, consequentemente, nos valores finais de  $CI_{50}$ .

Analisando os resultados de  $CI_{50}$  para os tempos de 24, 48 e 72h, pelos dois ensaios realizados, escolheu-se iniciar os estudos pelo tempo de 48h, considerando os valores de  $CI_{50}$  das duas técnicas.

### **5.5 Avaliação da alteração na viabilidade celular *in vitro* em linhagens DT-40**

Foi realizada a avaliação da citotoxicidade em um painel de células da linhagem DT40 que são deletados/mutados para diversos genes relacionados a diferentes vias de reparo de DNA. Com o teste foi possível avaliar se as Tambjamins I e J possuíam características genotóxicas, ou seja, indução de dano ao DNA. O efeito dos compostos foi avaliado após 72 horas de tratamento.

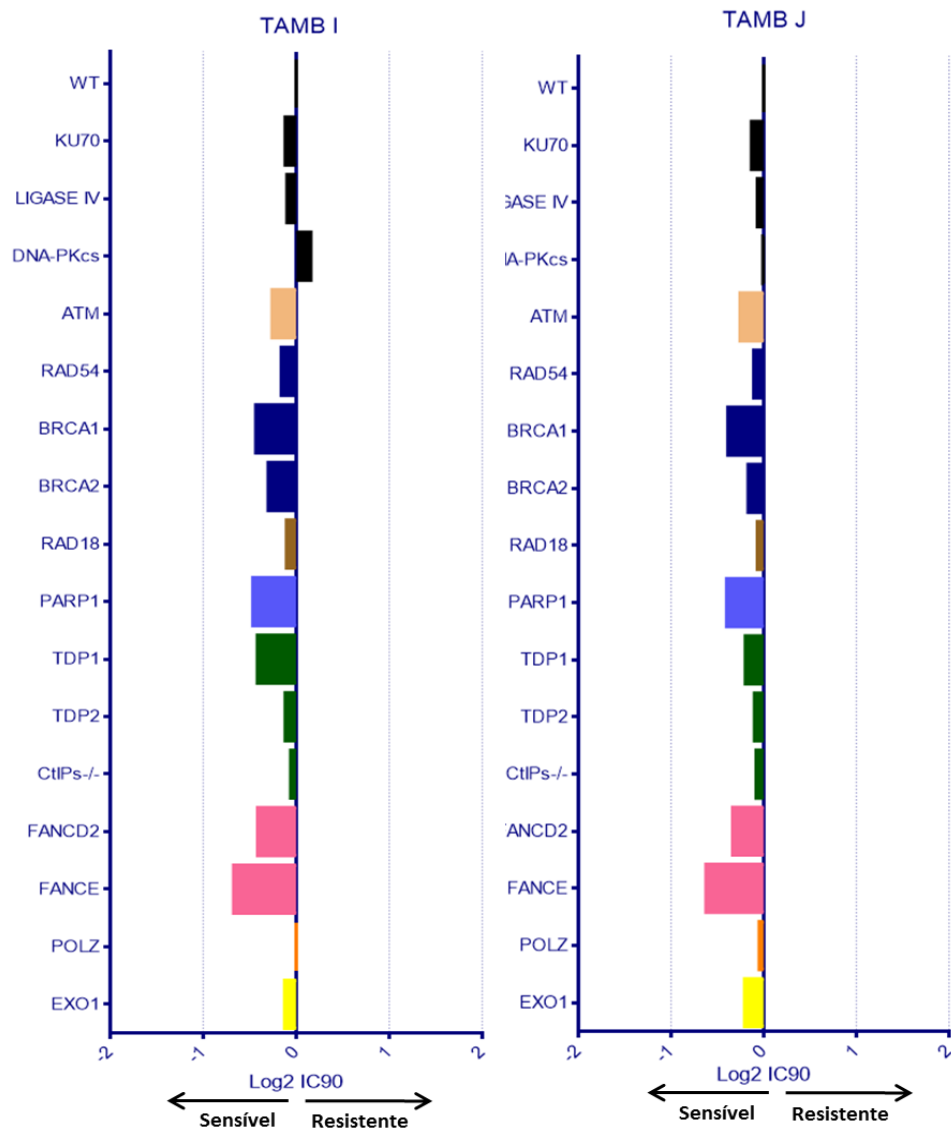
A Figura 27 mostra as  $IC_{90}$  codificadas por cor para cada via de reparo, as barras do lado esquerdo indicam hipersensibilidade enquanto as da direita indicam resistência, quando comparados à linhagem selvagem (WT – *wild-type*).

Com o teste foi possível avaliar se as Tambjamins eram genotóxicas, ou seja, se induziam dano ao DNA. Havendo dano é possível prever, a partir da avaliação das vias de reparo, o tipo de dano. Essas linhagens permitem, ainda, a avaliação de genes importantes para o possível mecanismo de ação da droga, considerando os resultados de sensibilidade ou resistência ao tratamento com Tambjamins nas linhagens mutantes.

A partir desses resultados é possível identificar genes que podem ser alvos moleculares e assim permitir o aumento da seletividade e sobrepor à resistência aos inibidores de topoisomerasas.



Figura 27. Perfil de sensibilidade das Tambjamins I e J em 17 linhagens DT40 deficiente em genes de reparo de DNA em diferentes vias moleculares, após 72h de tratamento. Camptotecina (CPT), Etoposídeo (ETP) e ICRF-193 foram utilizados com controle positivo. Valores negativos (esquerda) e positivos (direita) mostram que as células indicadas são sensíveis ou resistentes, respectivamente, ao composto testado. As barras estão coloridas de acordo com a principal via de reparo de DNA em que cada gene deficiente naquela célula pertence: preto, NHEJ (junção de pontas não homólogas); salmão, checkpoint de dano; azul, recombinação homóloga (HR); marrom, síntese translesão (TLS); azul claro, PARP1; verde, remoção de complexos de clivagem de Top1 ou Top2; rosa, via da Anemia Fanconi; laranja, DNA polimerases e síntese translesão; roxo, FEN1 (flap endonuclease); vermelho, reparo por excisão de nucleotídeos (NER); amarelo, EXO1. As células do tipo selvagem (WT) estão mostradas no topo do gráfico.



Fonte: Autoria própria (2017).

A maioria das células tratadas com os compostos TI e TJ apresentaram-se sensíveis em todas as mutações gênicas avaliadas. Exceto para os DNA-PKc (Junção de pontas não-homólogas (NHEJ), que apresentou resistência ao composto TI. A estreita relação de ambos os compostos com dano de DNA e vias de reparo permite inferir diferentes vias relacionadas aos possíveis mecanismos de ação desses compostos, além de permitir a identificação potenciais alvos moleculares, a fim de aumentar a seletividade e desta forma sobrepor a resistência celular a inibidores de topoisomerasas. Ambos os compostos foram mais efetivos contra linhagens com deleção/mutação no gene FANCE que tem por função, reparo de *crosslinks* entre fitas DNA, o que pode indicar que os compostos causam danos na fita dupla de DNA.

A ação de compostos sobre células com genes alterados específicos para vias de reparo quando comparados aos respectivos modelos selvagens trazem impactos diretos em proteínas responsáveis pelas respostas celulares. A maioria das respostas celulares são promovidas por danos iniciados pela ativação de proteínas denominadas de “sensores” é detectada pela presença de modificações no DNA entre essas estão às proteínas que podemos destacar a ATM, ATR, DNA-PKcs além da família de poli (ADP) ribose polimerase (PARP). As proteínas ATM, ATR, DNA-PKcs são pertencentes à família de proteínas quinases que estão relacionadas a família das PI3K (fosfatidilinositol-3-fosfato quinases) que atuam na detecção dos danos e por meio da cascata de fosforilação transmitem o sinal para moléculas “transdutoras” que irão conduzir os sinais para as moléculas “efetoras”. (CICCIA; ELLEDGE, 2010; LORD; ASHWORTH, 2012)

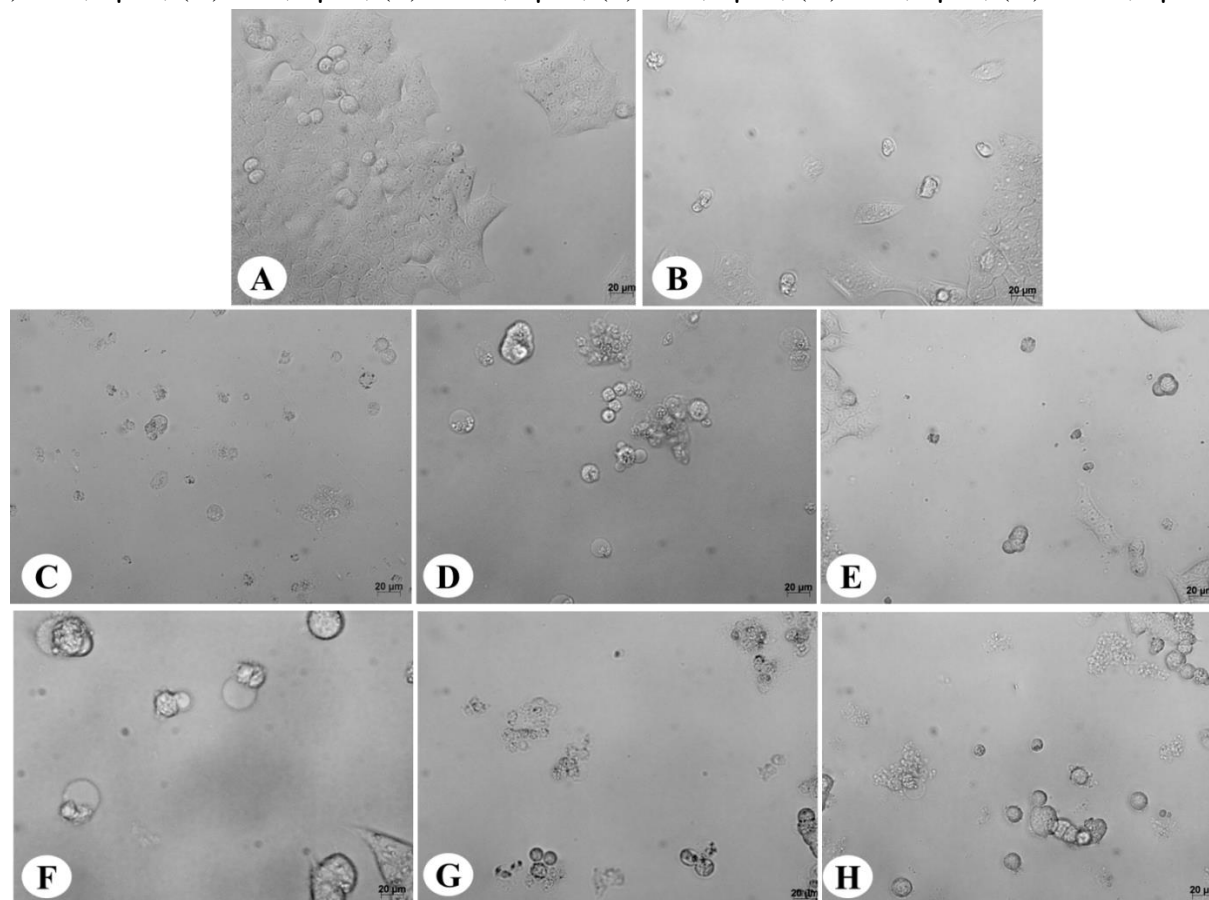
A quebra de fita simples regiões desse DNA apresentam alta afinidade com a proteína de replicação A (RPA) e após sua ligação e formação do substrato parece emitir sinal para o recrutamento dessas quinases. Logo após a quebra de fita dupla no DNA, acontece o recrutamento da proteína ATM que fosforila diferentes proteínas essenciais à sinalização e ativação de vias de danos e reparo de DNA. A histona H2AX é o alvo mais próximo dessa cascata de sinalização que ao ser fosforilada por ATM, DNA-PK ou ATR irá atuar recrutando proteínas que iniciaram o processo de remodelagem da cromatina, fato essencial para o acesso da maquinaria de reparo. Além disso, a ATM e ATR reduzem a atividade da quinase dependente de ciclina (CDK2) por meio da ativação da transcrição de p53 que resulta no atraso da progressão do ciclo celular, promovendo um aumento do tempo disponível necessário para que haja o reparo das lesões de DNA antes que ocorra a replicação ou divisão celular (JACKSON; BERTEK, 2009; SU, 2006)

O sucesso desses inibidores personalizados de moléculas, como o uso de linhagens com genes mutados/deletados, por exemplo, inspirou os pesquisadores a procurar os próximos alvos terapêuticos que serão sensíveis para cânceres específicos, ao tempo que têm efeitos mínimos nas células normais. Parece que os alvos que parecem ter o maior potencial são as proteínas que funcionam no reparo do dano do DNA, na regulação do ciclo celular e na mitose. Estas são todas as vias em que as proteínas FA (anemia Fanconi) também funcionam. As tentativas anteriores de desenvolver inibidores de Ku/DNA-PK, inibidores de ATR/CHK1 e inibidores de Rad51 resultaram em agentes excessivamente citotóxicos e não específicos que são muito pouco práticos para uso clínico (GAVANDE et al. 2016). As proteínas da anemia de Fanconi já demonstraram seu potencial para promover o crescimento do câncer e a resistência a medicamentos em determinados contextos. A dependência dos cânceres BRCA1 / 2 no FANCD2 na promoção do Alt-EJ (KAIS et al., 2016) torna a exploração da via FA uma opção atraente para terapias direcionadas.

#### **5.6 Avaliação de alterações morfológicas da linhagem HCT-116 após o tratamento com tamjamins livres e lipossomais**

Ao avaliar as imagens de microscopia óptica sem coloração, dos tratados em relação ao controle foram observados uma redução do número de células, aumento do tamanho celular, formação de vesículas ou vacúolos, células não aderidas e presença de restos celulares (Figura 28A-H). Após coloração com o kit panótico rápido foram observados os mesmos padrões de redução do número de células e aumento do tamanho celular, assim como formação de vesículas ou vacúolos, contudo as células desagregadas, provavelmente se perderam durante o processo de preparo das lâminas, não tendo sido observados em grandes quantidades os eventos de morte como a formação de *blebs* (Figura 29A-H). A perda de células com essas características de morte celular pode ser decorrente de algumas das células soltas, não viáveis, terem sido perdidas durante o processo metodológico, que pode estar relacionado inclusive no aumento de restos celulares observados nas lâminas coradas, comparado ao observado nas imagens de campo claro.

Figura 28. Células HCT116 cultivadas e tratadas com Tambjamins livres e encapsuladas por 24h de tratamento. (A) Controle negativo, (B) Doxorubicina 0,3  $\mu\text{M}$ , (C) TI 2,5  $\mu\text{M}$ , (D) TI 5,0  $\mu\text{M}$ , (E) LTI 5,0  $\mu\text{M}$ , (F) TJ 2,8  $\mu\text{M}$ , (G) TJ 4,2  $\mu\text{M}$ , (H) LTJ 4,2  $\mu\text{M}$ . Aumento de 20x.



Fonte: Autoria própria (2017).

Ao analisar a morfologia celular da HCT116 com 24 horas de tratamento (Figura 28) foi possível observar características como tumefação, formação de *blebs*, extravasamento nuclear, dissolução da cromatina, picnose, vacuolização e necrose.

Essas características já foram observadas em trabalho prévio, com as tambjamins I e J, realizado por Nepomuceno (2012) utilizando células HL-60 por meio do método de coloração(May-Grünwald-Giemsa e brometo de etídeo/laranja de acridina) e prodgiosina.

Ao ampliar a região marcada pela seta verde tracejada na figura 29H (HCT-116 tratada com LTJ-4,2  $\mu\text{M}$ ) (Figura 30) foi possível observar vesículas em formatos lipossomais, semelhantes às observadas na caracterização óptica dos nanossistemas (Figura 25). A observação dessas vesículas íntegras, em células com a morfologia ainda intacta, pode indicar o início do processo de absorção desses lipossistemas pelas células, fato que não observamos com o composto LTI, o que pode sugerir que esse composto tenha iniciado esse processo num tempo ainda menor, do que os avaliados no presente estudo.

Figura 29. Células HCT116 cultivadas e tratadas com tambjaminas livres e encapsuladas por 24h de tratamento. Microscopia óptica a partir de coloração panótipo rápido, aumento de 20x. (A) Controle negativo, (B) Doxorubicina 0,3  $\mu\text{M}$ , (C) TI 2,5  $\mu\text{M}$ , (D) TI 5,0  $\mu\text{M}$ , (E) LTI 5,0  $\mu\text{M}$ , (F) TJ 2,8  $\mu\text{M}$ , (G) TJ 4,2  $\mu\text{M}$ , (H) LTJ 4,2  $\mu\text{M}$ . As setas indicam os aspectos apoptóticos observados. Seta branca indica dissolução da cromatina, azul (picnose), cinza (tumefação), rosa (necrose), amarela (vacuolização), vermelha (*blebs*), verde (restos celulares), verde tracejada (Nanossistema lipossomal).

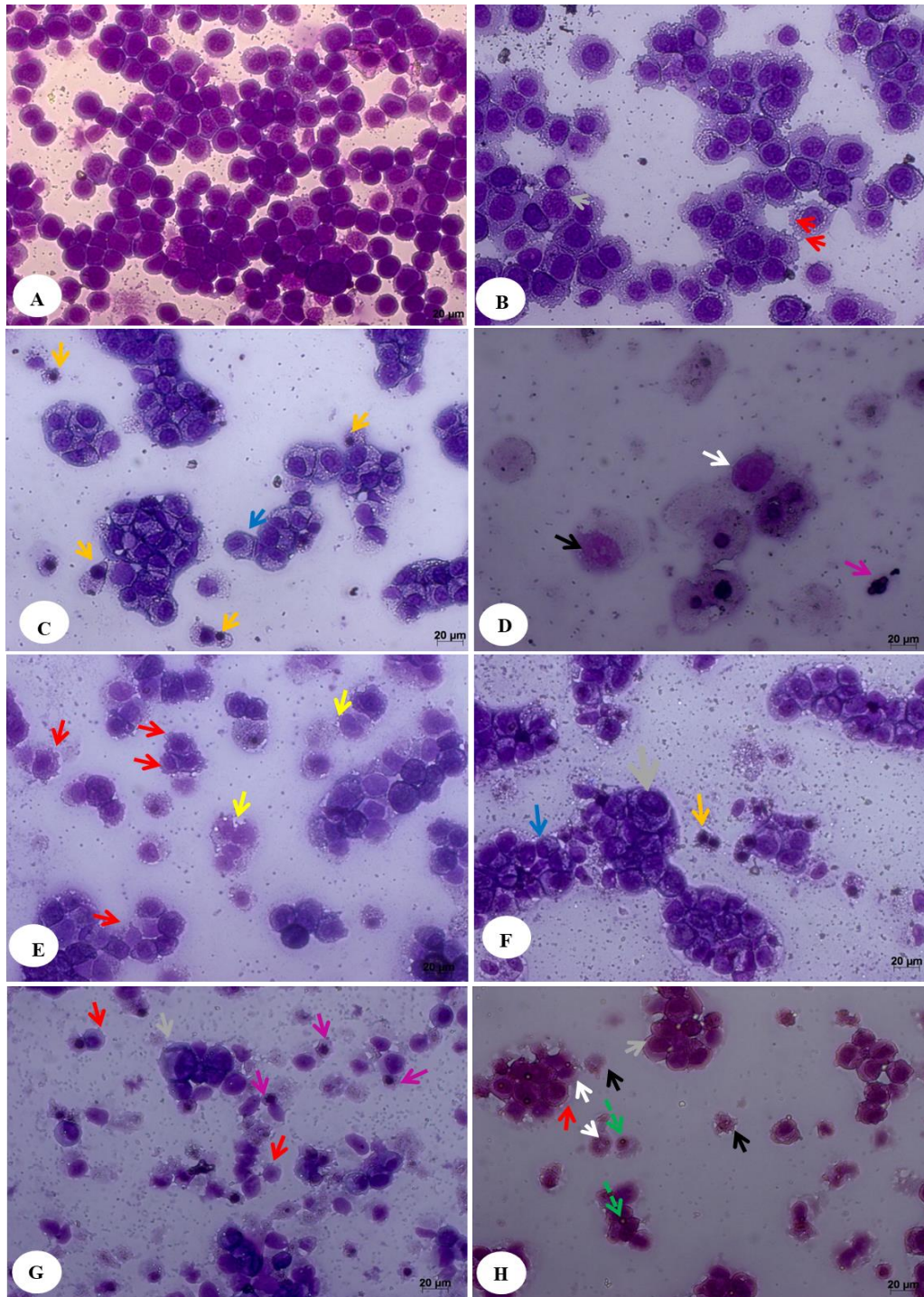
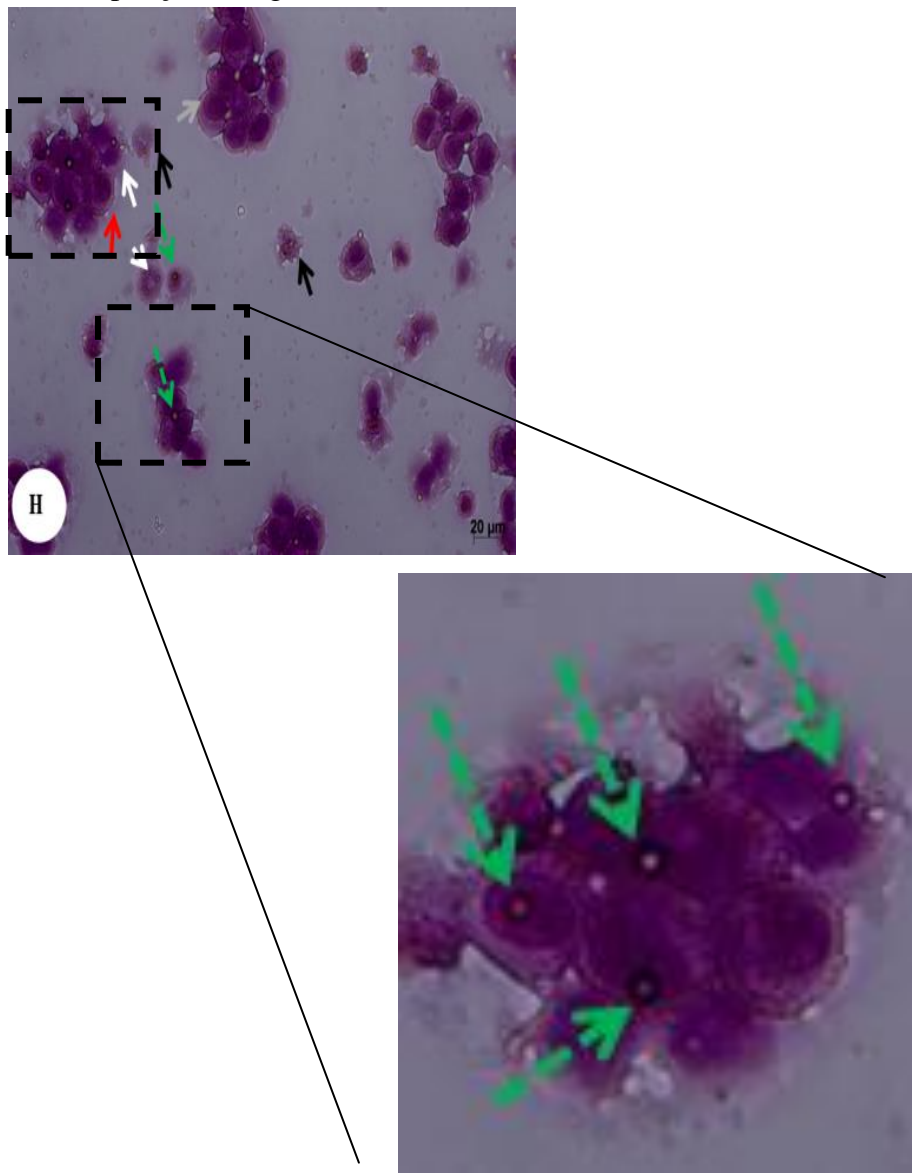


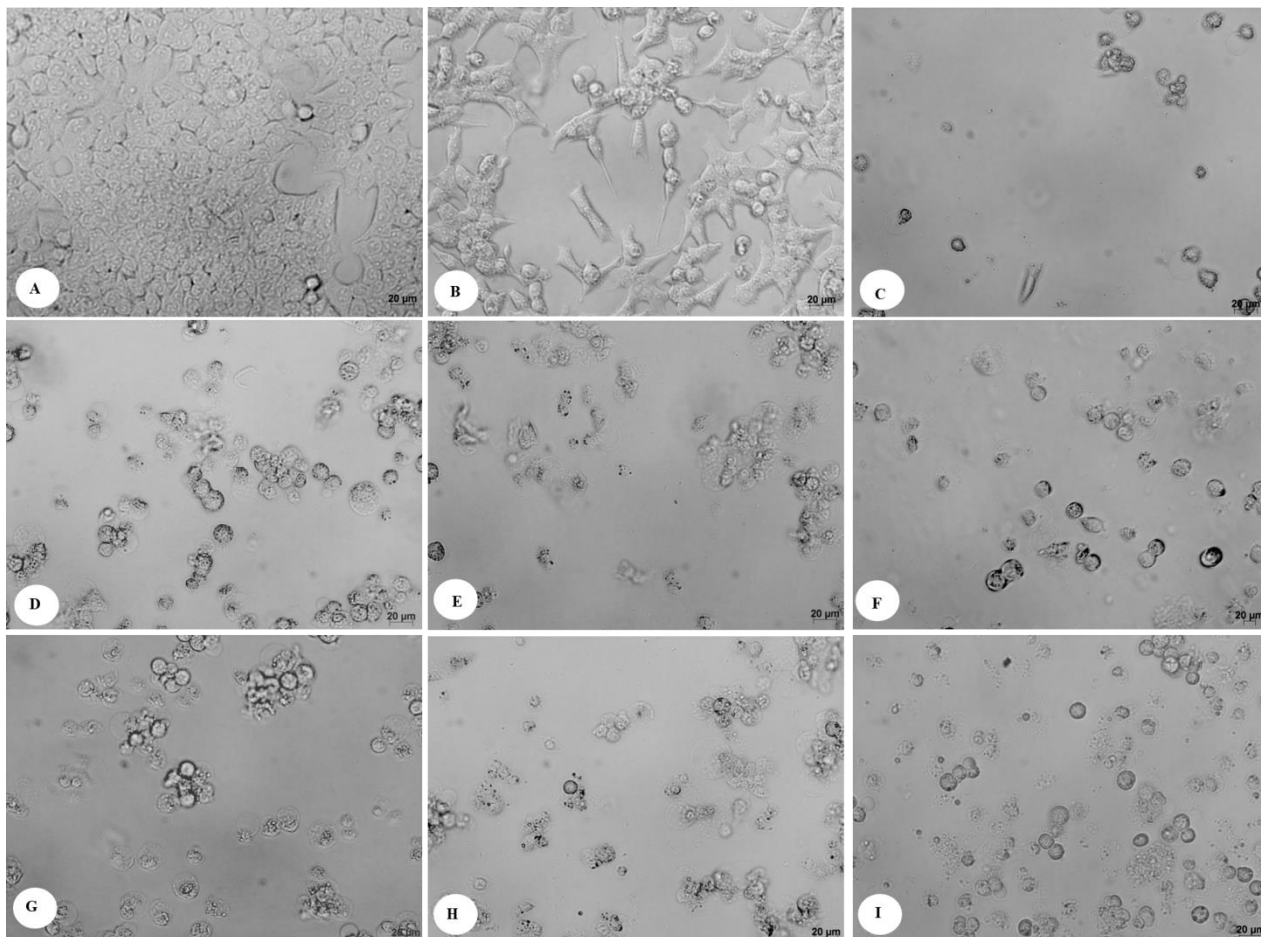
Figura 30. Vesículas lipossomais na linhagem HCT-116 tratada com LTJ 4,2 $\mu$ M no tempo de 24h, ampliação da figura 29H.



Fonte: Autoria própria (2017).

Após 48 horas de exposição observou-se uma potencialização dos efeitos previamente observados em 24 h, havendo uma redução ainda maior no número de células, observação de células desagregadas, turgência e aumento de debris em campo claro (Figura 31).

Figura 31. Células HCT116 cultivadas e tratadas com tambjaminsas livres e encapsuladas por 48h de tratamento. Microscopia óptica campo claro, aumento de 20x. (A) Controle negativo, (B) Prodigiosina 1,0  $\mu\text{M}$ , (C) Doxorubicina 0,3  $\mu\text{M}$ , (D) TI 2,5  $\mu\text{M}$ , (E) TI 5,0  $\mu\text{M}$ , (F) TI 5,0  $\mu\text{M}$ , (G) TJ 2,8  $\mu\text{M}$ , (H) TJ 4,2  $\mu\text{M}$ , (I) TJ 4,2  $\mu\text{M}$ .

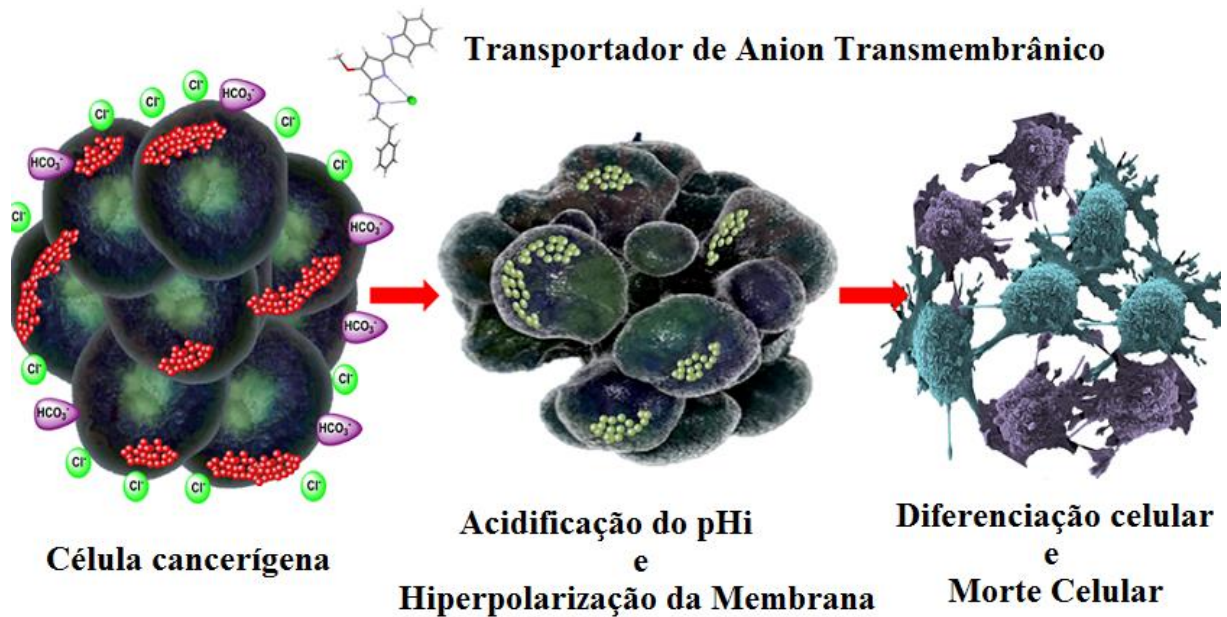


Fonte: Autoria própria (2017).

Outro achado, foi que as células tratadas com as Tambjaminsas, especialmente as não encapsuladas, parecem alterar o pH citoplasmático dessas células, tornando-as mais ácidas e, por tanto, aumentando a afinidade pelo corante azul (Dados não mostrados). Essa mudança de pH pode estar relacionadas a capacidade dos alcalóides tripirrólicos de modular o pH intracelular como observado no grupo das prodigiosinas (BLACKMAN; LI, 1994). O processo de modulação do pH por esses compostos em células cancerígenas ocorre através da modulação do transportador de ânion transmembrânico, causando uma acidificação, com consequente hiperpolarização da membrana e morte celular (Figura 32)



Figura 32. Processo de modulação do pH por esses compostos em células cancerígenas ocorre através da modulação do transportador de ânion transmembrânico.

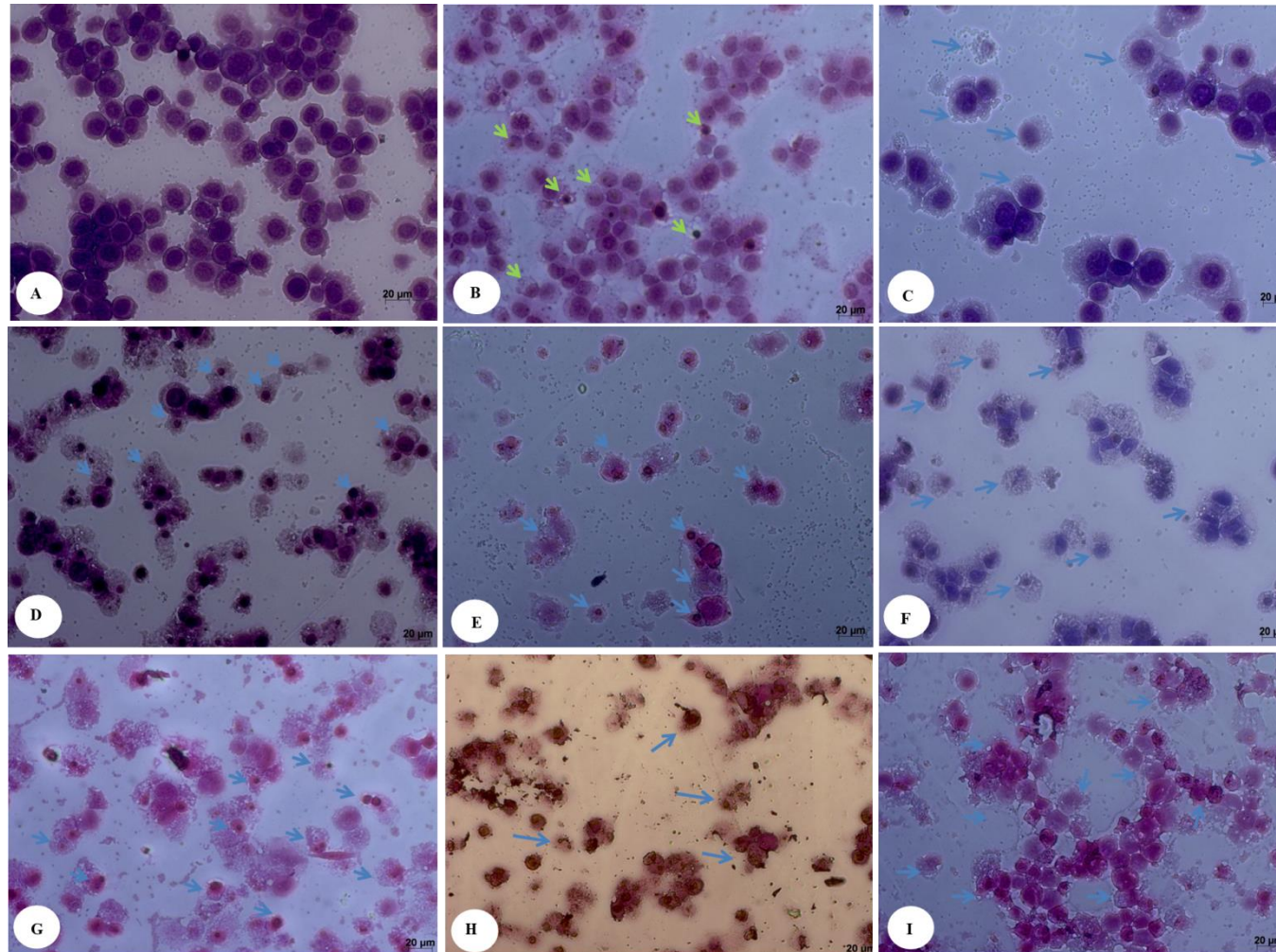


Fonte: Adaptado de Soto-Cerrato et al. (2015).

Após 48 horas de tratamento foi possível observar aumento do número com tumefação, formação de *blebs*, extravasamento nuclear, dissolução da cromatina, picnose e vacuolização (Figura 33). O aumento da percepção dessas características indica que a ação desses compostos iniciou-se em 24h, mas que, os compostos ainda tem sua ação continuada no tempo de 48h. Os efeitos desses compostos e dos sistemas lipossomais ao longo do tempo foi analisado no ensaio posterior, de avaliação em tempo real da proliferação celular, por meio do sistema XCelligence®.

Avaliação dos efeitos desses compostos sobre a morfologia celular também foi realizado por coloração direta de cultivos tratados em lamínulas circulares. O mesmo padrão de efeito foi observado através desse ensaio (Dados não mostrados).

Figura 33. Células HCT116 cultivadas e tratadas com tambjamins livres e encapsuladas por 48h de tratamento. Microscopia óptica a partir de coloração panótipo rápido, aumento de 20x. (A) Controle negativo, (B) Prodigiosina 1,0  $\mu\text{M}$ , (C) Doxorubicina 0,3  $\mu\text{M}$ , (D) TI 2,5  $\mu\text{M}$ , (E) TI 5,0  $\mu\text{M}$ , (F) LTI 5,0  $\mu\text{M}$ , (G) TJ 2,8  $\mu\text{M}$ , (H) TJ 4,2  $\mu\text{M}$ , (I) LTJ 4,2  $\mu\text{M}$ . As laminulas foram analisadas por microscopia óptica no aumento de 20x. As setas indicam os aspectos apoptóticos observados. Seta branca indica dissolução da cromatina, azul (picnose), cinza (tumefação), rosa (necrose), amarela (vacuolização), vermelha (*blebs*) e verde (restos celulares).



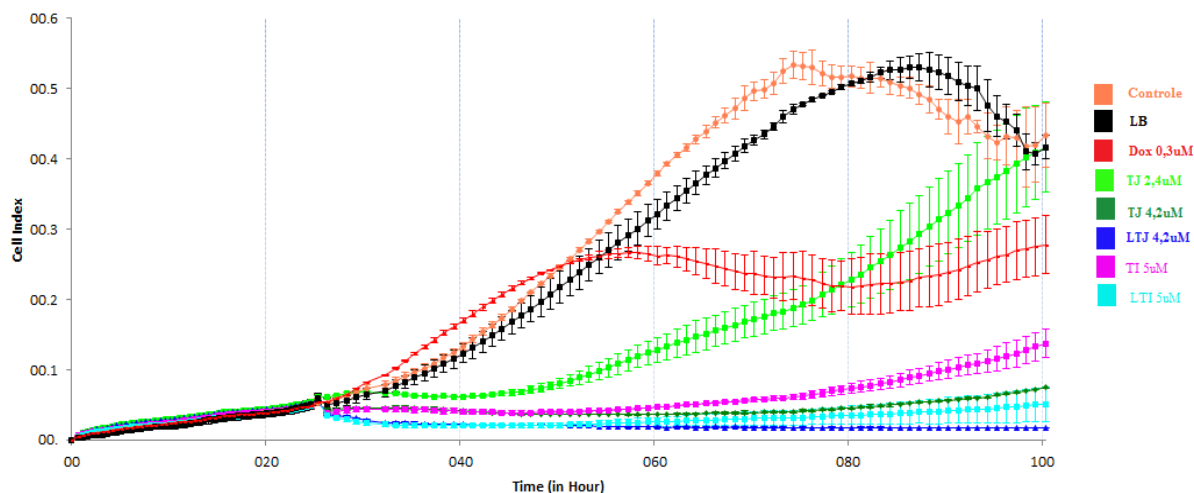
Fonte: Autoria própria (2017).

### **5.7 Monitoramento dinâmico da proliferação e viabilidade celular em tempo real- Xcelligence System**

Ao analisar o efeito antiproliferativo de diferentes doses de TJ livre (2,8 e 4,2  $\mu\text{M}$ ), TJ livre (5,0  $\mu\text{M}$ ) e encapsuladas LTJ (4,2  $\mu\text{M}$ ) e LTI (5,0  $\mu\text{M}$ ), 5000 células/poços foram preparadas e utilizadas no ensaio xCELLigence (Figura 30). Com essa análise foi observado que houve diminuição dos valores do índice celular dependente da concentração, para a Tambjamina TJ. Embora a dose testada entre a droga livre (Verde escuro) e a encapsulada (Azul) ter sido a mesma, esta última teve um efeito citotóxico mais prolongado, não apresentando inclinação de retorno do crescimento durante todo o tempo avaliado (Figura 34) observado na droga livre. Entre as concentrações de 2,8 e 4,2  $\mu\text{M}$  de TJ na forma livre foram causados efeito citotóxico estatisticamente significativo se compararmos ao controle negativo, tendo sido observado que na concentração de 2,8  $\mu\text{M}$  no início do teste houve uma diminuição significativa no número de células, porém com aproximadamente 50 horas de exposição as células retomam o crescimento. A tambjamina I apresentou o mesmo perfil entre a droga livre (Rosa) e encapsulada (Azul piscina), na concentração testada (5 $\mu\text{M}$ ). Observou-se que as substâncias iniciam sua ação após 24 horas incubação, dados que corroboram com o teste de SRB (Figura 26), embora a redução do número de células tenha sido bem evidenciada na redução do índice celular, este fato pode estar relacionado a menor quantidade de células utilizadas para a realização desse ensaio, que pode potencializar o efeito do composto, quando consideramos número absoluto de células.

Em alguns casos a droga encapsulada induz uma resposta de morte celular mais lenta, como observado por Caviglia et al. (2015), ao avaliar o efeito citotóxico de oxaliplatina livre (OX) e encapsulada em lipossomas verificou uma liberação mais lenta da droga que pode estar relacionada, possivelmente, a clivagem incompleta dos peptídeos PEGilados e, assim, uma redução da degradação dos lipossomas. Porém, Hasan et. al. (2014) encontrou que a droga encapsulada aumenta significativamente a citotoxicidade das células cancerosas quando comparada a forma livre, avaliando a atividade antitumoral da curcumina lipossomal *in vitro* em células de câncer de mama (MCF7).

Figura 34. Efeito antiproliferativo de diferentes das doses livre das tambjamins I e J livres e encapsulada realizadas através do ensaio xCELLigence.



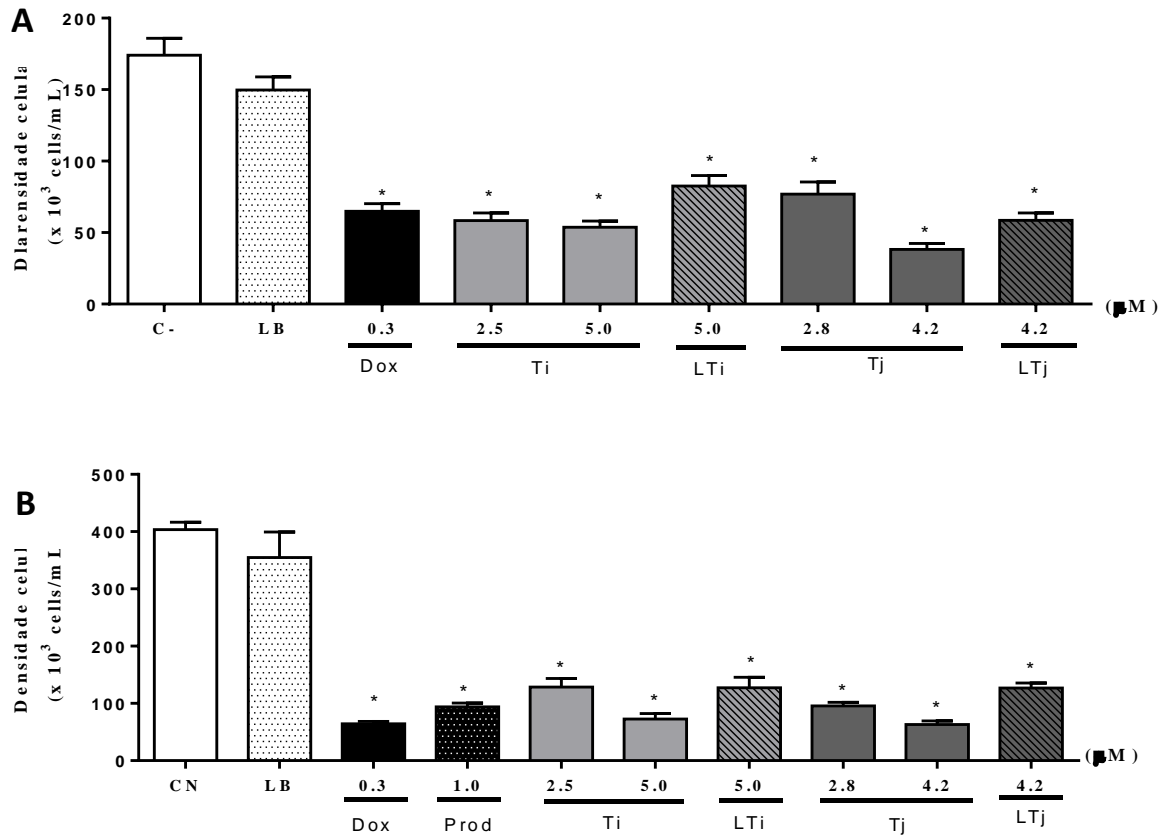
Fonte: Autoria própria (2017).

## 5.8 Citometria de fluxo

Utilizando o citômetro de fluxo foi possível avaliar a proliferação celular (densidade de células), integridade da membrana, ciclo e morte celular em linhagem HCT-116, após 24 e 48 horas de tratamento com Tambjamins livres e encapsuladas em lipossomas. Além disso, foi avaliado o potencial transmembrânico mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) e avaliação da fosforilação do H<sub>2</sub>Ax.

Ao analisar a densidade de células observou-se que as Tambjamins apresentaram um acentuado potencial antiproliferativo, pois houve diminuição no número de células após tratamento com 24 e 48 horas em todas as concentrações de testadas tanto na forma livre como lipossomal, fato que já havia sido evidenciado nos ensaios anteriores por Nepomuceno (2012) em células HL-60 que após 24 h de incubação com as tambjamins I e J, observou a redução no número de células viáveis de 20,84 % e 36,17 %, respectivamente, na concentração de 0,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Enquanto que na concentração de 0,6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , a redução da viabilidade celular foi significativamente superior com valores de 49,27 % e 59,94 % para Tambjamins I e J, respectivamente. No presente trabalho, somente os lipossomas sem droga (LB) não apresentaram diferença significativa no número total de células em relação ao controle negativo (Figura 35).

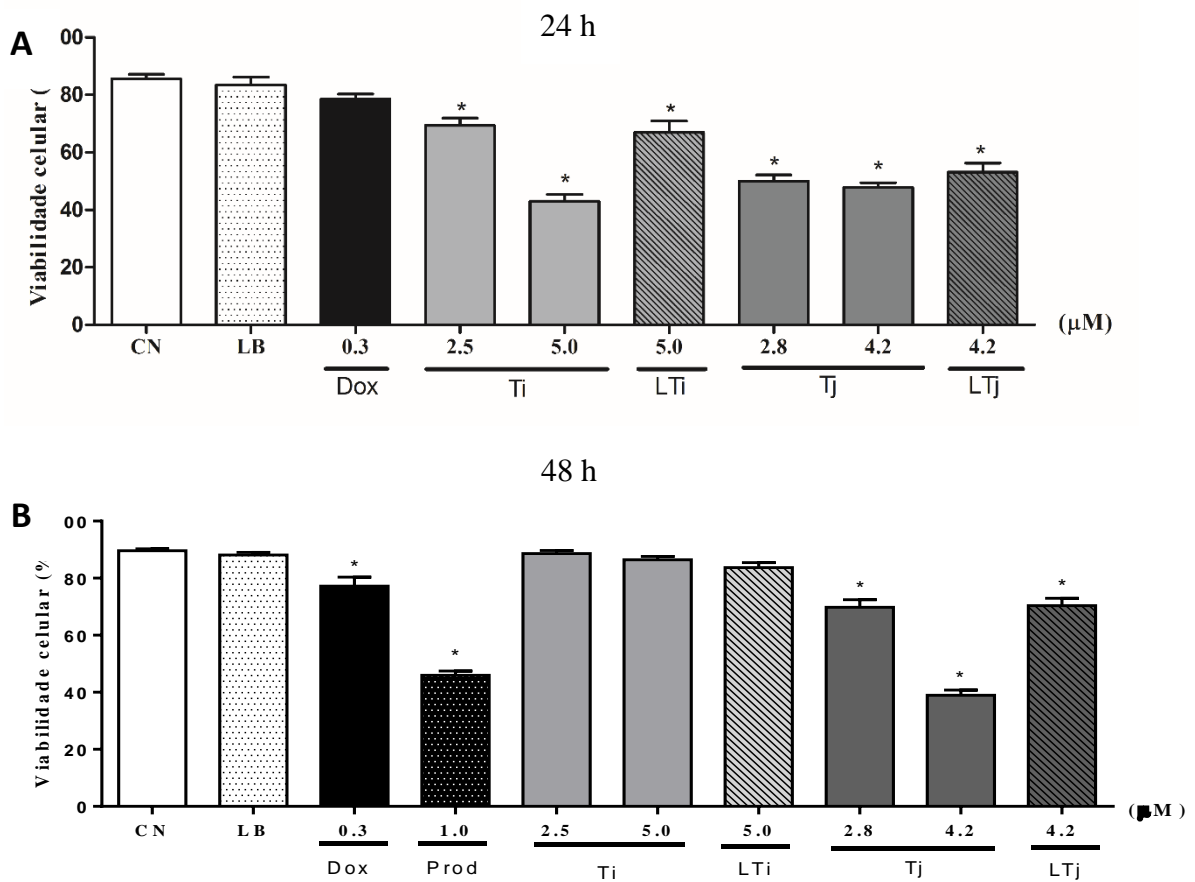
Figura 35. Análises por citometria de fluxo de números absolutos de células de HCT116. A experimentação foi realizada (A) 24 h (B) 48 h após a incubação com tambjamines livres (TI e TJ) e nanoencapsuladas com partículas de lipossomas (LTI e LTJ), Doxorubicina (24 e 48h) e Prodigisina (48 h) foram usado como controle positivo. Os gráficos mostram média  $\pm$  SE. \* $p < 0,05$  ANOVA seguido do pós teste Tukey.



Fonte: Autoria própria (2017).

Avaliando a integridade de membrana das células tratadas com 24 horas a doxorubicina e as células tratadas com os lipossomas placebo foram os únicos tratamentos que não apresentaram diferença estatística ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao controle negativo. A tambjamina I nas concentrações de 2,5 e 5  $\mu$ M apresentaram 69,36 e 43,03% de células com membranas íntegras, respectivamente, enquanto que a TJ 2,4 e 4,2  $\mu$ M foram 50,01 e 47,76%, respectivamente. As LTI e a LTJ também apresentaram uma diminuição do percentual de células com a membrana íntegra, 66,94 e 53,10%, respectivamente (Figura 36). Nepomuceno (2012) em avaliando com 24 h as células tratadas com as Tambjamins I e J observaram também que as substâncias afetaram de modo significativo a integridade da membrana celular na concentração de 0,6  $\mu$ g/mL apresentando valores de  $94,14 \pm 0,58$  % e  $87,03 \pm 2,57$  %, respectivamente.

Figura 36. Análises da viabilidade celular por citometria de fluxo em linhagem de HCT116 tratadas com tambjamins livre e encapsulada.. Experimento (A) 24h e (B) 48 h após incubação com Tambjamins livres (Ti e Tj) e nanoencapsuladas em partículas de lipossomas (LTi e LTj), Doxorubicina (24 e 48h) e Prodigiosina (48h) foram utilizados como controle positivo. Os gráficos mostram média  $\pm$  SE. \* $p < 0,05$  ANOVA seguido do pós teste Tukey.



Fonte: Autoria própria (2017).

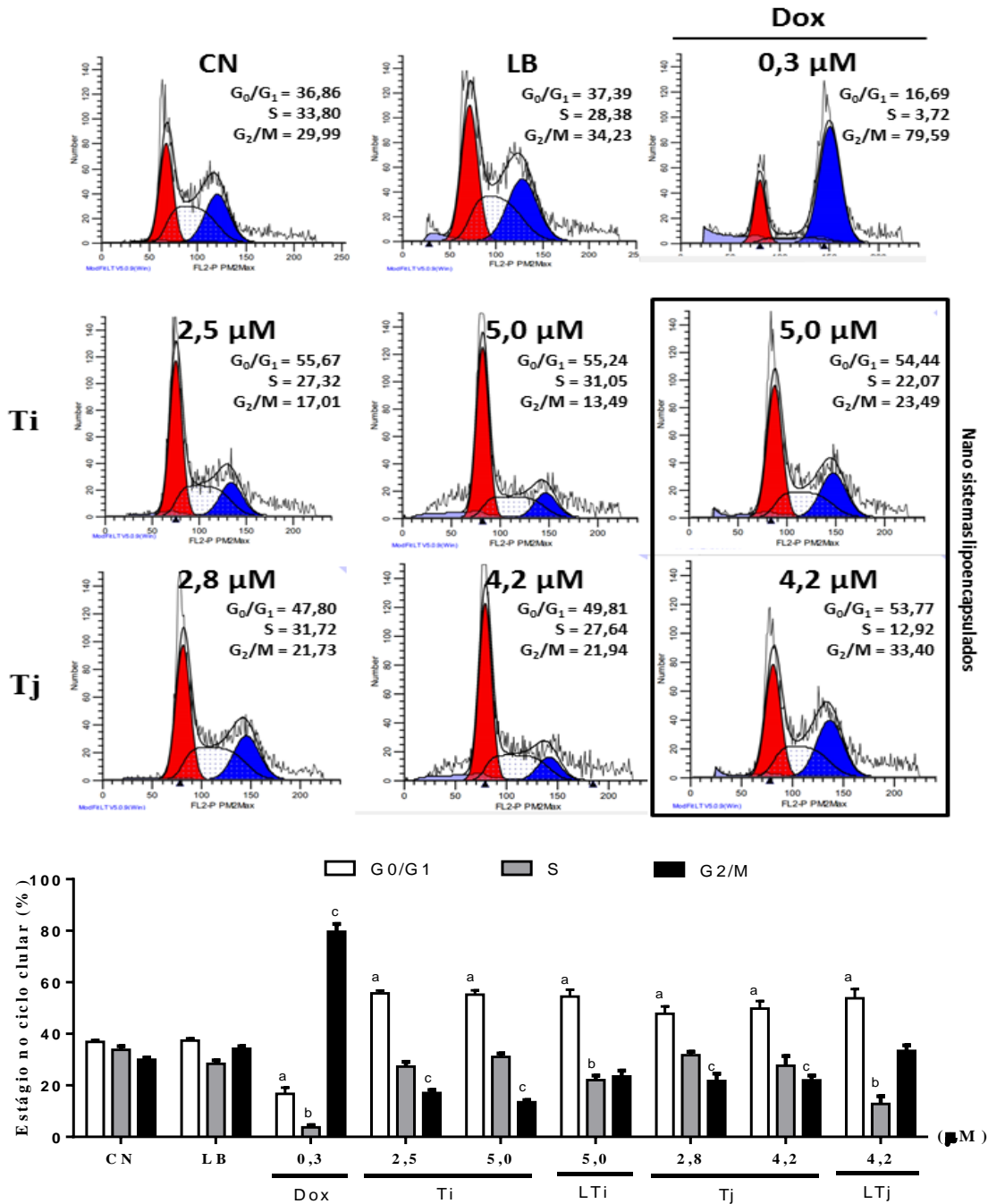
Não foi observado o perfil de alteração na viabilidade das células tratadas com a Tambjamina I livre, nas duas concentrações testadas, e encapsuladas, após 48 horas de tratamento. Este fato pode estar relacionado ao tempo de ação desse composto. Como observado no ensaio do Xcelligence após um determinado tempo de tratamento (50 h) a uma leve retomada do crescimento celular, possivelmente das células que permaneceram viáveis, fato que não foi observado para nenhum dos compostos encapsulados (Figura 34).

Ao avaliar os demais tratamentos como doxorrubicina 0,3  $\mu\text{M}$  (77,17%), prodigiosina 1  $\mu\text{M}$  (61,43%), TJ 2,8  $\mu\text{M}$  (69,82%), 4,2  $\mu\text{M}$  (38,98%) e LTJ 4,2  $\mu\text{M}$  (70,40%), no tempo de 48h a diminuição significativa do número de células viáveis (Figura 35) e da viabilidade celular (Figura 36) foi observada para todos esses compostos quando comparados ao controle negativo (89,63%) ( $p < 0,05$ ).

O tempo de ação da substância TJ parece ser mais prolongado do que a droga TI, contudo o composto TI parece apresentar a início atividade citotóxica em tempo inferior 24 horas de tratamento. Ambos os compostos apresentaram mudanças no tamanho e na granulosidade das células tratada. Com 48 h de tratamento ambos os compostos reduziram a densidade celular nas diferentes concentrações testadas quando comparado com o controle negativo. Trabalhos com compostos citotóxicos comumente avaliam parâmetros como densidade e viabilidade celular por citometria de fluxo avaliando a relação entre a redução do número de células e redução da viabilidade celular. Trabalhos mostram que existe relação direta entre o efeito dos compostos e seu tempo de exposição. Lupertz et al. (2010) tratando a HCT-116 durante 48 h com trachelogenina observou redução do número de células, mas sem diminuição da viabilidade celular. Fato observado com o composto TI, tendo havido diferença significativa na proliferação com 24 h e 48h, mas não apresentou diferença, com 48 horas, em relação à viabilidade celular. Este fato pode estar relacionado ao seu mecanismo de morte. Corroborando com os achados na morfologia celular tanto observando as placas antes de serem coradas como nas lâminas coradas. Nas placas foram observados bastantes restos celulares, poucas células aderidas a placas e com sua morfologia celular preservada, enquanto que nas lâminas após o processo de coração com panótipo rápido foi observado uma grande diminuição do número de células, vacuolização, além do aumento do tamanho dessas células e aparecimento de picnose (Figuras 28, 29, 31 e 33) o que sugere processo de apoptose e/ou necrose.

Ao analisar ciclo celular, quantificou-se o conteúdo de DNA nuclear inerente a cada fase do ciclo celular. A figura 37 mostra que após 24 horas ocorreu aumento da população de células paradas em G0/G1 em todos os tratamentos.

Figura 37. Efeito de diferentes Tambjamins livres (TI e TJ) e nanossistema de Tambjamins (LTI e LTJ) sob o ciclo celular realizado após 24 h de incubação na linhagem HCT116. Doxorubicina foi utilizado como controle positivo. Os gráficos mostram média ± SE. <sup>a,b,c</sup>p<0,05 ANOVA seguido do pós teste Tukey. <sup>a</sup>Fase G0/G1, <sup>b</sup>Fase S e <sup>c</sup>FaseG2/M.



Font

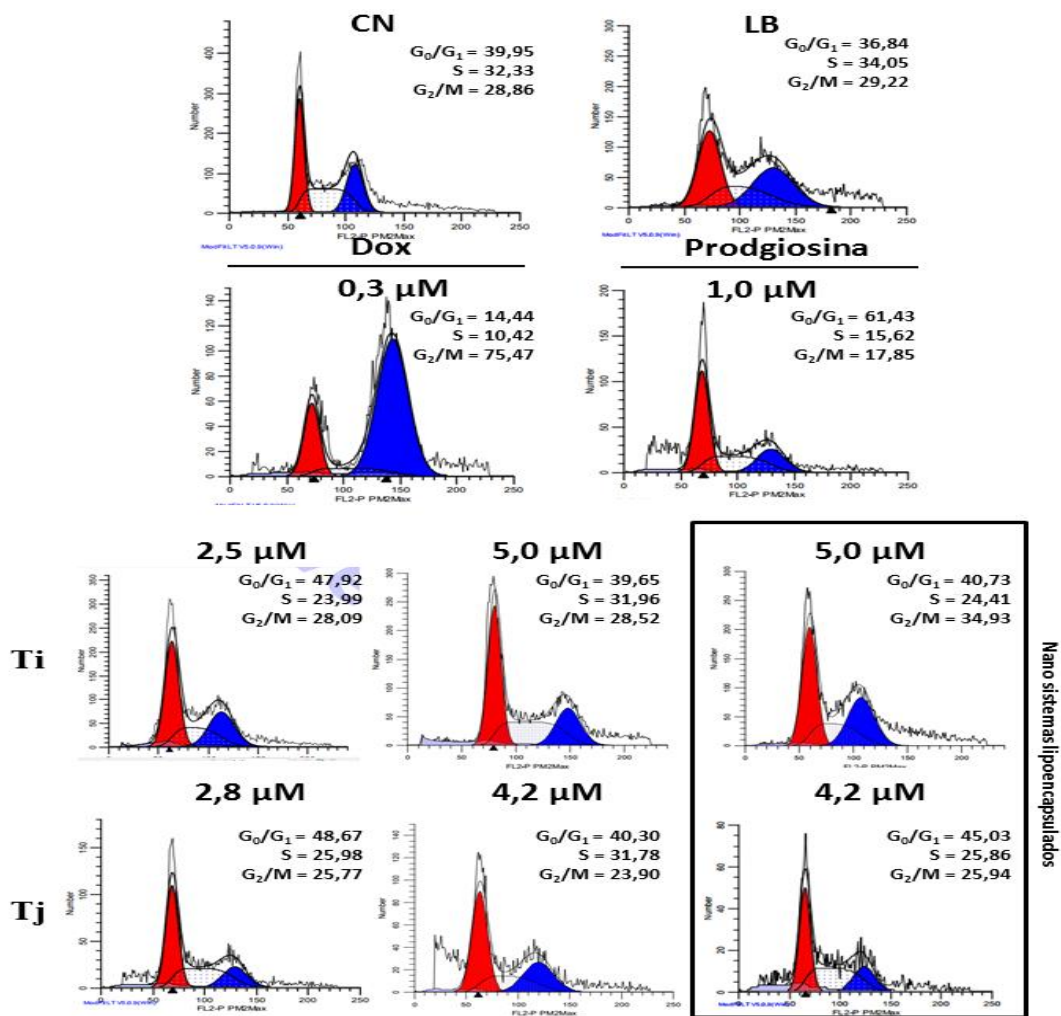
e: Autoria própria (2017).

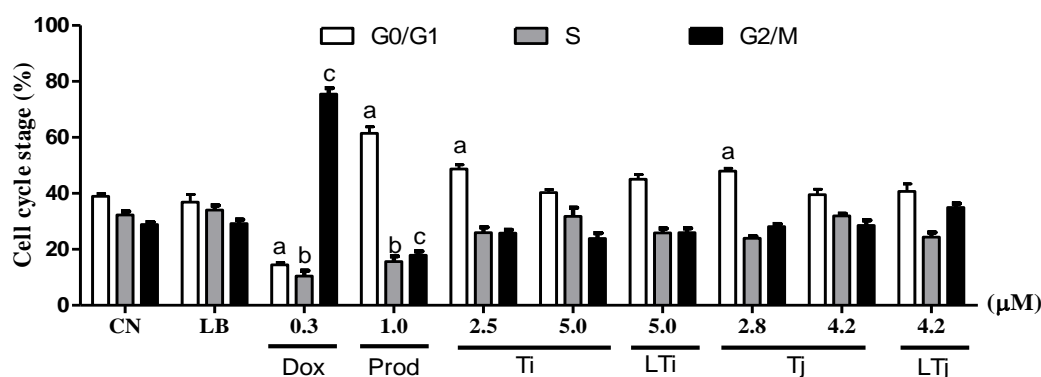
No tempo de 48 horas (Figura 38) tanto em TI (47,98%) como em TJ (48,67%) nas menores concentrações, assim como no controle positivo com a prodigiosina (61,43%) também apresentaram o mesmo perfil. Ao avaliar a fase G2/M somente a Dox 0,3μM, como esperado, apresentou um aumento acentuado da população de células nessa fase de 79,59 e



75,47% contra 29,99 e 28,86% apresentados no controle negativo no tempo de 24 e 48 horas, respectivamente. Na fase S a LTI, LTJ e Dox apresentaram diminuição do número de células nessa fase com 22,07, 12,88 e 3,72% contra 33,80% encontrado no controle negativo.

Figura 38. Efeito de diferentes Tambjamines livres (TI e TJ) e nanossistemas de Tambjamins (LTI e LTJ) sob o ciclo celular realizado após 48 horas de incubação na linhagem HCT116. Doxorubicina e Prodigiosina foram utilizadas como controle positivo. Os gráficos mostram média ± SE. <sup>a,b,c</sup>p<0,05 ANOVA seguido do pós teste Tukey. <sup>a</sup>Fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, <sup>b</sup>Fase S e <sup>c</sup>Fase G<sub>2</sub>/M.

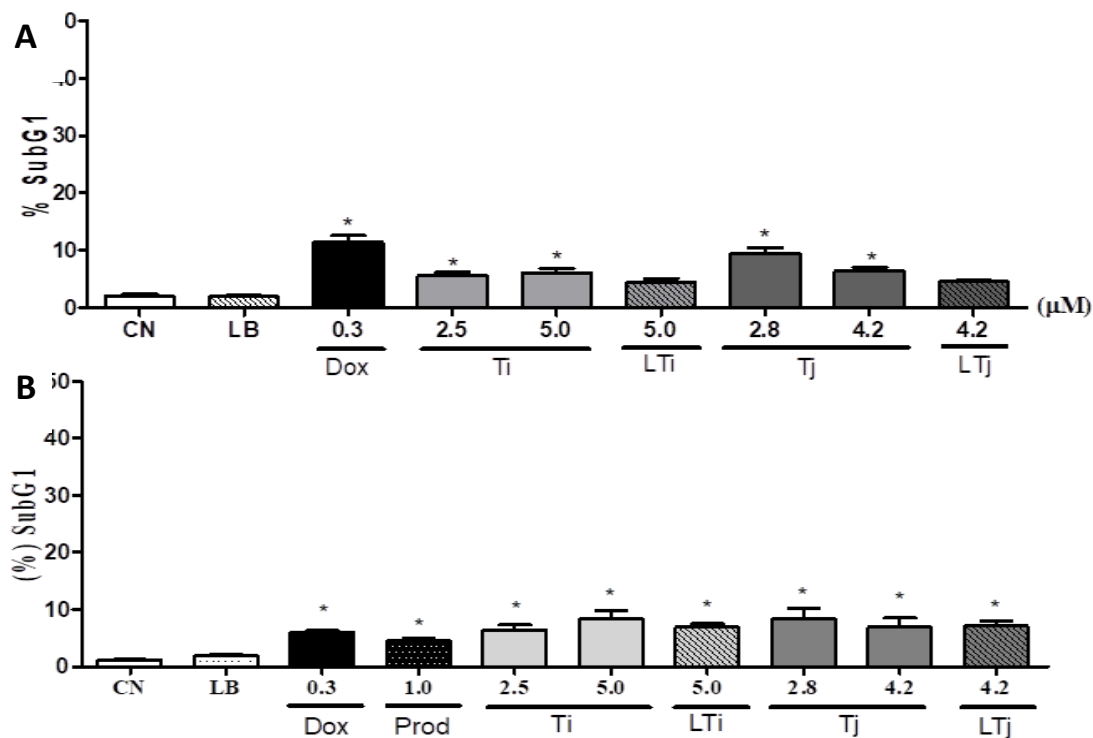




Fonte: Autoria própria (2017).

Ao analisar fragmentação de DNA, ainda durando o ensaio de ciclo celular com 24 horas de tratamento (Figura 39A) foi possível confirmar que as células tratadas com as substâncias livres apresentaram um aumento discreto do número de células com fragmentação do DNA, somente as nanopartículas LTI e LTJ não apresentaram diferença em relação ao controle negativo. Contudo, com 48 horas de tratamento (Figura 39B) tanto as substâncias encapsuladas com as tambjaminsas livres apresentaram também um aumento discreto, porém significativo na fase sub-G1 quando comparado com o controle (1,16%) sendo o percentual de 6,87 e 7,1 (LTI e LTJ); 6,49 e 8,30; 8,29 e 6,95 para TI e TJ na menor e maior concentração testada, respectivamente (Figura 39). Trabalho realizado por Nepomuceno (2012) analisando as tambjaminsas (I e J) nos tempos de 3, 6, 12 e 24 h mostraram que estas não foram capazes de alterar as fases do ciclo celular de células HL-60 nas concentrações testadas (0,3 e 0,6 μg/mL), porém, os compostos foram capazes de induzir fragmentação do DNA celular com o aumento da concentração e do tempo de exposição.

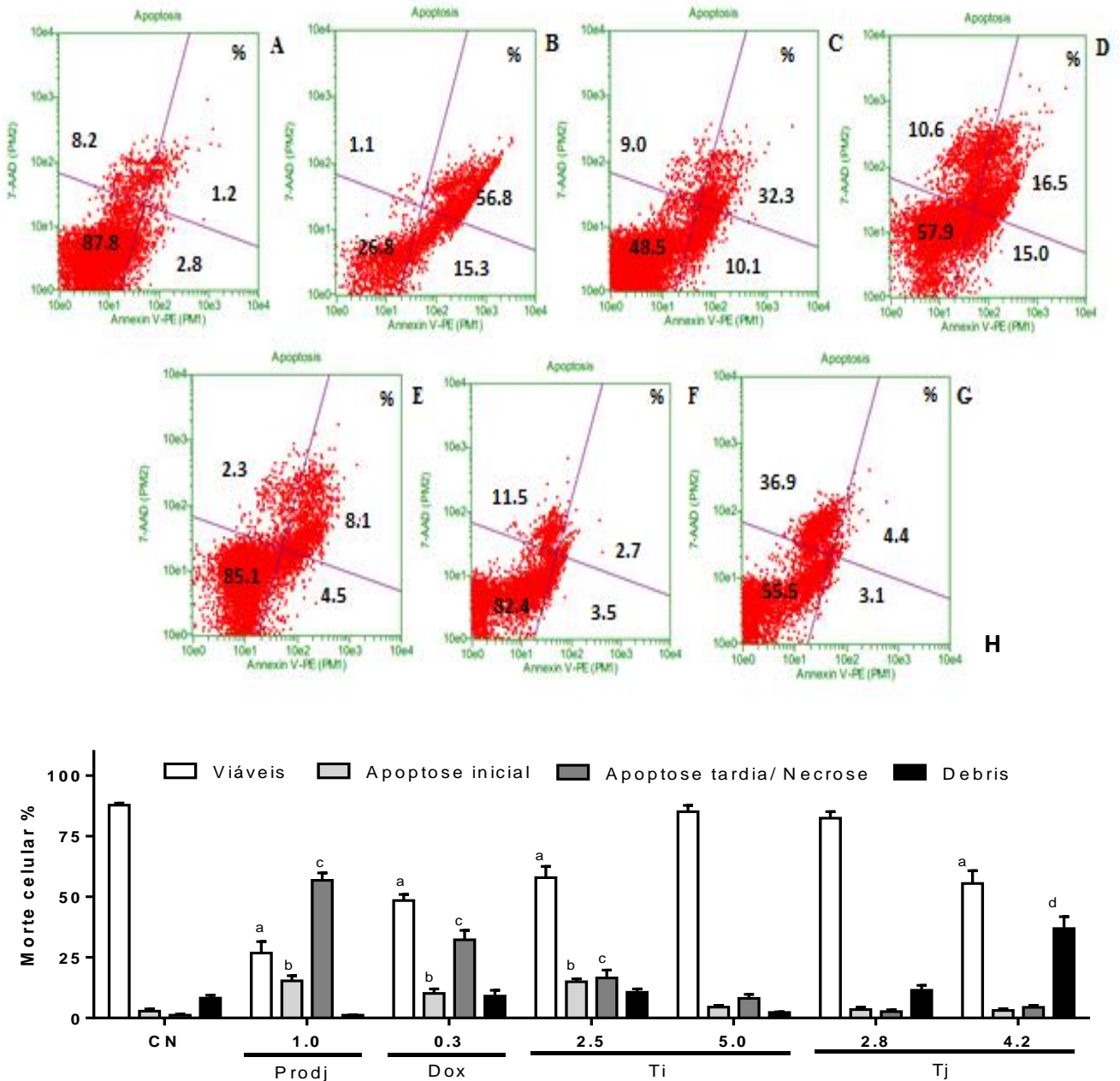
Figura 39. Dano de DNA inferido por níveis de subG1 causados pelas Tambjaminsas (TI e TJ) e Tambjaminsas nanoencapsuladas (LTI e LTJ) na linhagem HCT116 após 24h (A) e 48h (B) de incubação. Os gráficos mostram média  $\pm$  SE. \* $p < 0,05$  ANOVA seguido do pós teste Tukey.



Fonte: Autoria própria (2017).

Outro ensaio realizado por citometria de fluxo foi o ensaio de morte celular por Anexina-V que avalia o padrão de morte celular através da externalização da fosfatidilserina que é um fosfolípido que se encontra na superfície interna da membrana plasmática e tem sua externalização correlacionada a uma das primeiras alterações ocorridas na via de morte pelo processo de apoptose. Assim, após a exposição com os compostos destaca-se a doxorrubicina (10,14 e 32,31%), Prodigiosina (15,30 e 56,80%) e a substância TI 2,5  $\mu$ M (14,97 e 15,50%) apresentaram diferença significativa ao controle negativo (2,8 e 1,17%) ao avaliar a porcentagem de células em apoptose inicial e tardia, respectivamente. A substância TJ 4,8  $\mu$ M apresentou diferença no número de células viáveis e foi o único tratamento que apresentou número significativo de debris quando comparado ao controle negativo (Figura 40). Fato que também pode estar relacionado ao tempo que a substância começa agir, podendo este aumento de debris estar relacionado à morte por necrose.

Figura 40. Efeito de diferentes Tambjamins (TI e TJ) sobre a morte celular realizada após 48 horas de incubação em linhagens de HCT116. Quadstats mostram a distribuição da população celular após a coloração com ANEXIN V®. Prodigiosina e Doxorubicina foram utilizados como controle positivo (A) Controle Negativo. (B) Prodigiosina, (C) Doxorubicina, (D) TI (2,5 µM) (E) TI (5,0 µM), (F) TJ (2,8 µM), (G) TJ (4,2 uM). (H) Os gráficos mostram média ± SE. <sup>a,b,c,d</sup> p<0,05 ANOVA seguido do pós teste Tukey. <sup>a</sup>Viáveis, <sup>b</sup>Apoptose inicial, <sup>c</sup>Apoptose tardia e <sup>d</sup>Debris.

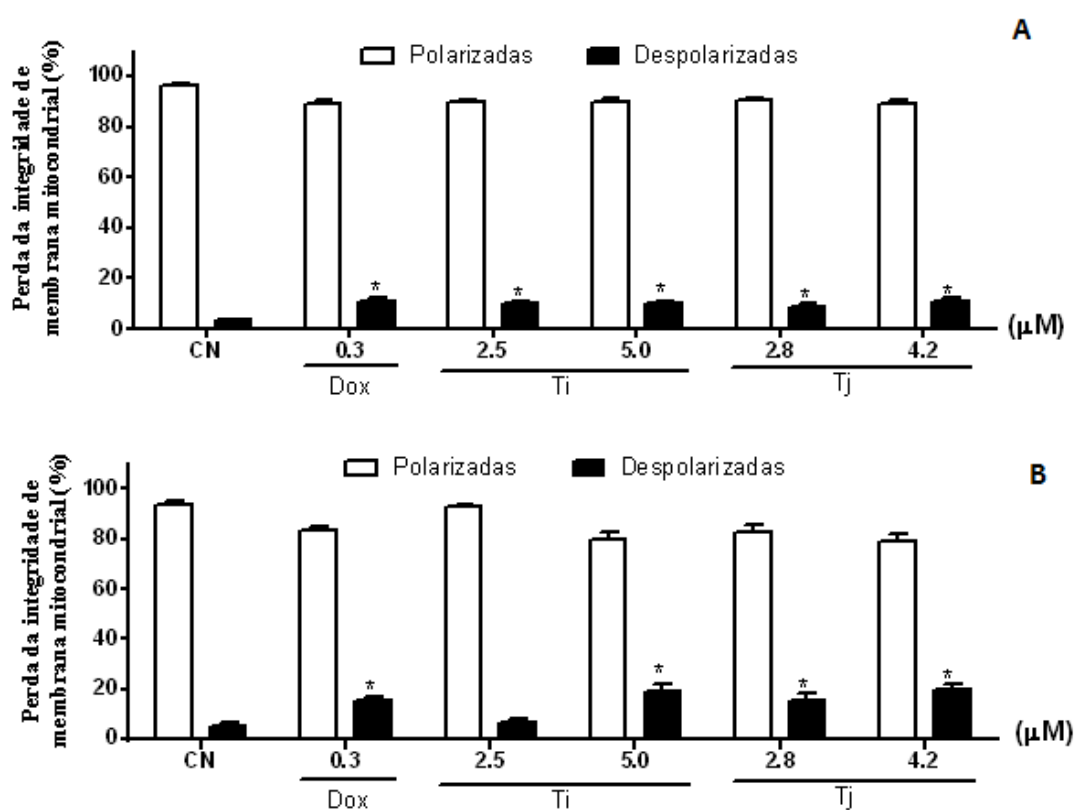


Fonte: Autoria própria (2017).

Para a avaliação da interferência das vias mitocondriais no processo de morte celular utilizou-se a Rodamina 123 que permite, por citometria de fluxo, a detecção da redução do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ). A detecção de no potencial transmembrânico pode ser uma ferramenta para avaliação indireta da morte celular pela ativação da via intrínseca da apoptose (ORRENIUS, 2004; HAN et al., 2007).

No tempo de 24 h, observou-se tanto a Tambjamina I como a J apresentaram discreta despolarização mitocondrial quando comparado ao controle negativo ( $3,26 \pm 0,4\%$ ) a TI ( $2,5$  e  $5\mu\text{M}$ ) apresentou  $9,7\%$  ( $\pm 0,7$ ) e  $9,6\%$  ( $\pm 1,1$ ), enquanto que a TJ ( $2,4$  e  $4,2\mu\text{M}$ ) apresentou  $8,8\%$  ( $1,1$ ) e  $10,57\%$  ( $1,6$ ) (Figura 41).

Figura 41. Efeito de diferentes tambjamins (TI e TJ) sobreo potencial transmembrânico mitocondrial após 24h (A) e 48h (B) de incubação em linhagens de HCT116. Doxorubicina foi utilizada como controle positivo. Os gráficos mostram média  $\pm$  SE. \* $p < 0,05$  ANOVA seguido do pós teste Tukey.



Fonte: Autoria própria (2017).

Após 48 horas de tratamento foi observado que as células HCT-116 tratadas continuaram sofrendo despolarização de membrana (Figura 41), em que o controle positivo

doxorubicina (0,3  $\mu\text{M}$ ) apresentou 15,76%, enquanto que a TI 5  $\mu\text{M}$  foi 19% e TJ (2,8 e 4,2  $\mu\text{M}$ ) apresentaram 15,52 e 19,47% de despolarização, respectivamente. Somente a substância TI 2,5  $\mu\text{M}$  (6,9%) não apresentou diferença estatística com relação à despolarização da membrana mitocondrial quando comparada ao controle negativo (5%). Este resultado indica que a via intrínseca é uma possível via de morte célula promovida pelas Tambjamins, pois mudanças no potencial transmembrânico ( $\Delta\Psi\text{m}$ ) é um dos primeiros eventos que ocorrem após indução de apoptose, em especial na via intrínseca, sendo, portanto um modo indireto de avaliar a ativação dessa via (ORRENIUS, 2004; HAN et al., 2007). Uma das causas dessa despolarização pode ser relacionada ao efluxo de prótons ( $\text{H}^+$ ) através dos poros formados na membrana externa quando proteínas pró-apoptóticas são liberadas do espaço intramembranar (HENGARTNER, 2000). Esse padrão de morte também foi apresentado por Cavalcante et al. (2008), que ao avaliar células V79 (Fibroblastos de pulmão de *hamster* chinês), pelo método de coloração brometo de etídeo/laranja de acridina, após 24 horas de tratamento com a Tambjamina D foi observado efeito dose dependente no aparecimento de células com a cromatina condensada, núcleos fragmentados e aparência de corpos apoptóticos, na dose (4,8  $\mu\text{g/mL}$ ) foi observado uma maior porcentagem de células apoptóticas (73,32%) e células necróticas (9,7%).

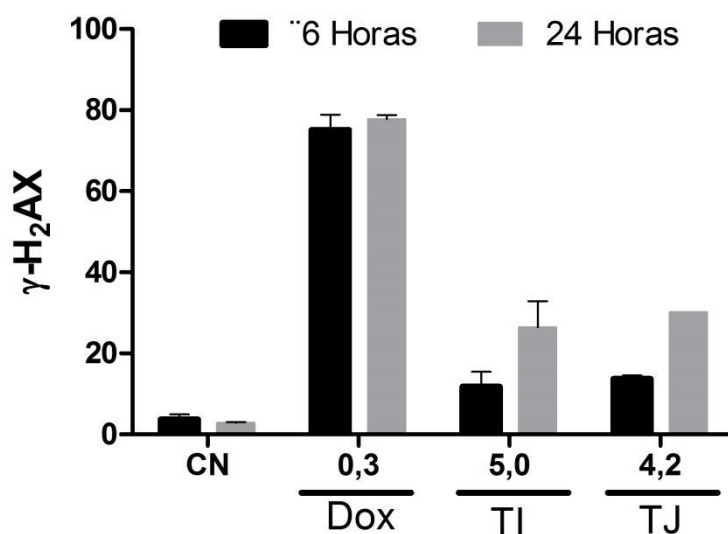
O presente trabalho apresentou um conjunto de achados dependente de concentração para ambos os compostos. Os resultados observados tanto na morfologia celular como pelos ensaios de morte celular indicam que há externalização da fosfatidilserina com marcação de 7AAD, indícios de apoptose inicial e tardia, respectivamente, com despolarização mitocondrial, além de aumentos nos níveis de subG1 proporcionais ao tempo de tratamento. Podendo o processo de morte estar relacionado a apoptose intrínseca ou um processo programado de necrose, necroptose.

### **5.9 Avaliação do dano no DNA: H2Ax, cometa e micronúcleo.**

A histona H2Ax é um membro da família histona H2A que se concentra em locais de ruptura, sendo assim, a avaliação da sua fosforilação é uma das primeiras respostas celulares à quebra da dupla fita do DNA. O número de quebra da dupla fita do DNA introduzidas é proporcional ao número de moléculas H2AX fosforiladas ( $\gamma\text{-H2AX}$ ) e à gravidade do dano (ROGAKOU et al., 1999). Além disso outro dado é que o aparecimento de H2AX fosforilada pode estar relacionado com a apoptose (ROGAKOU et al., 2000).

Ao avaliar as células HCT 116 tratadas com as Tambjaminsas (I e J) observou-se que as substâncias TI e TJ causaram fosforilação da H<sub>2</sub>AX nos tempos de 6h e 24 h nas concentrações de 5µM e 4,2 µM, respectivamente (Figura 42). Relacionando os danos de DNA aos dados encontrados pelos ensaios de morte celular, os compostos parecem causar apoptose, a partir de indução de dano de DNA.

Figura 42. Fosforilação de H2AX avaliado pelo kit FlowCelect™Histone H<sub>2</sub>A.X Phosphorylation Assay, após 6h e 24h de tratamentos com a Tambjamina I e Tambjamina J.



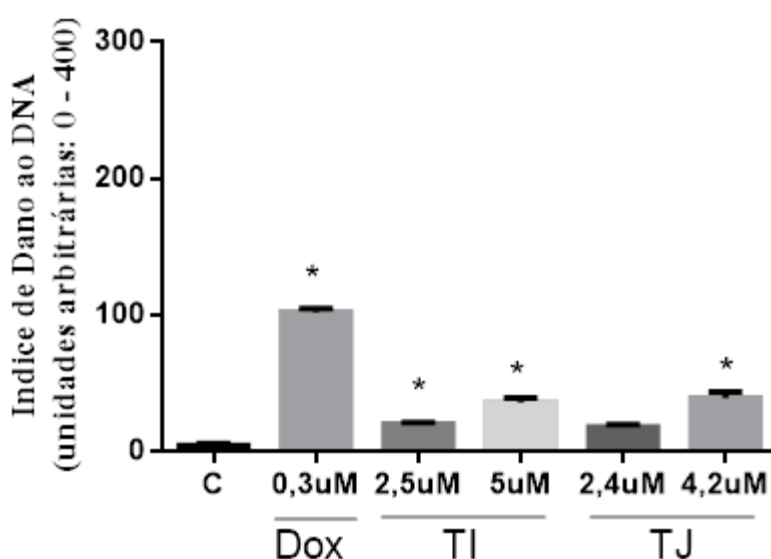
Fonte: Autoria própria (2017).

A substância TI apresentou uma concentração formada de H<sub>2</sub>AX de 11±2,61 e 26,5±4,5%, enquanto a TJ foi de 13±0,6 e 30,23±0,05% para 6 horas e 24 horas, respectivamente. Estudos realizados com células tratadas com a Prodigiosina 2 µM por 3 horas (substância da mesma família e que apresenta características semelhantes às Tambjaminsas), também produziram dano ao DNA genômico de células MCF7. Estudos prévios com a Tambjamina J, *in vivo*, demonstram que quando administrada na dose 20 mg/kg/dia em camundongos (NEPOMUCENO, 2012) nesta concentração o composto foi genotóxico e clastogênico, uma vez que induziu a quebra de fita dupla que representam umas das mais severas lesões ao DNA, devido à perda da continuidade cromossômica e à geração de fragmentos cromossômicos acêntricos (sem centrômero) que comprometem a segregação cromossômica durante a mitose (KAYE *et al.*, 2004).

O dano no DNA de células HCT-116 foi avaliado por meio do ensaio Cometa neutro e alcalino após 24 h de incubação. Os resultados indicam que as Tambjaminsas promoveram

dano significativo ( $p < 0,05$ ) no DNA em todas as concentrações testadas em relação ao controle negativo ( $ID = 4,5 \pm 1,33$ ). Os valores para o índice de dano (ID) no cometa neutro de TI, nas concentrações de 2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$ , foram  $20,25 \pm 1,16$  e  $36 \pm 3,28$ , enquanto a TJ (2,4 e 4,2  $\mu\text{M}$ ) apresentou  $18 \pm 1,8$  e  $39,25 \pm 4,37$ , respectivamente (Figura 43).

Figura 43. Índice de dano de DNA determinado pelo ensaio do cometa neutro em células de HCT116 tratadas com as Tambjaminsas I (2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$ ) e J (2,8 e 4,2  $\mu\text{M}$ ) após 24h de tratamento. Doxorubicina (0,3  $\mu\text{M}$ ) foi utilizado como controle positivo.  $*p < 0,05$  ANOVA seguido do pós teste de Tukey.

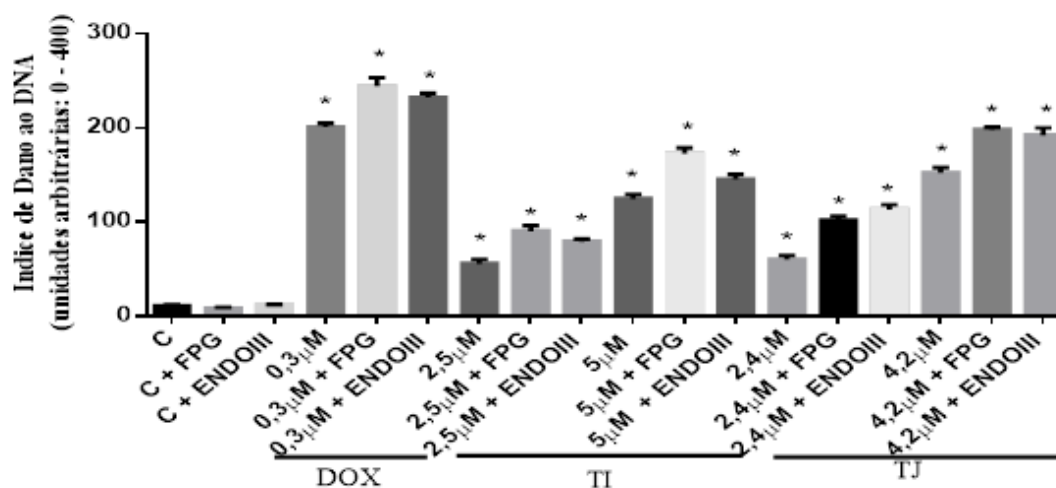


Fonte: Autoria Própria (2017).

Após incubação com as enzimas FGP e ENDOIII o ID das células tratadas com TI (2,5 $\mu\text{M}$ ) aumentou de  $55,62 \pm 4,56\%$  para  $90,12 \pm 5,64\%$  (FGP) e  $79 \pm 2,84\%$  (EndoIII). Enquanto com a concentração mais alta TI (5 $\mu\text{M}$ ) apresentou ID ainda mais elevados,  $124 \pm 4,5$  e, potencializados quando associado às enzimas o resultado foi FPG  $172,5 \pm 6,1\%$  e com a ENDOIII foi  $145,3 \pm 4,9\%$ . A Tambjamina J (2,4 e 4,2 $\mu\text{M}$ ) apresentou índices de dano de  $60,1 \pm 4,1\%$  e  $152 \pm 5,5\%$ . Foi possível observar que quando a substância foi associada à FGP os percentuais foram  $101 \pm 4,4\%$  e  $197 \pm 2,6\%$  e com a ENDOIII  $113 \pm 5,1\%$  e  $192 \pm 7,8\%$ , respectivamente para as concentrações crescentes testadas (Figura 44).



Figura 44. Índice de dano de DNA determinado pelo ensaio do cometa alcalino em células de HCT116 tratadas com as Tambjamins I (2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$ ) e J (2,8 e 4,2  $\mu\text{M}$ ) e em associação com as enzimas FPG e ENDOIII após 24h de tratamento. Doxorubicina (0,3  $\mu\text{M}$ ) foi utilizado como controle positivo. \* $p < 0,05$  ANOVA seguido do pós teste de Tukey.



Fonte: Autoria própria (2017).

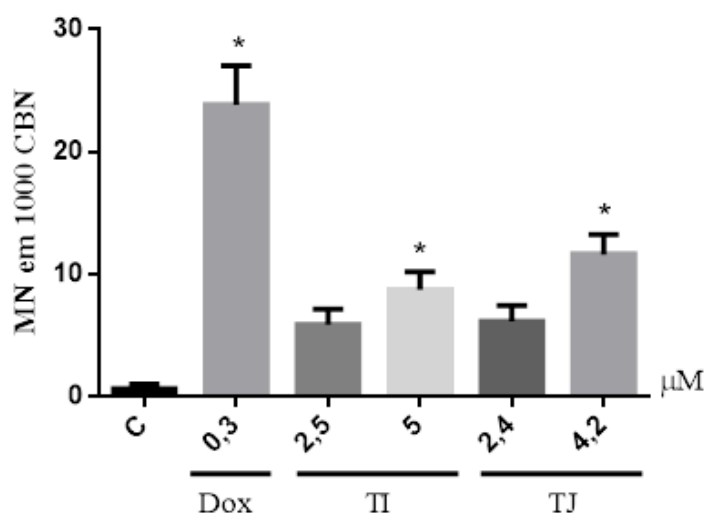
Os resultados obtidos através da realização dos ensaios de cometa alcalino (Figura 44) mostraram ainda que a célula HCT-116 tratadas com as Tambjamins obtiveram maiores valores de índices de dano e frequência de dano, quando comparado ao controle de forma significativa. Quando avaliamos o uso de enzimas (Endonucleases FPG e ENDO III) comparado com o ensaio do cometa convencional, os testes apresentaram aumento significativo de danos ao DNA nas células tratadas em relação aos controles.

Avaliando a formação de micronúcleos a Tambjamina I (2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$ ) e J (4,2  $\mu\text{M}$ ) induziram um decréscimo de aproximadamente de 8,6%, 15% e 12,5, respectivamente, na frequência de células HCT 116 binucleadas, enquanto que a Tambjamina J (2,4 $\mu\text{M}$ ) não apresentou diferença significativa quando comparadas ao controle (29,59%). Os resultados mostraram, ainda, que as células tratadas com as Tambjamins (I e J) nas maiores concentrações promovem um aumento de células micronucleadas 8,7 $\pm$ 1,4% e 11,2 $\pm$ 1,6%, respectivamente, quando comparadas ao controle negativo (0,66 $\pm$ 0,33). A doxorubicina apresentou 23 $\pm$ 3,1% de células micronucleadas (Figura 45).

Nepomuceno (2012) a análise do resultado do teste do Micronúcleo revelou que Trastuzumabe e Tambjamins isolados não foram capazes de induzir formação significativa ( $p < 0,05$ ) de micronúcleo (MN) quando comparados com o controle negativo. Porém, a

associação Tambjamina (10  $\mu\text{M}$ )/Trastuzumabe (50  $\mu\text{g/mL}$ ) promoveu dano cromossômico significativo nas linhagens C3.6 e C5.2. A associação com TI, nessas linhagens, induziu formação de MN de  $16,75 \pm 2,32$  e  $27,75 \pm 3,40$ , respectivamente. Já a associação com TJ apresentou efeito mais forte com valores de indução de MN de  $38,50 \pm 2,27$  e  $47,25 \pm 2,32$ , respectivamente.

Figura 45. Formação de micronúcleos em células de HCT116 tratadas com as Tambjamins I (2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$ ) e J (2,8 e 4,2  $\mu\text{M}$ ). Doxorubicina (0,3  $\mu\text{M}$ ) foi utilizado como controle positivo. \* $p < 0,05$  ANOVA seguido do pós teste de Tukey.

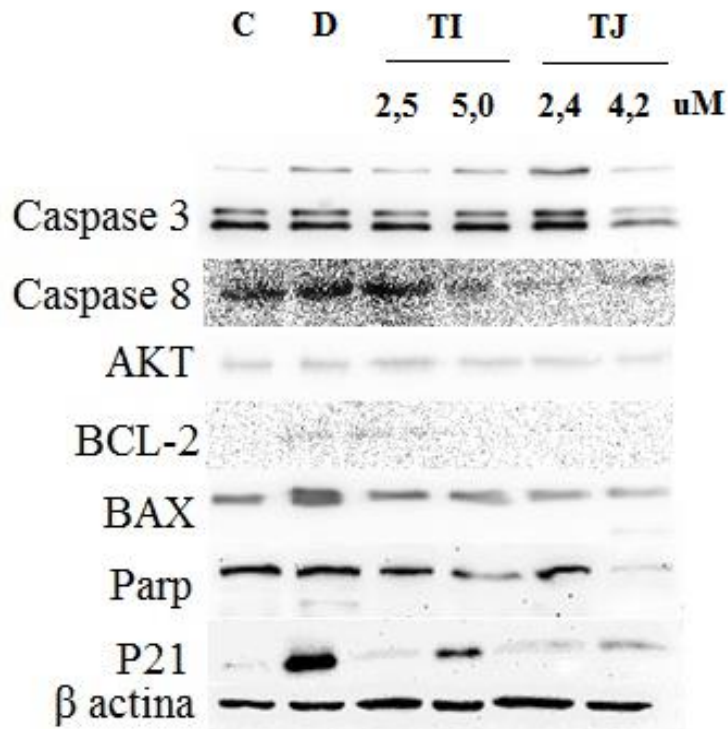


Fonte: Autoria própria (2017).

### 5.10 Avaliação da expressão proteica de células HCT-116 tratadas com Tambjamins

Os resultados mostraram que as Tambjamins em 24 horas de tratamento interferem no ciclo das células em todas as concentrações testadas na forma livre (2,5 e 5  $\mu\text{M}$ ) e (2,4 e 4,2  $\mu\text{M}$ ) para a TI e TJ, respectivamente. Portanto, esse tempo foi o escolhido a princípio para a análise por Western blot. Além, da avaliação de parada no ciclo por meio das ciclinas (D1 e E1), também foi avaliado a expressão proteica relacionada a dano no DNA ( $\gamma\text{H}_2\text{AX}$  e Chk1) e as possíveis vias de ativação apoptótica (intrínseca ou extrínseca) (Figura 46).

Figura 46. Avaliação da expressão de  $\beta$ -actina, ciclina D, caspase 3, caspase 8, AKT, PARP íntegro, BAX e p21 em células HCT-116 tratadas com veículo (DMSO-Controle), Doxorubicina (0,3 $\mu$ M) e Tambjamins I (2,5 $\mu$ M e 5 $\mu$ M) e J (2,4 $\mu$ M e 4,2  $\mu$ M) após 24 horas de incubação por Western Blot.



Fonte: A autoria própria (2017).

O tratamento *in vitro* de células de câncer colorretal com as Tambjamins levou o acúmulo da proteína p21. A proteína p21 atua como inibidor de ciclinas dependentes de cinase e essas ciclinas quando não promovem o complexo ciclina-CDKs ocasionam parada do ciclo celular em G0/G1. Este resultado corrobora com os dados observados através dos experimentos de citometria de fluxo de células tratadas com Tambjamins por 24 horas.

A perda da viabilidade das células HCT-116 tratadas com essas substâncias, observado no conjunto de experimentos realizados pode se dar pela indução da morte celular por apoptose que pode ser ativada tanto pela via mitocondrial intrínseca como pela extrínseca (FULDA; DEBATIN, 2006; MCILWAIN et al. 2013). Quando a via intrínseca é ativada, o mecanismo envolvido poderá ser ocasionado pela regulação de Bcl-2 (incluindo os membros da família Bcl-2 e Bax), com liberação de citocromo c e subsequentemente a ativação de caspases (Incluindo a caspase-3, -7 e -9) (KROEMER; REED, 2000; ELMORE, 2007).

Porém, quando a via ativada é extrínseca os protagonistas envolvidos serão os receptores de morte transmembranares que irão se ligar a fatores pró-apoptóticos. Após essa ligação ocorre subsequentemente ocorre a ativação de caspases (incluindo a caspase-3, -7 e -8) (ELMORE, 2007; NAGATA, 1997).

Os resultados do presente estudo demonstraram que as células tratadas com tambjamins promoveram a supressão da expressão de Bcl-2 (uma proteína anti-apoptótica) e ocasionou a expressão do Bax (proteína pro-apoptótica). Com a diminuição da Bcl-2 e a expressão do Bax, isto promove o aumento de citocromo c a partir da mitocôndria para o citosol ocasionando apoptose induzida por via intrínseca. Além disso, o Western blot mostrou haver expressão, apesar de baixa, da caspase-8 e do PARP. Estes resultados indicam que o tratamento com Tambjamins em ambas as concentrações resultam na ativação de caspase-3 e -8 que eleva a expressão de PARP em células HCT-116.

Com isso, os resultados sugerem que ambas as vias extrínseca e intrínseca da apoptose podem estar associadas com os efeitos antiproliferativos das tambjamins nas células HCT-116 e que a tambjamina I apresenta maior expressão das caspases analisadas quando comparadas a TJ. Após 24 horas de incubação a proteína p53 não foi expressa (Dados não mostrados), porém a proteína p21 está expressa em todos os grupos testados, assim como, o AKT.

## 5.11 Predições *in silico*

### 5.11.1 ADME/TOX

Os estudos *in silico* de compostos com potencial terapêutico, permitem o estudo de suas propriedades farmacocinéticas (absorção, distribuição, metabolismo e excreção, juntamente com toxicidade- ADME/Tox) e tem como vantagem a rapidez na sua execução, o baixo custo e a capacidade de reduzir o uso de animais em ensaios de toxicidade (GLEESON; HERSEY; HANNONGBUA, 2011).

Ao avaliar as propriedades ADME/Tox dos compostos TI, TJ e Prodigiosina pelo pkCSM – *pharmacokinetics* com valores de referência (Tabela 13) os resultados gerados, mostram de forma geral que os parâmetros observados foram semelhantes entre os compostos quando comparados a Prodigiosina, família que apresenta propriedades biológicas interessantes e de bastante semelhança aos compostos testados. Algumas das diferenças observadas foi à inibição, pela Prodigiosina, do Citocromo P450-CYP3A4 característica esta

não observada pela TI e TJ. A outra diferença foi observada para a substância Tambjamina J que foi capaz de inibir Citocromo P450-CYP2C19 propriedade não observada pelas outras duas substâncias testadas. Estas propriedades são importantes no processo de metabolização desses compostos no organismo. O citocromo p450 pertence à superfamília dos citocromos p450 é responsável por metabolizar diversos medicamentos e esta reação é depende de polimorfismo que resultará no aumento ou na redução desta metabolização de compostos (HERRANZ, 2006; WILKINSON, 2005). Em avaliação realizada por Nepomuceno (2012) a Tambjamina J após as administrações, promoveu piloereção e letárgia (sinais de dor); diarreia e entumescimento do abdome demonstrando assim seu efeito toxicológico, que pode estar relacionado com os resultados de metabolismo encontrados com a predição *in silico*.

Tabela 13. Valores dos parâmetros ADMEx das Tambjamins I e J e Prodigiosina gerados pelo servidor pkCSM Pharmacokinetics.

	<b>Parâmetros avaliados</b>	<b>TI</b>	<b>TJ</b>	<b>Prod</b>	<b>Unidade</b>	<b>Valores de referência</b>
<b>Absorção</b>	Solubilidade Aquosa	<b>-3,783</b>	<b>-3,997</b>	<b>-3,863</b>	Log mol/L	-
	Permeabilidade Celular (Caco2)	<b>1,342</b>	<b>1,36</b>	<b>1,308</b>	Log Papp 10 <sup>-6</sup> cm/s	Alta > 0,90
	Absorção Intestinal (humana)	<b>92,039</b>	<b>91,62</b>	<b>95,322</b>	% Absorção	Baixa absorção < 30%
	Absorção epitelial	<b>-2,95</b>	<b>-2,955</b>	<b>-3,17</b>		
	Substrato Glicoproteína P	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	-	-
	Inibidor Glicoproteína P I	<b>Não</b>	<b>Não</b>	<b>Não</b>	-	-
	Inibidor Glicoproteína P II	<b>Não</b>	<b>Não</b>	<b>Não</b>	-	-
<b>Distribuição</b>	Volume de Distribuição	<b>0,322</b>	<b>0,401</b>	<b>0,373</b>	Log L/Kg	Baixa < -0,15; Alta > 0,45
	Fração não ligada	<b>0,402</b>	<b>0,404</b>	<b>0,293</b>	Fu	-
	Permeabilidade à Barreira Hematoencefálica	<b>0,077</b>	<b>0,062</b>	<b>0,062</b>	Log BB	> 0,3 facilmente atravessa a BHE < -1 dificilmente atravessa BHE
	Permeabilidade à Barreira Hematoencefálica	<b>-2,356</b>	<b>-2,376</b>	<b>-2,349</b>	Log PS	
<b>Metabolismo</b>	Substrato do Citocromo P450 CYP2D6	<b>Não</b>	<b>Não</b>	<b>Não</b>	-	-
	Substrato do Citocromo P450 CYP3A4	<b>Não</b>	<b>Não</b>	<b>Sim</b>	-	-

	Inibidor do Citocromo P450 CYP1A2	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	-	-
	Inibidor do Citocromo P450 CYP2C19	<b>Não</b>	<b>Sim</b>	<b>Não</b>	-	-
	Inibidor do Citocromo P450 CYP2C9	<b>Não</b>	<b>Não</b>	<b>Não</b>	-	-
	Inibidor do Citocromo P450 CYP2D6	<b>Não</b>	<b>Não</b>	<b>Não</b>	-	-
	Inibidor do Citocromo P450 CYP3A4	<b>Não</b>	<b>Não</b>	<b>Não</b>	-	-
<b>Excreção</b>	Inibidor do Transportador Renal Catiônico Orgânico 2	<b>Não</b>	<b>Não</b>	<b>Não</b>	-	-
	Total Eliminação	<b>0,391</b>	<b>0,44</b>	<b>0,75</b>	Log mL/min/Kg	
<b>Toxicidade</b>	Toxicidade de AMES	<b>Não</b>	<b>Não</b>	<b>Não</b>		
	Dose Máxima Tolerada – Humana	<b>0,666</b>	<b>0,563</b>	<b>0,555</b>	Log/mg/Kg/dia	
	Inibidor de hERG1	<b>Não</b>	<b>Não</b>	<b>Não</b>		
	Inibidor de hERG2	<b>Não</b>	<b>Não</b>	<b>Sim</b>		
	Toxicidade oral aguda em ratos (DL50)	<b>3,085</b>	<b>3,181</b>	<b>2,775</b>	mol/Kg	
	Toxicidade oral crônica em ratos (LOAEL)	<b>0,993</b>	<b>0,552</b>	<b>0,292</b>	Log mg/kg_bw/day	Baixa ≤ 0,477; Alta > 0,477
	Hepatotoxicidade	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>		
	<i>T.Pyriformis</i> toxicity	<b>1.788</b>	<b>1.737</b>	<b>1.725</b>	Log µg/L	> -0,5= toxico

Fonte: Autoria própria (2017).

### 5.11.2 PHARMMAPPER

A busca por alvos representa outra vantagem dos ensaios *in silicos*. A avaliação dos compostos no *PharmMapper* após considerar as melhores posições de mapeamento das substâncias estudadas contra todos os alvos no banco de dados *PharmTarget* DB (LIU et al. 2010) todos os compostos geraram 300 resultados. As proteínas são ranqueadas por score (Z'score) baseados nas possíveis forças de interação entre o composto e os alvos. A tabela 14 contem os dez primeiros resultados para ambas as Tambjamins (I e J) e para o controle positivo (Prodigiosina). Ao avaliar quais dessas proteínas geradas interagem com a Tambjamina I e se relacionava ao câncer, encontrou-se na terceira posição a proteína

Lactoilglutationa liase (LGUL), também conhecida com Glioxalase I, que estão relacionadas à proliferação e apoptose em células cancerosas e tem sido descritas como superexpressas em vários tumores, incluindo cólon, mama, ovário, próstata, pulmão, estômago e rins (WANG et al., 2012). Na sexta posição se encontra a Chk1 proteína cinase Serine/Treonina que foi identificada inicialmente em leveduras unicelulares e relacionava-se com a parada do ciclo celular induzida por danos no DNA (WALWORTH; DAVERY; BEACH, 1993).

Tabela 14. Ranqueamento *in silico* de potenciais alvos ligantes para as Tambjamina (I e J) e Prodigiosina.

	Posição	PDB	Proteína	Z'-score
<b>Tambjamina I</b>	1	1Z71	Protombina	3,60
	2	1SL3	Protombina	3,38
	3	1FRO	Lactoyl glutationa lyase	3,02
	4	1CKP	Proteína da divisão celular cinase 2	2,40
	5	2FLR	Fator VII de coagulação	2,34
	6	2BRN	Chk1 cinase proteína Serina/Treonina	2,26
	7	1XKK	Receptor do fator de crescimento epidermal	2,22
	8	2ZGX	Protombina	2,19
	9	1H8I	Protombina	2,15
	10	1TZ8	Transtiretil	1,78
<b>Tambjamina J</b>	1	1XKK	Receptor do fator de crescimento epidermal	5,70
	2	1SL3	Protombina	3,42
	3	1FRO	Lactoyl glutationa lyase	2,93
	4	3GZ9	NONE	2,42
	5	2H42	cGMP-specific 3,5-cyclic phosphodiesterase	2,37

	6	2P3T	Coagulation factor X	2.14
	7	1OG5	Cytochrome P450 2C9	2.09
	8	1XOS	cAMP-specific 3,5-cyclic phosphodiesterase 4B	1.91
	9	1CKP	Cell division protein kinase 2	1.70
	10	1GNI	Serum albumin	1.55
<b>Prodigiosina</b>	1	3B67	Receptor de andr3geno	2.33
	2	1I9M	Anidrase carb3nico 2	2.22
	3	3BYU	Proto-oncogene prote3na tirosina cinase LCK	1.99
	4	4LBD	Receptor de 3cido recnoico gamma	1.81
	5	1R5L	Prote3na transferina Alfa-tocoferol	1.78
	6	1Y57	Proto-oncogene prote3na cinase Src	1.76
	7	1B59	Amino peptidase 2 metionina	1.55
	8	2I6B	Adenosina cinase	1.48
	9	3C4F	Receptor 1 de fator de crescimento fibrobl3stico b3sico	1.45
	10	2P4I	Receptor de angiopoietin-1	1.44

Fonte: Autoria pr3pria (2017).

Na s3tima posi33o encontra-se o Receptor do Fator de Crescimento Epidermal (EGFR). A supress3o da prote3na EGFR tamb3m est3 diretamente relacionada a malignidades epiteliais como de pulm3o, c3lon, pr3stata e mama, al3m de estar relacionada com p3ssimo progn3stico. Ao avaliar os dados para a Tambjamina J esta prote3na encontra-se ranqueada na primeira posi33o. Podendo se inferir que o alvo EGFR pode estar relacionado ao mecanismo de a33o de ambas as mol3culas avaliadas com menores e maiores probabilidades para as Tambjamins I e J, respectivamente. Na TJ a prote3na Glioxalase I, encontra-se na terceira posi33o. Ao verificar o controle positivo este apresentou, no ranqueamento, quatro



proteínas ligadas ao câncer nas primeiras colocações, segundo Z'score foi encontrado o Receptor de Andrógeno. Essa proteína tem sido caracterizado no câncer de próstata metastático, onde foi demonstrado que as células de câncer de próstata conseguem manter a sinalização AR funcional para acelerar a multiplicação das células cancerosas (ZHOU; BOLTON; JONES; 2015) câncer. Além disso, essa proteína foi encontrada expressa em 80% e 60% aumentada em cânceres de mama primário e metastático, respectivamente (CHIA et al. 2015).

Na terceira e na sexta posição estão às proteínas Protooncogénicas, proteína tirosina cinase LCK e Proto-oncogene proteína cinase Src que são proteínas responsáveis pela comunicação no controle intracelular, regulação e transdução de sinais. A regulação desse mecanismo inclui vários fenômenos que podem iniciar em alterações químicas e estruturais da proteína até o controle transcricional. Em décimo lugar encontrou-se o Receptor de angiopoietin-1 que também está relacionado a proteína tirosina cinase, podendo constituir o primeiro marcador de linhagem de células endoteliais em mamíferos e sua função provavelmente está relacionada à regulação da proliferação de células endoteliais, diferenciação e orientação do padrão adequado de multiplicação (UNIPROT, 2017).

O conjunto de dados *in silico*, apontam possíveis alvos estreitamente relacionados com alvos comuns ao tratamento oncológico e, com a predição farmacocinética podem ser de grande auxílio em investigações posteriores com os compostos.

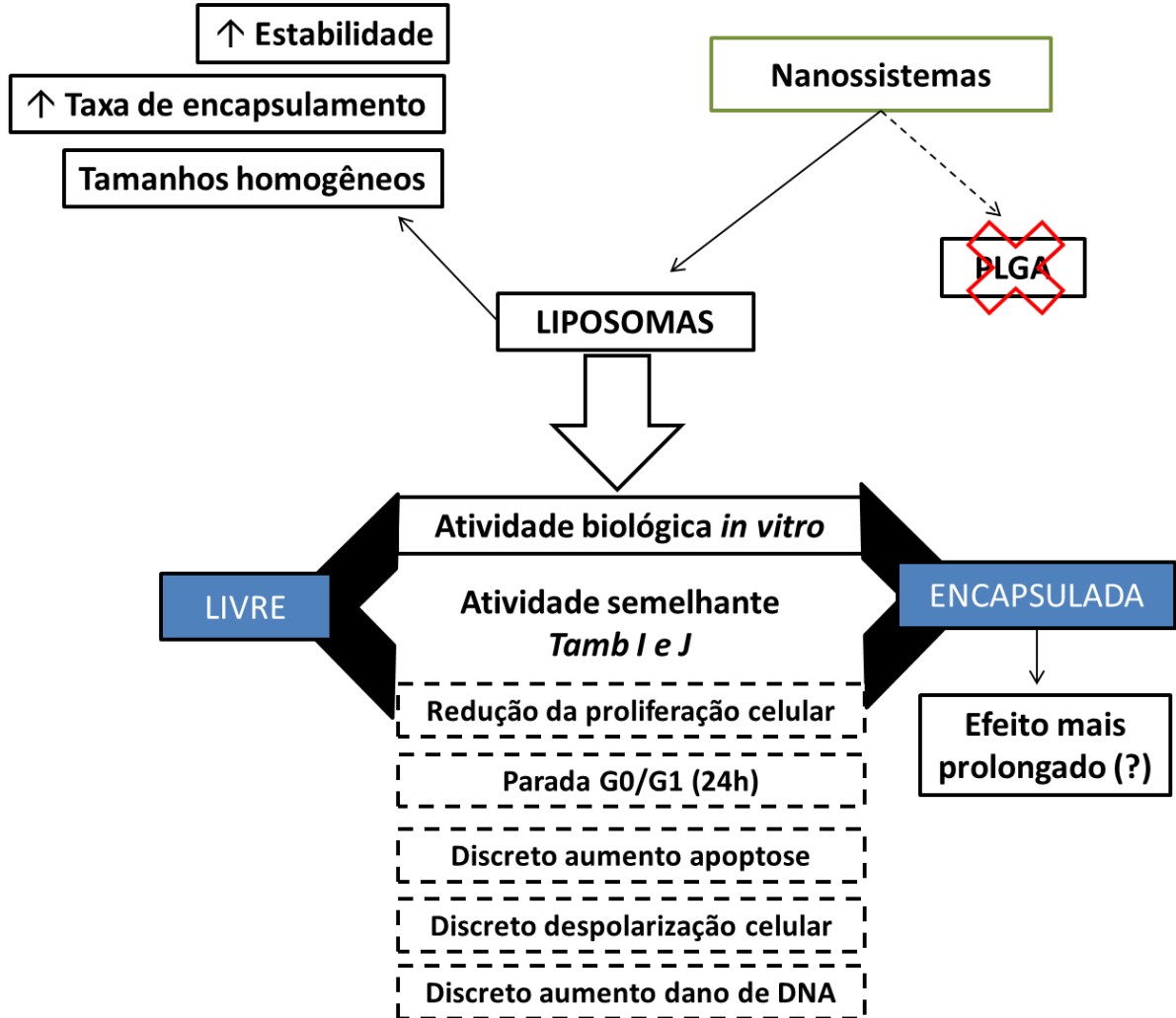
## 6. CONCLUSÕES

O método de encapsulamento por lipossoma foi o mais adequado para ambas as Tambjaminsas, permitindo a formação de nanossistemas estáveis e com elevada taxa de encapsulamento, tendo a metodologia por hidratação de filme lipídico apresentado resultados *in vitro* bastante promissores.

As Tambjaminsas I e J mostraram efeitos citotóxicos frente todas às linhagens testadas. Elas parecem tanto induzir a morte celular por apoptose, com parada do ciclo celular, despolarização mitocondrial, presença de danos de DNA e formação de micronúcleos de maneira concentração e tempo dependente, além de promover a modulação do pH intracelular.

O conjunto de dados *in silico*, resultados prévios e da presente tese permitiram o desenvolvimento dos nanossistemas carreadores de Tambjaminsas. Os resultados *in vitro* obtidos dos compostos encapsulados quando comparado com a droga livre mostraram um efeito mais prolongado, denotando que os compostos apresentam grande potencial farmacêutico, para isso ensaios *in vivo* devem ser realizados para que seja possível avaliar a manutenção da atividade antitumoral com redução da toxicidade desses compostos. Síntese dos principais achados esquematizados na figura 47.

Figura 47. Principais achados do estudo com tambjamins sintéticas e encapsuladas em lipossomas, avaliação da físico-química e biológica.



## REFERÊNCIAS

- ACHARYA, S.; SAHOO, S.K. PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.63, n.3, p.170-83 2011.
- ALBERTS, B.; *et al.* **Biologia molecular da célula**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- ALDRICH, L.N.; *et al.* Total synthesis and biological evaluation of tambjamine K and a library of unnatural analogs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.20, n.17, p.5207-11, 2010
- ALEXIS, F.; *et al.* Nanoparticle Technologies for Cancer Therapy. In M. Schäfer-Korting (Ed.), **Drug Delivery SE – 2**, v.197, pp. 55–86, 2010.
- ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Drug delivery systems: entering the mainstream. **Science**, v.303, p.1818-1822, 2004.
- ALMEIDA, V.L. *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v.28, n. 1, p.118-129, 2005.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts & Figures 2011**. Atlanta: American. 2011. 60p.
- ANCHIÊTA-JUNIOR, J. J. L. *et al.* Nanoencapsulação de um peptídeo isolado de anuros: citotoxicidade in vitro em células tumorais humanas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.35, n.1, p.119-125, 2014.
- APARICIO, S.B.M.; CALDAS, C. The Implications of Clonal Genome Evolution for Cancer Medicine. **The New England Journal of Medicine**, v.368, p.842-851, 2013.
- BACAL, N.S.; FAULHABER, M.H.W. **Aplicação prática em citometria de fluxo**. Editora Atheneu, São Paulo, Rio de Janeiro, Ribeirão Preto, Belo Horizonte, 2003.
- BLAGOSKLONNY, M. V. **Cell Cycle Checkpoints and Cancer**. U.S.A. Eureka, 2001
- BLACKMAN, A. J.; LI, C. New tambjamine alkaloids from the marine bryozoan *Bugula dentata*. **Australian Journal of Chemistry**, v.47, p.1625, 1994.
- BODGER, K. Colorectal cancer. *J R Coll Physicians*, v.34, p.197-201, 2001.
- BOLHASSANI, A.; SAFAIYAN, S.; RAFATI, S. Improvement of different vaccine delivery systems for cancer therapy. **Molecular Cancer**, v. 10, p.1-30, 2011.
- BONNINGTON, S.N.; RUTTER, M.D. Surveillance of colonic polyps: are we getting it right? **World J Gastroenterol**, v.22, n.6, p.1925–34, 2016.
- BOYER, S.; *et al.* Reaction site mapping of xenobiotic biotransformations. **Journ Chemical Information and Modeling**, v. 47, p. 583-590, 2007.
- BONNER, W.M. *et al.*  $\gamma$ H2AX and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v.8, p.957–967, 2008.

BRANDÃO, H.N. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v.33, n.6, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Organização Pan-americana de saúde. Nanotecnologia: A interação célula e nanopartículas. Brasília, 2011, p. 89-102.

\_\_\_\_\_. **Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer**, Coordenadoria de Programas de Controle do Câncer. O problema do câncer no Brasil. 4ª ed. Rio de Janeiro: INCa/ Pro-Onco; 1997.

BROWN, G.C.; BORUTAITE, V. Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. **Free Radical Biology & Medicine**. v.33, p.1440– 1450, 2002.

BRUCE. W. R.; LIN, H. An empirical cellular approach to the improvement of cancer Chemotherapy. **Cancer Research**. v.29, p.2308-2310, 1969.

BUERSTEDDE, J.M.; TAKEDA S. Increased ratio of targeted to random integration after transfection of chicken B cell lines. **Cell.**, v.67, p.179-88, 1991.

CANTALICE, J. C. L. Avaliação da atividade antimicrobiana, citotóxica e efeitos genotóxicos da rodigosina produzida por *Serratia marcescens* UFPEDA 398. Tese, 216f. Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Recife: O Autor, 2014

CARBONE *et al.* A new cytotoxic tambjamine alkaloid from the Azorean nudibranch *Tambja ceutae*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.**, v.20, n.8, p. 2668-70, 2010.

CARTÈ, B.; FAULKNER, D. J. J. Defensive metabolites from three nembrothid nudibranchs. **The Journal of Organic Chemistry** v.48, p.2314, 1983.

CAVALCANTE, B. C *et al.* Cytotoxic and genotoxic effects of tambjamine D, an alkaloid isolated from the nudibranch *Tambja eliora*, on Chinese hamster lung fibroblasts. **Chemico-Biological Interactions** 2008. 174:155–162.

CARVALHO, P.; TIRNAUER, J.S.; PELLMAN, D. Surfing on microtubule ends. **Trends Cell Biol.**,v.55, p. 229-237, 2003.

CARTÉ, B.; FAULKNER, D.J. Role of secondary metabolites in feeding associations between a predatory nudibranch, two grazing nudibranchs, and a bryozoan. v.12, n.3, p.795-804,1986.

CAVIGLIA, *et al.* Impedimetric toxicity assay in microfluidics using free and liposome-encapsulated anticancer drugs. **Journal of Chemical Ecology**,v.87, n.4, p.2204-12, 2015.

CHABNER, B. A.; CALABRESI, P. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**; Goodman, L. S.; Gilman, A., eds.; Mc Graw Hill: Rio de Janeiro, 1995, p. 903-949.

CHEN, Z.G. Small-molecule delivery by nanoparticles for anticancer therapy. **Trends Molecular Medicine**, v.16, n.12, p.594-602, 2010.

\_\_\_\_\_. Os conjugados de lípidos de poli (etilenoglicol) catión distal em vesículas unilamelares grandes, preparados por extrusão, aumentam a captação de células lipossômicas. **Journal of Liposome Research**, v.14, p.55-73, 2004.

Chen, H. B.; *et al.* Podophyllotoxin-loaded solid lipid nanoparticles for epidermal targeting. **Controlled Release**. v. 110, p. 296-306; 2006

CHEN, J; *et al.*. A novel glycyrrhetic acid-modified oxaliplatin liposome for liver-targeting and in vitro/vivo evaluation. *Drug Des Devel Ther.* v. 9; p. 2265–2275; 2015.

CHIA, et al. Targeting the Androgen Receptor in Breast Cancer. **Current Oncology Reports**., v.17, n. 4, 2015.

CICCIA, A.; ELLEDGE, S.J. The DNA Damage response; Marking it safe to Play with Knives Molecular cell, **Molecular Cell**., v.40, n.2, p.179-204, 2010.

COHEN, G.M. Caspases: the executioners of apoptosis. **Biochemical Journal**, v.326 (Part 1), p.1–16, 1997.

COHEN-SELA, E.; CHORNY, M.; KOROUKHOV, N.; DANENBERG, H. D.; GOLOMB, G. A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. **Journal of Controlled Release**,v.133, p. 90–95, 2009.

COSTA, M.P. et al. Controlled Release of Nor- $\beta$ -lapachone by PLGA Microparticles: A Strategy for Improving Cytotoxicity against Prostate Cancer Cells. **Molecules**, v.21, n. 873, p. 1-12, 2016.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia estrutural e funcional**. 6th ed. Mexico: McGraw-Hill, 2000.

CRAWFORD, J.; STRICKLER, J. Lung cancer. **ACP Medicine**, v.1, p.29, 2011.

CROSASSO, P. et al. Preparation, characterization and properties of sterically stabilized paclitaxel-containing liposomes. **Journal of Controlled Release**, v. 63, n.1-2, p.19-30, 2000.

CURY-BOAVENTURA, M.F.; POMPÉIA, C.; CURI, R. Comparative toxicity of oleic acid and linoleic acid on Jurkat cells. **Clinical nutrition**, v. 23, n. 4, p. 721-732, 2004.

CUKIERMAN, E.; KHAN, D.R. Os Benefícios e Desafios Associados ao Uso de Sistemas de Drogas em Terapia de Câncer. **Biochemical Pharmacology**, v.80 , p.762-770, 2010.

CZODROWSKI, P.; KRIEGL, J. M.; SCHEUERER, S.; FOX, T. Computational approaches to predict drug metabolism. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, v. 5, n. 1, p. 15-27, 2009.

DA SILVA, F.C.; WERNHOFF, P.; DOMINGUEZ-BARRERA, C. et al. Update on hereditary colorectal cancer. **Anticancer Research**. v.9, n.36, p.4399-4405, 2016.

DANHIER et al. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. **J Control Release**, v.161, p.505-22, 2012.

DANIAL NN. BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clin Cancer Research*, v.13, p.7254–7263, 2007.

DARZYNKIEWICZ, Z. HALICKA, H.D.; ZHAO, H. Analysis of cellular DNA by flow and laser scanningcytometry. *Advances in Experimental Medicine and Biology*.v.676, p.137-147, 2010.

DARZYNKIEWICZ, Z.; ZHAO, H. Cell Cycle Analysis by Flow Cytometry. eLS, 2014.

DAVID, A.R.; ZIMMERMAN, M.R. Cancer: an old disease, a new disease or something in between?. *Nature Review Cancer*., v.10, n.10, p.728-33. . 2010

DE ROSA, M.D.; PACE, U.; REGA, D.; COSTABILE, V.; DURATURO F.; IZZO P.; DELRIO P. Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review).*Oncology Reports*,34:1087- 1096.

DEPARTMENT OF PATHOLOGY, -SGPGIMS. **Prognostic factors predicting outcome in colorectal cancers. On-line seminars and tutorials.** Lucknow, India. 2007, P.1-6. Disponível em: <http://www.spggi.ac.in/path/seminars>. Acesso em 30.08.17

DEWEESE, J. E.; OSHEROFF, N. The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: Wolf in sheep's clothing. *Nucleic Acids Research, Nashville*, v.37, n. 3, p. 738-748, 2009.

DINARVAND, R.; SEPEHRI, N.; MANOOCHERI, S; ROUHANI, H.; ATYABI, F.; PANYAM, J.; ZHOU, W.; PRABHA, S.; SAHOO, S.K.; LABHASETWAR. V. Rapid endo-lysosomal escape of poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery. *The FASEB JOURNAL*, v.16, p.1217-26, 2002.

\_\_\_\_\_. Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. *International Journal of Nanomedicine*, v.6, p.877-895, 2011.

EDWARDS, K.A.; BAEUMNER, A.J .Analysis of liposomes.*Talanta*, v.68, n., p.1432-41, 2006.

ELMORE, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathology*., v.35, p.495–516, 2007.

EUROPEAN SCHOOL OF ONCOLOGY. **Task Force Preview**, Geneva, Switzerland. n.2, 1997.

FALLEIROS, J. P. B.; BRANDIL, A. L.; FONSECA, A. R. A. Aplicações da nanotecnologia no diagnóstico e tratamento de câncer. *Nucleus*, v. 8, n. 1, abr., 2011.

FELGNER, P.L.; GADEK, T.R.; HOLM, M.; ROMAN, R.; CHAN, H.W.; WENZ, M.; NORTHROP, J.P.; RINGOLD, G.M.; DANIELSEN, M. Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.84, p. 7413-7417, 1987.

FENECH, M.; MORLEY, A.A. Measurement of micronuclei o in lymphocytes. *Mutation Research*,V.147, p. 29-36, 1985.

\_\_\_\_\_. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, v. 455, p. 81-95, 2000.

FERRAZ, M.P. et al. Flow cytometry analysis of the effects of pre-immersion on the biocompatibility of glass-reinforced hydroxyapatite plasma-sprayed coatings. **Biomaterials**, v.21, n.8, p.813-20, 2000.

FRANKS, U.M. et al. Isolation and structure elucidation of a novel yellow pigment from the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. **Molecules**, v.10, n.10, p.:1286-91, 2005.

FOSTER, I. Cancer: a cell cycle defect. **Radiography**, v.14, n. 2, p. 144-149, 2008.

FULDA, S.; DEBATIN, K.M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, v.25, p.4798-4811, 2006.

GALLUZZI, L. *et al.* Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the nomenclatures committee on cell death 2012. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, p.107-120, 2012.

\_\_\_\_\_. Methods for the assessment of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis. **Apoptosis**, v.12, p.803-813, 2007.

GAVANDE, N.S. et al. DNA repair targeted therapy: the past or future of cancer treatment? **Pharmacol Therapy**, v.160, p.65-83, 2016.

GLEESON, M. P.; HERSEY, A.; HANNONGBUA, S. In-silico ADME Models: A General Assessment of their Utility in Drug Discovery Applications. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.11, n.4, p. 358-81, 2011.

GOODMAN, L.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas daterapêutica**. 12ª Ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2012,2112p.

GOLDSBY, R. et al. High incidence of epithelial cancers in mice deficient for DNA polymerase proofreading. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v 99, p.15560-15565, 2002.

GRANATO, A.C. et al. Produtos naturais da ascidia *Botrylloides giganteum*, das esponjas *Verongula gigantea*, *Ircinia felix*, *Cliona delitrix* e do nudibrânquio *Tambja eliora*, da costa do Brasil. **Quimica Nova**. v.28, n.2, p.192-198, 2005.

GREEN, D.; KROEMER, G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? **Trends Cell Biology**, v.8, p.267-271, 1998.

GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G. Structure-based drug design for tropical diseases. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.9, n.9, p.824-43, 2009.

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

HASAN A, N.; BELHAJA, H.; BENACHOURB, C. M.; BARBERI-HEYOBB, C.D.E.; KAHNF,G.E.; JABBARIH, M. LINDERA, E.; ARAB-TEHRANYA. Liposome encapsulation of curcumin: Physico-chemical characterizations and effects on MCF7 cancer cell proliferation. **International Journal of Pharmaceutics**, v.461, p.519- 528, 2014.



- HEEREMANS, J.L.; GERRITSEN, H.R.; MEUSEN, S.P.; MIJNHEER, F.W.; GANGARAM, R.S. P.; PREVOST, R.; KLUFT, C.; CROMMELIN, D.J. The preparation of tissue-type plasminogen activator (t-PA) containing liposomes: entrapment efficiency and ultracentrifugation damage, **Journal of Drug Targeting**, v.3, p.301–310, 1995.
- HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v.407, p. 770-776, 2000.
- HERRANZ, J.L. Pharmacogenetics, pharmacogenomics and individualised antiepileptic therapy. **Revista de Neurología**, v.43, p.S43-9, 2006.
- HORI, T. et al. CCAN makes multiple contacts with centromeric DNA to provide distinct pathways to the outer kinetochore. **Cell**. v.135, n.6, p.1039-52, 2008.
- HU, L. et al. Previsão de fenótipos de proteínas com base na rede de interação proteína-proteína. **PLoS One**, v.6, n.3 p.e17668, 2011
- HWANG, S. Y.; KIM, H.K.; CHOO, J. G.; SEONG, H.; HIEN, T. B. D. LEE, E.K. Effects of operating parameters on the efficiency of liposomal encapsulation of Enzymes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.94, p.296– 303, 2012.
- INCA. National Cancer Institute, PDQ. **Rectal Cancer**. 2007, pp.1-27.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2016/2017: Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/dados-apresentados.pdf>>. Acesso em: 20 de maio 2017.
- JACKSON, S. P.; BARTEK, J. Hybridization of mitochondrial RNA with mitochondrial and nuclear DNA in ager. V.55, p.. 114-119, 1996.
- JAIN, R.A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials**, v.21, n.23, p.2475-90, 2000.
- JORGE, P.M. **Indução de parada no ciclo celular e apoptose pelo ditelureto de difenila : uma possível relação com inibição de enzimas topoisomerases**. Dissertação, 106f. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do rio Grande do Sul. 2012.
- KAIS, Z. et al. FANCD2 maintains fork stability in BRCA1/2-deficient tumors and promotes alternative end-joining DNA repair. **Cell Rep.**, v.15, n.11, p. 2488–2499, 2016.
- KARRA, N.; BENITA, S. The ligand nanoparticle conjugation approach for targeted cancer therapy. **Current drug metabolism**, v.13, n.1, p. 22–41, 2012.
- KEPP, O.; GALLUZZI, L.; LIPINSKI, M.; YUAN, J.; KROEMER, G. Cell death assays for drug Discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, p. 221-237, 2011.
- KAPETANOVIC, I.M.; MUZZIO, M.; HUANG, Z.; THOMPSON, T.N.; MCCORMICK, D.L. Pharmacokinetics, oral bioavailability, and metabolic profile of resveratrol and its dimethylether analog, pterostilbene, in rats. **Cancer Chemother Pharmacol**. v.68, n.3, p.593-601, 2011.

- KAYE, J.A. et al. DNA breaks promote genomic instability by impeding proper chromosome segregation. **Current Biology**, v.14, n.23, p.2096-106, 2004.
- KHAWAR, I.A.; KIM, J.H.; KUH, H.J. Improving drug delivery to solid tumors: priming the tumor microenvironment. **Journal of Controlled Release**, v.201, p.78-89, 2015.
- KITANO, H. Computational systems biology. **Nature**, v.420, n.14, 2002.
- KNIGHT, N.J. et al. QSAR analysis of substituent effects on tambjamine anion transport. **Chemical Science**, v.7, p.1600-1609, 2016.
- K. KOJIRI, S. NAKAJIMA, H. SUZUKI, A. OKURA, H. SUDA. New antitumor substance, be-18591, produced by a streptomycete. **The Journal of Antibiotics**, v.46, p. 1799-1803, 1993.
- KOTEV, M. et al. Inibição do Enhancer Humano de Zeste Homolog 2 (EZH2) com Tambjamine Analogs. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 57, n. 8, p. 2089-2098, 2017.
- KROEMER, G. *et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death & Differentiation**, v.16, p.3-11, 2009.
- KROEMER, G.; REED, J.C. Mitochondrial control of cell death. **Nature Medicine**, v.6, p.513-519. 2000.
- KUMAR, V. *et al.* **Robbins e Contran. Patologia: bases patológicas da doença.** 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.
- KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran. Pathologic basis of diseases,** 7<sup>a</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders, 2004, 1525p.
- KUMARI, A.; YADAV, S.K.; YADAV, S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.75, p.1-18, 2010.
- LASIC, D. D. Novel applications of liposomes. **TIBTECH innovations**, v. 16, p. 307-320, 1998.
- LEE, J.H.; LEE, M.J. Liposome mediated cancer gene therapy: Clinical trials and their lessons to stem cell therapy. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v.33, p.433-442, 2012.
- LIM, H.J.; MASIN, D.; MCINTOSH, N.L.; MADDEN, T.D.; BALLY, M.B. Role of drug release and liposome-mediated drug delivery in governing the therapeutic activity of liposomal mitoxantrone used to treat human A431 and LS180 solid tumors. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.292, p.337-345, 2000.

LINDQUIST, N.; FENICAL, W. New tamjamine class alkaloids from the marine ascidian *Atapozoa* sp. and its nudibranch. **Experientia**, v.47, p.504. 1991.

LIPINSKI CA. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**. v.44, n.1, p.235-49, 2000.

LIRA, M. C. B. et al. *In vitro* uptake and antimycobacterial activity of liposomal usnic acid formulation. **Journal of Liposome Research** 2009; 19: 49-58.

LIU, X.; OUYANG, S.; YU, B.; LIU, Y.; HUANG, K.; GONG, J.; ZHENG, S.; LI, Z.; LI, H.; JIANG, H. PharmMapper server: a web server for potential drug target identification using pharmacophore mapping approach. **Nucleic Acids Research**, v.1, n.38, (Web Server issue): W609–W614, 2010.

LIU, Z.; XIONG, M.; GONG, J.; ZHANG, Y.; BAI, N.; LUO, Y. LI, L.; WEI, Y.; LIU, Y.; TAN, X.; XIANG, R. Legumain protease-activated TAT-liposome cargo for targeting tumours and their microenvironment. **Nature Communications**, v.27, n.5, p.4280, 2014.

LIU, R.; CUI, C.B.; DUAN, L.; GU, Q.Q.; ZHU, W.M. Potent *in vitro* anticancer activity of metacycloprodigiosin and undecylprodigiosin from a sponge-derived actinomycete *Saccharopolyspora* sp. nov. **Archives of Pharmacal Research**, v.28, p.1341–1344, 2005.

LORD, C. J.; HWORTH, A. The DNA damage response and cancer therapy. **Nature**, v. 481, p. 287-294, 2012.

LOURO, I. D. et al. **Genética molecular do câncer**. 1 ed. São Paulo: MSG Produção Editorial, 2002.

LÜPERTZ, R. et al. Dose- and time-dependent effects of doxorubicin on cytotoxicity, cell cycle and apoptotic cell death in human colon cancer cells. **Toxicology**, v.271, n.3, p.115-21, 2010.

MACDONALD, J.S. Adjuvant therapy of colon cancer. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v.49, n.4, p.202-219, 1999.

MACFARLANE, J.K.; RYALL, R.D.; HEALD, R.J. Mesorectal excision for rectal cancer. **The Lancet**, v.341, n.8843, p.457-460, 1993.

MAEDE, Y. et al. Differential and common DNA repair pathways for topoisomerase I- and II-targeted drugs in a genetic DT40 repair cell screen panel. **Molecular Cancer Therapeutics**, v.13, p.214-20, 2014.

MAGENHEIM, B.; BENITA; S.; S.T.P. Nanoparticles characterization. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, n.1, p.221, 1991.

MAHMOOD, T.; YANG, P.C. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. **North American Journal of Medical Sciences**, v.4, n.9, p.429-34, 2012.

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

MANDERVILLE, R. A. Synthesis, proton-affinity and anti-cancer properties of the prodigiosin-group natural products. **Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents**, v.1, p.195-218, 2001.

MARANHÃO, S. S. **Estudo do potencial antiproliferativo induzido por derivados 2-QUINOXALINILIDRAZÔNICOS em células tumorais *in vitro***. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará. 2015 (Dissertação).

MARLEY, A.R.; NAN, H. Epidemiology of colorectal cancer. **Int J Mol Epidemiol Genet**. v.3, n.7, p.105-114, 2016.

MCILWAIN, D.R.; BERGER, T.; MAK, T.W. Caspase functions in cell death and disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. V.5, p.a008656, 2013.

MELINO, G. The Sirens' song. **Nature**, v.412, p.23, 2001.

MELO, L.M.A. **Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de plga contendo oxaliplatina**. Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. BRASÍLIA – DF Junho/2016.

MELVIN, M.S.; FERGUSON, D.C.; LINDQUIST, N.; MANDERVILLE, R.A. DNA Binding by 4-Methoxypyrrolic Natural Products. Preference for Intercalation at AT Sites by Tambjamine E and Prodigiosin. **The Journal of Organic Chemistry**, v.64, n.18, p.6861-6869, 1999.

MONKS, A. et al. Viabilidade de uma tela de fármaco anticancerígeno de alto fluxo usando um painel diverso de linhas de células tumorais humanas cultivadas. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v.83, p.757-766, 1991.

MORENO, L. C. et al. Development and evaluation of liposomal formulation containing nimodipine on anxiolytic activity in mice. **Pharmacology, biochemistry and behavior** 2014; 116: 64-8.

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

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G. Nanocápsulas de poli ( D , L- Lactídeo) preparadas por um processo de deslocamento por solvente: Influência da composição em propriedades físico-químicas e estruturais. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.89, p.614, 2000.

MURAD, A.M.; KATZ, A. Oncologia Bases Clínicas do Tratamento; Guanabara; Rio de Janeiro, p. 41.2000. Machado, A. E. D.; **Química Nova**,v.23, p.237,2000.

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

NEPOMUCENO, F. W. A. B. **Investigação do potencial antitumoral *in vitro* e *in vivo* de alcalóides sintéticos metoxipirrólicos**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará-UFC.2012 (Tese).

NETO, J.B.A. et al. Antifungal Activity of Naphthoquinoidal Compounds In Vitro against Fluconazole-Resistant Strains of Different Candida Species: A Special Emphasis on Mechanisms of Action on Candida tropicalis. **PLoS One**, v.9, n.5, p. e93698, 2014.

NEW, R. R. C. Chapter 2: **Preparation of liposomes**. In R.R.C. New (ed.), *Liposomes A Practical Approach* IRL Press Ltd., Oxford, 1990: 33-104.

NICOLUSSI, A.C.; SAWAD, N.O. Qualidade de vida de pacientes com câncer do colorretal em terapia adjuvante. **Acta Paulista de Enfermagem**, n.22, v.2, p.155-161, 2009.

NIKOLETOPOULOU, et al., Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v.1822, p.3448-3459, 2013.

O'CONNELL, J.B.; MAGGARD, M.A.; LIU, J.H.; ETZIONI, D.A.; LIVINGSTON, E.H.; KO, C.Y. Do young colon cancer patients have worse outcome? **World J Surg**.v.28, n.6, p.558-62, 2004.

OLIVEIRA, L.C. et al. Aplicações das Nanopartículas Lipídicas no Tratamento de Tumores Sólidos: Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**,v.58, n.4, p.695-701, 2012.

OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Química Nova**. v.25, n.6a, p.976-984. 2002.

OSTRO, M. J. – Liposomes. **Scientific American**, v.256, n. I, p.90- 99, 1987a.

\_\_\_\_\_. **Liposomes: from Biophysics to Therapeutics**. Mareei Dekker, New York, 1987 (b).

ORRENIUS, S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. **Toxicology Letters**, v.149, p.19–23, 2004.

PANYAM, J. et al. Polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly (D, L-lactide-co-glycolide) nano-and microparticles. **Journal of Controlled Release**, v.92, n.1–2, p.173–187, 2003.

PEER, D.; KARP, J.M.; HONG, S.; FAROKHZAD, O.C.; MARGALIT, R.; LANGER, R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. **Nature Nanotechnology**, v.2, n.12, p.751-60, 2007.

PEREIRA, A. K. V. **Preparação e caracterização de lipossomas contendo tetracaína**. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) – Universidade Federal de Pernambuco. CAV, Saúde Humana e Meio Ambiente, 2012.

PÉREZ-TOMÁS, R.; MONTANER, B.; LLAGOSTERA, E.; SOTO-CERRATO, V. The prodigiosins, proapoptotic drugs with anticancer properties. **Biochemical Pharmacology**, v.66, p.1447-1452, 2003.

PINHO, M.S.L. Marcadores moleculares como fatores prognósticos do câncer colorretal. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v.19, n.2, p.130-132. 1999.

PINKERTON, D.M. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of synthetically derived tambjamines C and E - J, BE-18591, and a related alkaloid from the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. **Chemistry & Biodiversity**, v.7, n.5, p.1311-24, 2009.

PUISIEUX, F. COUVREUR, P., DELATTRE, J., DEVISAGUET, J.P. (Eds.). **Liposomes, new systems and new trends in their applications**. Paris: Éditions de Santé, 1995. p.266.

REDDY, E.V.; RAZVI, M.H.; MOHAN, N. et al. Rectal cancer: Time to change? **The National Medical Journal of India**, n.28, v.3, p.135-136, 2015.

ROGAKOU, E.P.; BOON, C.; REDON, C.; BONNER, W.M. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. **The Journal of Cell Biology**, v.146, p.905–916, 1999.

ROGAKOU, E.P.; NIEVES-NEIRA, W.; BOON, C.; POMMIER, Y.; BONNER, W.M. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. **The Journal of Biological Chemistry**, v.275, n.13, p.9390-5, 2000.

ROLIM, T. L. **Estudo da toxicidade e atividade antitumoral do óleo essencial de *Hyptis umbrosa* Salzm. (lamiaceae) e do componente majoritário fenchona**. 2013 Tese. Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Biotivos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Ceará. João Pessoa

ROMMINGER, S P; et al. Biosynthesis of Two Dihydropyrrole-Polyketides from a Marine-Derived *Penicillium citrinum*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.23, n.10, p.1783-1788, 2012.

SAGRISTÁ, M. L.; MORA, M.; MADARIAGA, M. A. Surface modified liposomes by coating with charged hydrophilic molecules. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, Washington, v. 5, p. 19-33, 2000.

SALMON, S. E. **Em Farmacología Básica & Clínica**; Katzung, B. G., ed.; Guanabara Koogan S. A.: Rio de Janeiro, 1998, p. 629-655.

SAWANT, R. R.; TORCHILIN, V. P. Design and synthesis of novel functional lipid-based bioconjugates for drug delivery and other applications. **Methods in Molecular Biology**, v.751, p.357–378, 2011.

SCHWEICHEL, J.U.; MERKER, H.J. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. **Teratology**, v.7, p.253–266, 1973.

SHAPIRO, H.M. The evolution of cytometers. **Cytometry**, v.58<sup>a</sup>, p.13-20, 2004.

SHAPIRO, H.M. **Practical flow cytometry**. 3 ed. New York. 1995.

SIVIERO, F. **Biologia celular: bases moleculares e metodologia de pesquisa**. 1 ed. – São Paulo: Roca, 2013.

SINGH, N.P. MCCOY, M.T. TICE, R.R. SCHENEIDER, E.L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SIPPL, W. Development of Biologically Active Molecules by Combining 3DQSAR and Structure-based Design Method. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v.16, p.825–830, 2002.

SKEHAN, P. et al. New Colorimetric Cytotoxicity Assay For Anticancer-Drug Screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v.82, p.1107-1112.1990;

SMITH, J. et al. The ATM–Chk2 and ATR–Chk1 Pathways in DNA Damage Signaling and Cancer. **Cancer research**, p. 73-112, 2010.

SOTO-CERRATO, et al. Facilitated Anion Transport Induces Hyperpolarization of the Cell Membrane That Triggers Differentiation and Cell Death in Cancer Stem Cells. **Journal of the American Chemical Society**, v.137, n.5, p. 15892–15898, 2015.

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 cancer. **Rev. Fitos.**, v. 3, p. 25-41, 2007.

SPUCH, C.; NAVARRO, C. Liposomes for Targeted Delivery of Active Agents against Neurodegenerative Diseases (Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease). **Journal of Drug Delivery**, v.2011, p.469679, 2011.

SU, T. T. Cellular responses to DNA damage: one signal, multiple choices. **Annual review of genetics**, v. 40, p. 187-2008, 2006.

TANABE, H.; KURIBAYASHI, K.; TSUJI, N.; TANAKA, M.; KOBAYASHI, D.; WATANABE, N. Sesamin induces autophagy in colon cancer cells by reducing tyrosine phosphorylation of EphA1 and EphB2. **International Journal of Oncology**, v. 39, n. 1, p. 33-40, 2011.

TANIGAKI, K., SATO, T., TANAKA, Y., OCHI, T., NISHIKAWA, A., NAGAI, K., ET AL. (2002) BE-18591 as a new H<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> symportionophore that inhibits immunoproliferation and gastritis. **FEBS Letters**, v.524, p.37–42, 2002.

TARI, *et al.* Liposome-incorporated Grb2 antisense oligodeoxynucleotide increases the survival of mice bearing bcr-abl-positive leukemia xenografts. **International Journal Oncology**, v.31, p.1243-1250, 2007.

TAYLOR, R.C.; CULLEN, S.P.; MARTIN, S.J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.9, p.231–241, 2008.

THORGEIRSSON, T.E.; GELLER, F.; SULEM, P. et al. A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. **Nature**, v.452, p.638–42, 2008.

TORCHILIN, V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carrier. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 4, p. 145-160, 2005.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **PNAS**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

TSCHAN, M.P.; SIMON, H.U. The role of autophagy in anticancer therapy: promises and uncertainties. **Journal International Medicine**, v.268, n.5, p. 410-418, 2010.

VASIR J.K.; LABHASETWAR, V. Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.59, p.718-28, p.2007.

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

VERMEULEN, K.; VAN, BOCKSTAELE, D.R.; BERNEMAN, Z.N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, v.36, p.131-149, 2003.

VEMURI, S.; RHODES, C. T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. **Pharmaceutica Acta Helveticae**, v. 70, p.95-111, 1995.

VICHAJ, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v.1, n.3, p.1112-6, 2006.

VIJAYAKURUP, V.; SPATAFORA, C.; TRINGALI, C.; JAYAKRISHNAN, P.C.; SRINIVAS, P.; GOPALA, S. Phenethyl caffeate benzoxanthene lignan is a derivative of caffeic acid phenethyl ester that induces bystander autophagy in WiDr cells. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 1, p. 85-94, 2014.

WALWORTH, N.; DAVEY, S.; BEACH, D. Fission yeast Chk1-protein kinase links the rad checkpoint pathway to Cdc2. **Nature**, v.363, p.368-371, 1993.

WANG, Y.; KURAMITSU, Y.; UENO, T.; SUZUKI, N.; YOSHINO, S.; IIZUKA, N.; AKADA, J.; KITAWAGA, T.; OKA, M.; NAKAMURA, K. Glyoxalase I (GLO1) is upregulated in pancreatic cancerous tissues compared with related non-cancerous tissues. **Anticancer Research**, v. 32, p. 3219-3222, 2012.

WEINBERG, R. A. **A biologia do Câncer**. São Paulo: Ed. Artmed, 2008.

WHITE, E.; DIPOLA, R. S. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. **Clinical Cancer Research**, v.15, n. 17, p. 5308- 5316, 2009.

WHO. **Early cancer diagnosis saves lives, cuts treatment costs**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/early-cancer-costs/en/>. Acesso em 20.08.17

WHO. **World Health Organization**. 2012. Disponível em: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx). Acesso em: 15 jul. 2017.

WILKINSON, G.R. Drug metabolism and variability among patients in drug response. **The New England Journal of Medicine**, v.352, n.21, p.2211-21, 2005.

WILLIAMS, G.H.; STOEBER, K. The cell cycle and cancer. **The Journal of Pathology**, v. 226, p. 352- 364, 2012.



WILMINK AB. Overview of the epidemiology of colorectal cancer. **Diseases of the Colon & Rectum** v.40, n.4, p.483-493, 1997.

YAMAZOE, M.; SONODA, E.; HOCHEGGER, H.; TAKEDA, S. Reverse genetic studies of the DNA damage response in the chicken B lymphocyte line DT40. **DNA Repair**, v.3, p.1175–1185, 2004.

YU, H.; ADEDOYIN, A. ADME–Tox in drug discovery: integration of experimental and computational technologies. **Drug Discovery Today**. v.8, n.18, 2003.

ZHOU, Y.; BOLTON, E.C.; JONES, J.E. Androgens and androgen receptor signaling in prostate tumorigenesis. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.1, p.54R15-R29, 2015.

ZIMMERMAN, M.R. **The scientific study of mummies**. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press, 2003.