



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

**ANDRÉA FELINTO MOURA**

**PROSPECÇÃO DE NOVAS MOLÉCULAS SINTÉTICAS E  
DETERMINAÇÃO DO EFEITO ANTITUMORAL DE UMA NOVA CHALCONA-  
SULFONAMIDA SINTÉTICA (CSS185)**

**FORTALEZA**

**2018**

ANDRÉA FELINTO MOURA

**PROSPECÇÃO DE NOVAS MOLÉCULAS SINTÉTICAS E  
DETERMINAÇÃO DO EFEITO ANTITUMORAL DE UMA NOVA CHALCONA-  
SULFONAMIDA SINTÉTICA (CSS185)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho  
Co-orientadora: Dra. Ana Jérsia Araújo

**FORTALEZA**

**2018**

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)

---

F351p Felinto Moura, Andréa.  
PROSPECÇÃO DE NOVAS MOLÉCULAS SINTÉTICAS E DETERMINAÇÃO DO EFEITO  
ANTITUMORAL DE UMA NOVA CHALCONA-SULFONAMIDA SINTÉTICA (CSS185) / Andréa  
Felinto Moura. – 2018.  
118 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação  
em Farmacologia, Fortaleza, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho.

Coorientação: Prof. Dr. Ana Jérsia Araújo.

1. antitumoral. 2. ciclo celular. 3. morte celular. 4. movimento celular. I. Título.

CDD 615.1

---

ANDRÉA FELINTO MOURA

**PROSPECÇÃO DE NOVAS MOLÉCULAS SINTÉTICAS E  
DETERMINAÇÃO DO EFEITO ANTITUMORAL DE UMA NOVA CHALCONA-  
SULFONAMIDA SINTÉTICA (CSS185)**

Tese submetida à coordenação do Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho  
Co-orientadora: Dra. Ana Jérsia Araújo

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará

---

Dra. Ana Jérsia Araújo (Co-orientadora)  
Universidade Federal do Piauí

---

Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior  
Universidade Federal do Ceará

---

Dra. Renata Bessa Pontes  
Universidade Federal do Ceará

---

Dra. Maria Júlia Barbosa Bezerra  
Universidade Federal do Ceará

---

Dr. José Delano Marinho Filho  
Universidade Federal do Piauí

**FORTALEZA**

**2018**

*“Entrego, confio, aceito e agradeço”*

Professor Hermógenes

## AGRADECIMENTOS

A defesa desta tese representa o fechamento de mais uma etapa da minha vida. Foram cinco anos e meio de crescimento não só profissional, mas também de crescimento pessoal e espiritual. Foram anos de muito aprendizado, muitos desafios dos quais diversas pessoas fizeram parte, às quais serei eternamente grata.

E nada eu seria sem minha fé. Agradeço a **Deus** por me dar sabedoria para lidar com todas as adversidades e força frente a todas as dificuldades enfrentadas nesta etapa. Acredito que Deus ilumina todos os meus dias, estando comigo em toda a minha trajetória. Confio e por isso sempre entreguei minha vida a Ele e sou grata por tudo.

Agradeço pelo constante apoio da minha **família** e **amigos**, em especial aos meus pais **Rosa Áurea** e **Benício** (*in memorian*), pelo amor carinho, educação e exemplo que me deram. Por me ensinarem que, fazendo o bem, agindo com honestidade e sinceridade, eu poderia alcançar todos os meus objetivos. Por me prepararem e por confiarem em mim; pois mesmo ainda jovem, por mais que fosse difícil a separação, sabiam que eu estava preparada para isso.

Aos meus irmãos, **Benício Jr.** e **Flávio**, por serem meus exemplos de crescimento pessoal e profissional. Agradeço pelo cuidado que sempre tiveram comigo, pelo companheirismo, amor e respeito existente entre nós.

Agradeço ao Prof. Dr. **Manoel Odorico de Moraes Filho** (a quem tenho muito orgulho de ter sido orientanda) por ter confiado em mim e, com isso, me dado a oportunidade de aprender muito durante todo este período.

À Profa. Dra. **Cláudia Pessoa**, pelo incentivo à pesquisa e crescimento do laboratório e pelas oportunidades dadas, acreditando no meu crescimento como pesquisadora.

Ao Prof. Dr. **Diego Veras**, pela ajuda incondicional e ensinamentos, estando sempre disponível e de portas abertas para trocar ideias e compartilhar seu conhecimento.

À Profa. Dra. **Caridad Noda Peres** e Dra. **Mirian Rita Carrilho** pela síntese química das amostras utilizadas neste estudo e pela parceria e confiança.

Agradeço a todos os **membros da banca**, convidados principalmente devido à admiração que tenho por cada um.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. **Ana Jérsia Araújo**, pelo enorme conhecimento repassado, pela amizade, carinho, confiança, disponibilidade e solicitude constante. Serei eternamente grata por tudo.

À **família LOE**. Em especial, à minha “mãe científica”, psicóloga e amiga, **Adelânia Marinho**, pelo companheirismo, preocupação, cuidado e carinho constante. Por ter sempre tempo disponível para desabafos, palavras de apoio, além de muitos momentos de descontração, entre risadas e lanchinhos. À **Silvana França**, por todo o suporte dentro e fora do laboratório, pela paciência, carinho e dedicação. Às Cafussuzinhas (**Cláudia Luciano**,

**Francilene Silva e Dra. Fátima de Cássia**), sem elas eu não seria nada, obrigada pela amizade, por cada “bom dia”, por cada abraço, café, discussão científica e não científica.

Não poderia deixar de agradecer também aos **alunos e professores do curso de Fisioterapia** da Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade que tive de encontrar minha realização profissional no período como professora substituta do Departamento de Fisioterapia.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, pela ajuda indispensável em questões relacionadas à coordenação do programa de pós-graduação.

Este trabalho foi realizado com o auxílio das seguintes instituições:

**Universidade Federal do Ceará**

**Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq**

**Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES**

**Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP**

**Fundação Cearense de Amparo a Pesquisa - FUNCAP**

## RESUMO

### PROSPECÇÃO DE NOVAS MOLÉCULAS SINTÉTICAS E DETERMINAÇÃO DO EFEITO ANTITUMORAL DE UMA NOVA CHALCONA-SULFONAMIDA SINTÉTICA (CSS185)

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças complexas caracterizadas pelo crescimento descontrolado de células anormais com alto potencial invasivo, sendo considerado um dos maiores problemas de saúde pública mundial. A incidência de câncer tem aumentado a cada ano, mostrando a relevância na realização de pesquisas cujo objetivo seja o tratamento do câncer em suas diversas modalidades. Novas chalconas têm sido desenvolvidas a partir da inserção de grupos orgânicos, dentre eles as sulfonamidas. O efeito antitumoral, antiinvasivo e antimigratório de algumas chalconas-sulfonamidas têm sido descrito, no entanto, poucos são os estudos que descrevem o mecanismo de ação antitumoral destas moléculas. Com isso, este trabalho teve como objetivo determinar o potencial antitumoral de novas chalconas-sulfonamidas sintéticas e os mecanismos envolvidos na atividade antiproliferativa da chalcona-sulfonamida sintética 185 (CSS185). Quatro chalconas-sulfonamidas sintéticas com estrutura molecular semelhante foram testadas contra linhagens tumorais para avaliação do potencial antitumoral destas moléculas, utilizando o método do MTT. Dentre elas, a chalcona-sulfonamida 185 (CSS185) apresentou seletivo efeito antitumoral em linhagens de câncer colorretal, apresentando valor de  $CI_{50}$  quatro vezes menor quando comparado às demais linhagens de células testadas. Com isso, foi realizado um estudo mais aprofundado do efeito antitumoral da CSS185 frente à linhagem de câncer colorretal derivada de linfonodo metastático (SW-620). Para determinação do efeito antitumoral desta molécula foram utilizadas técnicas de microscopia óptica e de fluorescência, citometria de fluxo e *Western blot*. A molécula induziu efeito citostático e citotóxico frente à linhagem SW-620 de maneira tempo e concentração dependente, interferindo na progressão do ciclo celular com aumento do número de células na fase G2/M, induzindo dano ao DNA e consequente morte celular com o aparecimento de alterações na morfologia celular condizente com apoptose e necrose, associada com perda da integridade de membrana e despolarização mitocondrial. A morte celular foi acompanhada de ativação e clivagem de PARP, com redução da expressão da proteína pró-apoptótica Bax e das caspases 3 e 8 dependendo da concentração testada, além de redução da expressão de proteínas relacionadas com a ativação da via de morte de necroptose, RIP e MLKL, podendo estar associado com a ativação de suas formas fosforiladas e indução de morte por necroptose. Em adição, devido ao efeito antimigratório de chalconas-sulfonamidas previamente descrito na literatura, foi realizado um ensaio preliminar de migração celular, utilizando a linhagem de melanoma murino B16F10. A CSS185 apresentou efeito antimigratório em concentrações não citotóxicas, abrindo perspectivas para um estudo mais aprofundado deste efeito. Com isso, sugere-se que o mecanismo envolvido no efeito antitumoral *in vitro* da CSS185 pode estar relacionado com indução de parada do ciclo celular na fase G2/M e consequente dano ao DNA e morte por necroptose, sendo observado também efeito antimigratório desta em concentrações não citotóxicas, sendo esta uma molécula promissora no combate ao câncer.

**Palavras-chave:** antitumoral; ciclo celular; morte celular; movimento celular.



## ABSTRACT

### PROSPECTION OF NEW SYNTHETIC MOLECULES AND DETERMINATION OF ANTITUMOR EFFECT OF A NEW SYNTHETIC CHALCONE-SULFONAMIDE (CSS185)

Cancer is a complex diseases characterized by the uncontrolled growth of abnormal cells with high invasive potential and is considered a global public health problem. The incidence of cancer has increased every year, showing the relevance in conducting research on cancer treatment in its various modalities. New chalcones have been developed from the insertion of organic groups, among them sulfonamides. The cytotoxic, antiinvasive and antimigratory effect of some chalcone-sulfonamides have been described, however, few studies have described the cytotoxic mechanism of action of these molecules. With this, the aim of this study was to determine the cytotoxic potential of new synthetic chalcone-sulfonamides and the mechanisms involved in the antiproliferative activity of synthetic chalcone-sulfonamide 185 (CSS185). Four synthetic chalcone-sulfonamides with similar molecular structure were tested against tumor cell lines to evaluate the cytotoxic potential of these molecules using MTT assay. Among them, chalcone-sulfonamide 185 (CSS185) showed a selective cytotoxic effect against colorectal cancer cell lines, with an  $IC_{50}$  value four times lower when compared to the other cell lines tested. Therefore, the cytotoxic effect of CSS185 against the metastatic lymph node-derived colorectal cancer cell line (SW-620) was carried out. For the determination of the antitumor effect of this molecule, we used techniques of optical microscopy and fluorescence, flow cytometry and Western blot. The molecule induced a cytostatic and cytotoxic effect against this cell line in a time and concentration dependent manner, interfering with cell cycle progression with increasing G2/M cell number, inducing DNA damage and consequent cell death with the appearance of cell morphology alterations associated with apoptosis and necrosis characteristics, loss of membrane integrity and mitochondrial depolarization. Cell death was associated with activation and cleavage of PARP, with reduced expression of pro-apoptotic Bax protein and caspases 3 and 8 depending of the concentration tested, as well as reduction of the expression of proteins related to the activation of the necroptosis death pathway, RIP and MLKL, that may be associated with the activation of the phosphorylated form of these proteins and induction of death by necroptosis. In addition, due to the antimigratory effect of chalcones-sulfonamides previously described in the literature, a preliminary cellular migration assay was performed using the B16F10 murine melanoma cell line. CSS185 presented an antimigratory effect in non-cytotoxic concentrations, opening up prospects for a more study of this effect. With this, it is suggested that the mechanism involved in the *in vitro* cytotoxic effect of CSS185 may be related to induction of cell cycle arrest in the G2/M phase and consequent DNA damage and cell death by necroptosis, and antimigratory effect is also observed in non-tumor concentrations cytotoxic, being a promising molecule against cancer.

**Key Words:** antitumor; cell cycle; cell death; cell movement.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma*.....	18
Figura 2. Principais características do câncer .....	18
Figura 3. Fases do ciclo celular.....	22
Figura 4. Desenho esquemático das vias indutoras de apoptose.....	26
Figura 5. Mecanismo de necroptose.....	28
Figura 6. Formação de metástase .....	30
Figura 7. Semelhança estrutural entre o ácido <i>p</i> -aminobenzoico (PABA) e a 4-aminofenil-sulfonamida e sua possível relação com a síntese de ácido fólico.....	32
Figura 8. Síntese química de derivado benzenosulfonamida (A) com consequente síntese química da chalcona-sulfonamida (B). .....	32
Figura 9. Planejamento experimental.....	38
Figura 10. Tipos de cometa e classificação por categoria de dano: 0 - sem dano (cauda < 5%); 1 - baixo nível de dano (5 - 20%); 2 - médio nível de dano (20 - 40%); 3 - alto nível de dano (40 - 95%) e 4 - dano máximo (> 95%). .....	53
Figura 11. Estrutura química das chalconas-sulfonamidas (CSS). (A) CSS99; (B) CSS63Ce; (C) CSS55; (D) CSS185. ....	60
Figura 12. Perfil citotóxico da chalcona-sulfonamida 185 (CSS185) frente a 11 linhagens de células tumorais e não tumorais avaliado pelo ensaio do MTT após 72 h de incubação. ....	63
Figura 13. Avaliação do efeito citostático/citotóxico concentração- e tempo-dependente da chalcona-sulfonamida 185 (CSS185) e da doxorubicina utilizando o ensaio do SRB.....	64
Figura 14. Efeito da chalcona-sulfonamida 185 (CSS185) sobre a viabilidade de células SW-620.....	66
Figura 15. Monitoramento em tempo real da inibição do crescimento de células SW-620 induzido pela chalcona-sulfonamida 185 (CSS185), utilizando <i>XCELLigence System</i> . ....	67
Figura 16. Influência da chalcona-sulfonamida 185 (CSS185) sobre o ciclo celular de células SW-620. ....	69
Figura 17. Avaliação das alterações celulares em células SW-620 após 24h e 48 h de tratamento com chalcona-sulfonamida 185 (CSS185), coradas com kit panótico rápido.....	72
Figura 18. Efeito da chalcona-sulfonamida 185 (CSS185) sobre viabilidade celular de células SW-620. ....	75
Figura 19. Avaliação após 24 horas (A) e 48 horas (B) de tratamento avaliado a partir do percentual de células na fase Sub-G1 por citometria de fluxo e sobre a indução de quebra de fita simples e dupla de DNA após 24 horas de tratamento (C) avaliado pelo teste do cometa alcalino. ....	76
Figura 20. Efeito da chalcona-sulfonamida 185 (CSS185) sobre o potencial transmembrânico mitocondrial de células SW-620 avaliado por citometria de fluxo após 24 horas (A) e 48 horas (B) de tratamento e sobre a proliferação celular de células SW-620 pré-tratadas ou não com N-acetil-L-cisteína (NAC, 4 mM) por 2 horas, avaliado pelo teste do MTT após 48 horas de incubação (C).....	78
Figura 21. Efeito da chalcona-sulfonamida 185 (CSS185) sobre o processo de morte celular em células SW-620. ....	80
Figura 22. Efeito antimigratório da chalcona-sulfonamida 185 (CSS185) sobre células B16F10 murino. ....	83

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens celulares testadas durante o estudo .....	39
Tabela 2. Avaliação da atividade citotóxica de novas chalconas-sulfonamida sintéticas frente a linhagens de células tumorais avaliado pelo ensaio do MTT após 72 horas de incubação. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo. ....	61
Tabela 3. Efeito antiproliferativo das chalconas-sulfonamidas CSS99 e CSS185 em linhagens tumorais e não tumorais avaliado pelo ensaio do MTT, após 72 h de incubação. ....	62
Tabela 4. Efeito antiproliferativo da CSS185 frente às linhagens HCT-116 e SW-620 após 24, 48 e 72 horas de incubação determinado pelo método MTT. ....	64
Tabela 5. Determinação da concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular ( $CI_{50}$ ), da concentração capaz de inibir o crescimento celular total ( $CI_{100}$ ) e da concentração capaz induzir 50% de morte celular ( $CL_{50}$ ) da chalcona-sulfonamida 185 (CSS185) e da doxorubicina frente à linhagem SW-620, após 24h, 48h e 72h de incubação. ....	65

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
Apaf-1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
Bax	<i>Bcl-2-like protein 4</i>
BCI-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
B16F10	Linhagem celular de melanoma murino
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
Caco-2	Linhagem celular de Adenocarcinoma de Cólon humana
CI <sub>50</sub>	Concentração Inibitória Média
CDk	Quinases Dependentes de Ciclinas
CMSP	Células Mononucleadas do Sangue Periférico
CSS	Chalcona-sulfonamida sintética
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DOX	Doxorrubicina
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EMT	<i>Epithelial-mesenchymal transition</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Fas-L	Proteína transmembranar do tipo II pertencente ao fator de necrose
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FADD	<i>Fas associated via death domain</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
GSH	Glutationa
GTPase	<i>Hydrolyze guanosine triphosphate</i>
HCT116	Linhagem celular de carcinoma colorretal
HEP-G2	Linhagem celular Carcinoma hepatocelular humana
HL 60	Linhagem celular de Leucemia Prómielocítica Humana

HPV	Papilomavírus humano
HT-29	Linhagem Celular de Adenocarcinoma Colorretal humana
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IS	Índice de seletividade
IV	Infravermelho
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
L-929	Linhagem celular de fibroblasto murino
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MCF-7	Adenocarcinoma de mama metastático humana
MLKL	<i>Mixed lineage kinase domain like pseudokinase</i>
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazólio
NAC	N-acetil-cisteína
NAD	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NCI-H460	Linhagem celular de Carcinoma de pulmão humana
NPDM	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
PABA	ácido <i>p</i> -aminobenzóico
PARP	<i>poli (ADP-Ribose) polimerase</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i>
PC-3	Linhagem celular de Adenocarcinoma de Próstata humana
PI	<i>Propidium Iodide</i>
PLK1	<i>Polo-like kinase-1</i>
RIP	<i>Receptor-interacting protein</i>
RIPK3	<i>Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RPMI	<i>Roswell Parrk Memorial Institute Medium</i>
SBF	Soro Bovino Fetal
SCGE	<i>Single-cell gel electrophoresis</i>
SF 295	Linhagem celular de Glioblastoma humana
SRB	Sulforodamina B
SSC	<i>Side Scatter</i>
SW-620	Linhagem celular de câncer colorretal metastático humana

TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TBST	<i>Tris-Buffered Saline with Tween-20</i>
TCA	Ácido tricloroacético
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
UFG	Universidade Federal de Goiás
US-NCI	<i>United States - National Cancer Institute</i>
5-FU	5-fluorouracil

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	17
1.1. Câncer: conceito, estimativas e aspectos gerais da carcinogênese.....	17
1.2. Estratégias terapêuticas utilizadas no tratamento do câncer.....	19
1.3. Ciclo Celular e Câncer .....	20
1.4. Morte celular programada e a carcinogênese .....	24
1.4.1. Apoptose e câncer .....	24
1.4.2. Necroptose e seu papel no tratamento do câncer .....	27
1.5. Invasão, adesão e migração de células tumorais e a formação de metástases.....	29
1.6. Síntese de Chalconas-Sulfonamidas.....	31
1.7. Atividade Anticâncer de Chalconas-Sulfonamidas .....	33
2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA .....	34
3. OBJETIVOS .....	36
3.1. Objetivo Geral.....	36
3.2. Objetivos Específicos.....	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	37
4.1. Materiais Utilizados .....	37
4.2. Planejamento Experimental.....	37
4.3. Síntese Química de Novas Chalconas-sulfonamidas .....	39
4.4. Avaliação da Citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	39
4.4.1. Linhagens Celulares .....	39
4.4.2. Manutenção das Linhagens Celulares .....	40
4.4.3. Obtenção de Células Mononucleadas do Sangue Periférico (CMSP).....	40
4.4.4. Avaliação do efeito citotóxico utilizando o ensaio do MTT .....	41
4.4.5. Avaliação do perfil citotóxico/citostático por meio do ensaio de Sulforodamina B (SRB)..	42
4.4.6. Quantificação direta da viabilidade celular utilizando o ensaio de exclusão por azul de Tripan .....	43
4.4.7. Monitoramento da viabilidade e da proliferação celular em tempo real utilizando o sistema <i>XCELLigence</i> .....	44
4.5. Estudo do mecanismo de ação .....	45
4.5.1. Determinação da atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos <i>Mus musculus Swiss</i> .....	45
4.5.2. Avaliação das alterações morfológicas por coloração com panótico rápido.....	47
4.5.3. Análises por Citometria de Fluxo.....	47
4.5.3.1. Avaliação do número de células e da integridade de membrana celular.....	48
4.5.3.2. Avaliação do conteúdo e da fragmentação de DNA .....	49

4.5.3.3.	Determinação do potencial mitocondrial transmembrânico – Rodamina 123 .....	50
4.5.4.	Avaliação da indução de estresse oxidativo utilizando pré-tratamento com N-acetilcisteína (NAC) .....	50
4.5.5.	Determinação do potencial genotóxico utilizando ensaio do Cometa Alcalino .....	51
4.5.6.	Detecção e quantificação do padrão de morte celular por microscopia de fluorescência utilizando coloração com laranja de acridina e brometo de etídio .....	54
4.5.7.	Avaliação da expressão de proteínas por Western Blot .....	55
4.5.7.1.	Extração de proteínas .....	55
4.5.7.2.	Quantificação de proteínas .....	56
4.5.7.3.	Eletroforese em gel de poliacrilamida .....	56
4.5.7.4.	Eletrotransferência .....	57
4.5.7.5.	Imunodetecção e Quimioluminescência .....	57
4.5.8.	Avaliação do efeito antimigratório <i>in vitro</i> da chalcona-sulfonamida 185 em células B16F10 .....	57
4.5.8.1.	Ensaio de migração celular .....	57
5.	RESULTADOS .....	60
5.1.	Avaliação do potencial citotóxico de novas chalconas-sulfonamidas sintéticas .....	60
5.2.	Estudo do efeito antiproliferativo da chalcona-sulfonamida 185 (CSS185) sobre células de câncer colorretal metastático (SW-620) .....	64
5.3.	Estudo do mecanismo de ação antitumoral <i>in vitro</i> da chalcona-sulfonamida 185 em células de câncer colorretal metastático (SW-620) .....	67
5.3.1.	Influência da chalcona-sulfonamida 185 sobre o ciclo celular de células de câncer colorretal metastático (SW-620) .....	67
5.3.2.	Mecanismo de morte celular envolvido no efeito citotóxico da chalcona-sulfonamida 185 sobre células de câncer colorretal metastático (SW-620) .....	71
5.3.3.	Efeito antimigratório <i>in vitro</i> da chalcona-sulfonamida 185 em células B16F10 por meio do ensaio de migração celular .....	81
6.	DISCUSSÃO .....	85
7.	CONCLUSÃO .....	101
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	102
	ANEXO A – EQUIPAMENTOS .....	114
	ANEXO B – SOLUÇÕES PREPARADAS E REAGENTES .....	115



## **1. INTRODUÇÃO**

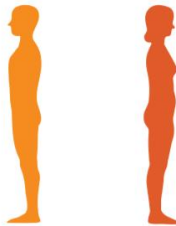
### **1.1. Câncer: conceito, estimativas e aspectos gerais da carcinogênese**

O câncer é considerado uma doença complexa e de difícil tratamento caracterizado por um conjunto de doenças de fundo genético e/ou epigenético que envolve crescimento desordenado de células anormais com potencial invasivo, sendo uma das patologias alvos de pesquisas para o desenvolvimento ou descoberta de novos fármacos (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2016; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017; BORTNER; CIDLOWSKI, 2014).

O aparecimento de neoplasias malignas tem crescido progressivamente, tornando o câncer um problema de saúde pública mundial. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), divulgados em 2017, mostraram que o câncer tem liderado as causas de morte no mundo, com 8,8 milhões de mortes em 2015, sendo a maioria em países de baixa e média renda. Trata-se de um aumento significativo frente à média anual registrada em 2012, quando houve 8,2 milhões de mortes (WHO, 2017). Dados publicados pela Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer sugerem que a incidência de câncer aumentou para 18,1 milhões de novos casos e 9,6 milhões de mortes. Dentre os cânceres que mais matam, destacam-se o câncer de pulmão com 1,8 milhões de mortes, colorretal com 881 mil mortes, de estômago com 783 mil mortes, de fígado com 782 mil mortes e mama com 627 mil mortes (GLOBOCAM, 2018).

Tendo em vista as últimas estimativas publicadas pelo Instituto Nacional do Câncer para o biênio 2018/2019, estima-se 600 mil novos casos de câncer para cada ano, dos quais cerca de 170 mil serão de pele não melanoma. A estimativa da incidência de câncer quanto ao sexo no Brasil difere do restante do mundo, mostrando que os cânceres de próstata (68 mil) em homens e de mama (60 mil) em mulheres são os mais frequentes (INCA, 2018) (Figura 1). Com isso, a OMS tem encorajado os países a priorizar serviços de diagnóstico e tratamentos básicos, de alto impacto e menor custo, visto que a detecção precoce do câncer reduz o impacto final da doença, permitindo tratamento mais efetivo, menos complexo e custoso, além de oferecer maior chance de cura (WHO, 2017).

**Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma\*.**

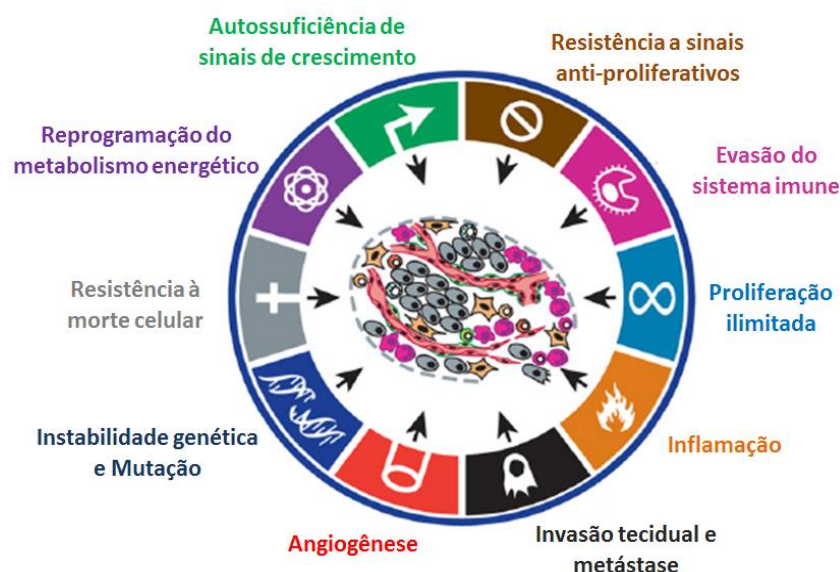
Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	<b>Homens</b> 	<b>Mulheres</b>	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

\*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA, 2018.

O crescimento desordenado das células no câncer é resultado da autossuficiência na sinalização de fatores de crescimento e da insensibilidade destas células aos inibidores do crescimento, mostrando uma vantagem proliferativa seletiva das células malignas. Além disso, elas têm a capacidade de melhor se adaptar a condições de estresse, evadindo por muitas vezes da morte celular programada e utilizando o sistema imunológico em seu favor. Com isso, células malignas apresentam potencial replicativo ilimitado, sendo capaz de reprogramar seu metabolismo energético, invadir e formar metástase e de promover a angiogênese, o que resulta na imortalização das mesmas (Figura 2) (FOUAD; AANEI, 2017; HANAHAH; WEINBERG, 2011).

**Figura 2. Principais características do câncer**



Fonte: Adaptado de HANAHAH; WEINBERG, 2011.

Além dessas características, é importante ressaltar que o tumor possui uma comunicação parácrina contínua com o estroma, criando um microambiente complexo, do qual depende para seu crescimento sustentado, invasão e metástase, sendo um regulador crucial do crescimento tumoral. A interação entre as células tumorais e o estroma representa uma forte relação que influencia na iniciação e progressão da doença e no prognóstico do paciente (FOUAD; AANEI, 2017; QUAIL; JOYCE, 2013). Com isso, diversos alvos têm sido estudados a fim de combater a carcinogênese e garantir a eficácia do tratamento, buscando constantemente novas alternativas terapêuticas para o tratamento do câncer (WEINBERG, 2013).

### **1.2. Estratégias terapêuticas utilizadas no tratamento do câncer**

A carcinogênese caracteriza-se por um mecanismo complexo causado pelo desequilíbrio dos processos de proliferação, diferenciação e morte celular, resultante do acúmulo de múltiplas mutações ao longo da vida de um indivíduo. Devido à heterogeneidade das células malignas, com o aparecimento de células com diversas habilidades de crescimento, invasão e metástase, uma variedade de estratégias terapêuticas tem sido utilizada no tratamento do câncer, em que cada paciente dispõe de tratamento individualizado de acordo com o tipo de câncer, o estágio de evolução do tumor e a presença ou não de metástase (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2016).

Dentre as principais estratégias utilizadas destacam-se a terapia cirúrgica e radioativa, a imunoterapia, a terapia hormonal, o transplante de células tronco, a quimioterapia e a terapia alvo dirigida. Muitas dessas terapias são utilizadas em associação a fim de obter melhor resposta terapêutica. A remoção cirúrgica do tumor é eficaz no diagnóstico, estadiamento e tratamento da doença, sendo, na maioria das vezes associada a outras terapias, como a radioterapia e a quimioterapia. A radioterapia é um tratamento local que utiliza partículas ou ondas de alta energia, como raios-x, raios gama, feixes de elétrons ou prótons, no intuito de destruir ou danificar células malignas. Por meio da radioterapia é possível curar ou reduzir o tamanho do tumor em estágio inicial, bem como, evitar o aparecimento de metástases e/ou de recidivas (ALMEIDA et al., 2005; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

Cerca de um terço dos pacientes nos estágios iniciais da doença apresentam boa resposta terapêutica com o uso de medidas locais no tratamento do câncer. No entanto, os demais casos necessitam de intervenção sistêmica, sendo a quimioterapia uma alternativa de

tratamento. A quimioterapia tem como objetivo destruir as células tumorais, interferindo no processo de crescimento, divisão e invasão celular, buscando preservar as células normais. Entretanto, a quimioterapia pode oferecer efeitos secundários, principalmente sobre células normais de crescimento rápido, como as gastrointestinais, as do sistema imunológico e os capilares, resultando em diversos efeitos colaterais, como, diarreia, náuseas, vômitos, alopecia e imunodepressão (KATZUNG; TREVOR, 2017).

A ciência busca constantemente novas estratégias a fim de combater a progressão tumoral e aperfeiçoar o tratamento dos pacientes. No entanto, nem sempre os resultados são satisfatórios, sendo observado elevadas taxas de recidiva do tumor e o aparecimento de metástase, além da indução de muitos efeitos colaterais. Por isso, a pesquisa baseada na terapia alvo dirigida tem crescido significativamente. O estudo das diferentes características das células cancerosas tem resultado no desenvolvimento de drogas alvo direcionadas. Estes compostos atuam no funcionamento das células tumorais baseando-se nas características que as tornam diferentes de células normais e saudáveis, resultando em menos efeitos colaterais (BAUDINO, 2015; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

Diante disso, é importante que novas estratégias terapêuticas sejam desenvolvidas a fim de eliminar a massa tumoral, protegendo as células normais e minimizando o desconforto do paciente, com maior eficácia. Isso tem motivado as pesquisas no âmbito da química medicinal por meio do desenvolvimento de novas moléculas com base no conhecimento da fisiopatologia de doenças, no estudo de vias bioquímicas e na seleção de alvos moleculares, a fim de identificar novos compostos com atividade biológica otimizada e direcionada, com baixa toxicidade e índice terapêutico favorável. (ANDRICOPULO et al., 2009).

### **1.3. Ciclo Celular e Câncer**

Muitos quimioterápicos utilizados atualmente no tratamento do câncer atuam sobre o ciclo celular. Estes agentes, denominados “fármacos ciclo-específicos”, mostram-se mais efetivos contra células que estão em constante divisão celular. Dentre eles destacam-se os alcaloides da vinca (vincristina e vimblastina) e os taxanos que atuam na fase de mitose, interferindo na formação do fuso mitótico; a doxorubicina que atua sobre as topoisomerasas, induzindo parada de ciclo celular na fase G<sub>2</sub> e M; o metotrexato e o 5-fluorouracil (5-FU), que interferem na síntese de DNA e com isso impede a passagem das células pela fase S. Com isso, a compreensão do ciclo celular de células tumorais é essencial tendo em vista a busca de

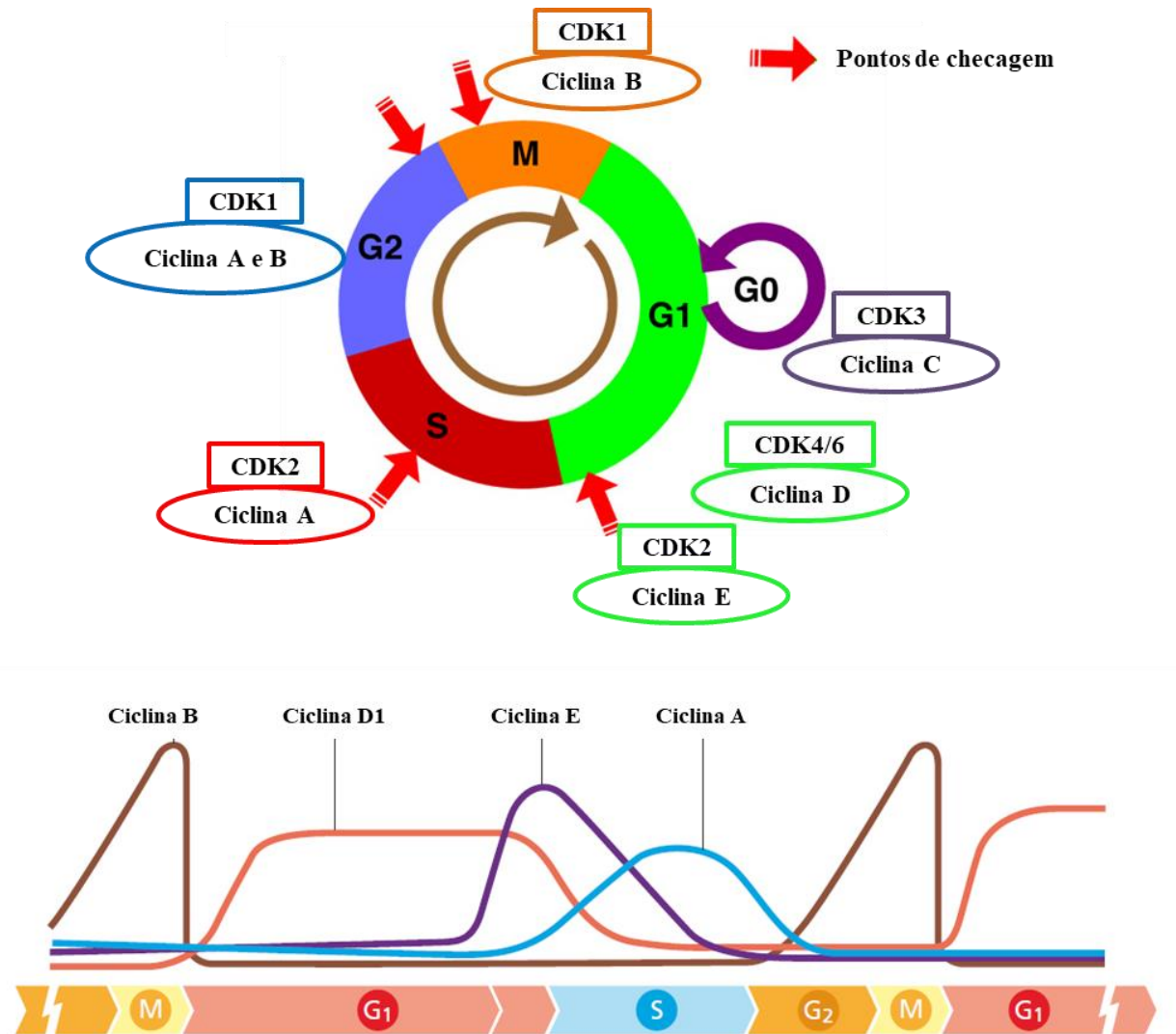
novos fármacos capazes de interferir na regulação cinética do ciclo celular e dos pontos de checagem (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; KATZUNG; TREVOR, 2017).

Durante o desenvolvimento celular, diferentes tipos de células são originados a partir de sucessivos ciclos de divisão celular e de processos de diferenciação celular característicos. Sinais mitogênicos ativam complexos de ciclinas e quinases dependentes de ciclinas (CDKs) que promovem a progressão do ciclo celular (Figura 3). Por outro lado, sinais inibidores do crescimento antagonizam a progressão do ciclo celular aumentando os inibidores de CDK das famílias INK4 e CIP/KIP. A replicação do DNA ocorre na fase de síntese (fase S) seguida da segregação do material genético replicado em duas células filhas, na fase de mitose (fase M). Estas fases também são controladas por complexos ciclina-CDK, juntamente com outras proteínas, como as PLK1 (do inglês, *Polo-like kinase 1*) e Aurora quinases (Aurora A e B). Essas duas fases são precedidas por dois intervalos de preparo do material genético, fase G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, responsáveis pela monitoração de uma nova replicação e entrada em mitose, respectivamente (ALBERTS et al., 2010; FOSTER, 2008; OTTO; SICINSKI, 2017; SHERR; BARTEK, 2017).

Além disso, existem mecanismos moleculares de monitoramento da progressão do ciclo celular nos pontos de transição de uma fase a outra, denominados “*checkpoints*” ou pontos de checagem. Esses pontos controlam a progressão do ciclo, permitindo que as células entrem em mitose e se diferenciem, ou entrem em processo de morte celular programada ou que se mantenham na fase de quiescência, denominada fase G<sub>0</sub> (OTTO; SICINSKI, 2017; WEINBERG, 2013).

As células na fase G<sub>1</sub> integram uma série de sinais que ativam o processo de divisão celular, tornando-se comprometidas à duplicação do genoma. Durante essa fase, a célula se desenvolve, aumenta a quantidade de suas organelas e integra os diferentes sinais do microambiente para a tomada de decisão de início ou não do ciclo celular. Este é o intervalo correspondente ao período de crescimento celular e de uma atividade intracelular marcada pela síntese de RNA e proteínas, elementos essenciais para o início da fase S. A predominância de sinais mitogênicos faz com que o ponto de checagem G<sub>1</sub>/S seja ultrapassado a fim de que as células avancem no ciclo e se proliferem (SHERR; BARTEK, 2017; SIVIERO, 2013).

**Figura 3. Fases do ciclo celular e níveis de ciclinas durante a progressão do ciclo celular**



Fonte: Adaptado de ALEEM; ARCECI, 2015; WEINBERG, 2013.

A fase de síntese ou fase S caracteriza-se pela ativação de complexos replicativos e pela duplicação do DNA, em que cada cromossomo é constituído por duas cromátides. O intervalo entre a fase S e a mitose é denominado fase G<sub>2</sub>. Nesta fase, as células apresentam-se com material genético já duplicado com duas cópias idênticas de cada um de seus cromossomos, sendo caracterizada pelo preparo do DNA e pela reorganização do esqueleto celular, permitindo a segregação adequada dos cromossomos na fase de mitose subsequente. Antes de entrar em fase de mitose, as células passam por outro ponto de checagem (G<sub>2</sub>/M) responsável por verificar a presença de erros no DNA. A fase M, por sua vez, é caracterizada pela mitose, em que ocorre a separação dos cromossomos pela citocinese, que é o processo pelo qual a célula divide o seu citoplasma gerando duas células-filhas independentes com o

mesmo número de cromossomos da célula de origem (ALBERTS et al., 2010; SHERR; BARTEK, 2017; SIVIERO, 2013).

Nos pontos de checagem, os mecanismos moleculares dependem da ação de um grande número de proteínas que são ativadas ou inativadas mediante um processo de fosforilação, sendo catalisado pela presença de enzimas do tipo proteínas quinases. Estas quinases, para realizar a função de fosforilar outras proteínas, necessitam estarem ligadas a outro grupo de proteínas, as ciclinas, sendo por isso, denominadas quinases dependentes de ciclinas (CDk). Cada ciclina é específica para determinados períodos do ciclo celular, sendo a ciclina D sintetizada durante a fase G<sub>1</sub>, a ciclina E produzida nesta mesma fase, em uma etapa mais tardia, a ciclina A sintetizada na fase S e na fase G<sub>2</sub> enquanto que a ciclina B tem seus níveis celulares presentes durante as fases G<sub>2</sub> e M (ALBERTS et al., 2010; ALEEM; ARCECI, 2015; OTTO; SICINSKI, 2017; WEINBERG, 2013).

Alterações nos mecanismos de regulação do ciclo celular tornam a célula apta a passar pelo ciclo celular sem a devida checagem, permitindo o crescimento desordenado das células e o acúmulo de uma série de mutações que contribuem para o surgimento das características malignas do tumor. A mutação nesses genes reguladores do ciclo celular resulta na perda do controle da proliferação celular e conseqüente desenvolvimento do tumor (ALEEM; ARCECI, 2015; OTTO; SICINSKI, 2017; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

As células neoplásicas são caracterizadas por proliferação ilimitada, instabilidade genômica com elevado potencial replicativo de células com mutações no DNA e aberrações cromossômicas (KASTAN; BARTEK, 2004; FOSTER, 2008). O aumento do número de divisões de células com mutações resistentes aos fatores inibitórios de proliferação e a situações adversas como a hipóxia e a privação de nutrientes permite que o tecido formado por células neoplásicas apresente maior taxa crescimento do que as células normais. Esse acúmulo de células tumorais resulta não somente na ativação de oncogenes promotores do crescimento ou da inativação de genes supressores de tumor que suprimem o crescimento, mas também de mutações de genes que regulam a apoptose (FOUAD; ANEI, 2017; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2016).

## **1.4. Morte celular programada e a carcinogênese**

A morte celular é essencial para a eliminação de células indesejadas e prejudiciais durante o desenvolvimento, homeostase e patogenias de um organismo, sendo ativadas no intuito de impedir a propagação de células com mutações ou danificadas. O desequilíbrio ou a inativação desse processo é um dos principais responsáveis pelo desenvolvimento de células neoplásicas, que além da taxa incontrolável de crescimento celular, têm a capacidade de evadir por muitas vezes da morte celular programada (HANAHAN; WEINBERG, 2011; KEPP et al., 2011; OUYANG et al., 2012).

O princípio biomolecular do distúrbio proliferativo observado na carcinogênese baseia-se na presença de mutações gênicas que interferem na expressão normal de proteínas envolvidas no controle da morte celular e do ciclo celular. A transformação de uma lesão pré-cancerosa até o desenvolvimento de um tumor maligno percorre por diversas condições de estresse que incluem sinalização excessiva, danos ao DNA, hipóxia e escassez de nutrientes. Fisiologicamente, as células tendem a se adaptar ao estresse, corrigindo os danos causados ou entrando em processo de morte celular programada, a fim de eliminar células não reparadas. No entanto, falhas nestes mecanismos desencadeiam sucessivas mutações que resultam na sobrevivência e propagação acentuada de células cancerígenas (BORTNER; CIDLOWSKI, 2014; FOUAD; AANEI, 2017; SIVIERO, 2013).

### **1.4.1. Apoptose e câncer**

A morte celular por apoptose é denominada como morte celular programada por garantir que a remoção de uma célula danificada ou indesejada seja realizada de maneira ordenada, minimizando danos às células vizinhas. O termo apoptose foi criado para indicar uma forma de morte celular programada morfolologicamente estereotipada caracterizada por encolhimento citoplasmático, condensação de cromatina, fragmentação nuclear, e uma peculiar formação de bolhas na membrana citoplasmática, denominadas “*blebbing*”, culminando na formação de corpos apoptóticos e perda da integridade da membrana. As células em apoptose são eficientemente absorvidas por células vizinhas com atividade fagocítica e degradadas dentro de lisossomos. (BORTNER; CIDLOWSKI, 2014; GALLUZZI et al., 2017).

Além disso, alguns aspectos bioquímicos também caracterizam a morte celular por apoptose, tais como alterações na assimetria de fosfolípidos da membrana plasmática pela



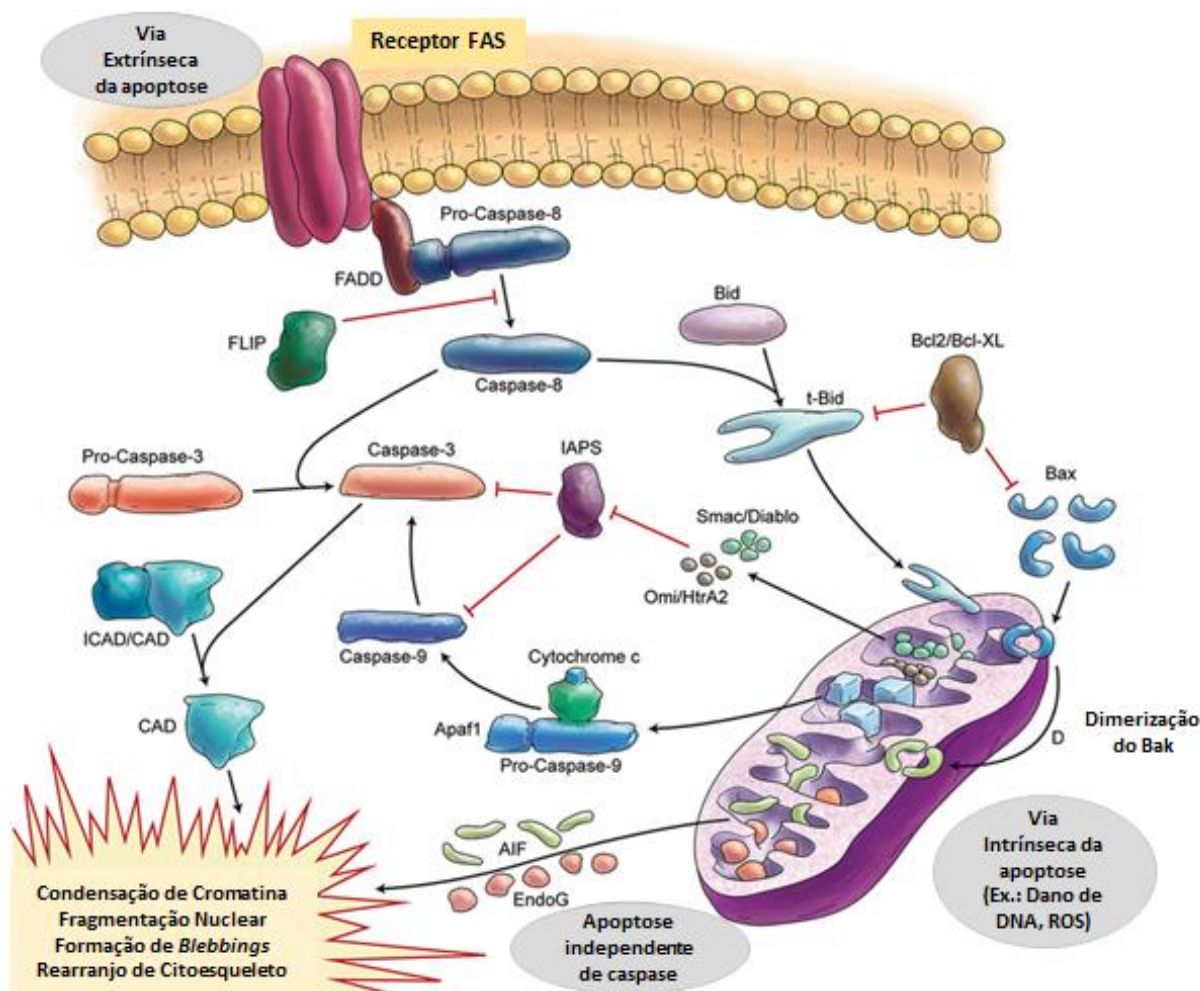
exposição de fosfatidilserina no folheto externo desta membrana, liberação mitocondrial de citocromo *c* com despolarização da membrana mitocondrial e ativação de uma específica família de proteases conhecidas como caspases. As caspases são um grupo de proteases de cisteína presentes em células saudáveis como enzimas precursoras com pouca ou nenhuma atividade. Quando necessário são ativadas ainda nos estágios iniciais da apoptose. Um dos principais substratos de reconhecimento das caspases são as enzimas de reparo do DNA, como o PARP (do inglês, *poly (ADP-ribose) polymerase*), que pode ter sua clivagem induzida por caspases a fim de impedir sua ação na reparação do DNA, desencadeando o processo de morte celular (BORTNER; CIDLOWSKI, 2014; SIVIERO, 2013).

Com isso, existem duas vias principais indutoras de apoptose: a via extrínseca que utiliza a via de receptor de morte e a via intrínseca ou via mitocondrial. A via extrínseca é desencadeada devido a perturbações no microambiente extracelular. Esta é caracterizada pela ligação do receptor de membrana Fas e TRAILR com seus respectivos ligantes extracelulares, Fas-L e TRAIL. A formação do complexo Fas/Fas-L ocorre quando a morte celular é estimulada por meio da ativação da via de domínio de morte associada ao Fas (FADD, do inglês *Fas associated via death domain*). Este complexo ativa a pró-caspase-8 que desencadeia a ativação da pró-caspase-3, a penúltima enzima para a execução do processo apoptótico (GALLUZZI et al., 2015; OUYANG et al., 2012). As pró-caspases são ativadas por proteínas adaptadoras que fazem com que múltiplas cópias específicas, chamadas iniciadoras, se unam e formem um complexo. Essas pró-caspases são dotadas de pequena atividade de protease e, quando forçadas a entrar no complexo, sua proximidade faz com que uma clive a outra, desencadeando uma cascata de amplificação proteolítica (Figura 4) (ALBERTS et al, 2010).

A via intrínseca, por sua vez, é controlada por pró-enzimas mitocondriais, podendo ser desencadeada por uma variedade de perturbações no microambiente intracelular, como dano de DNA, estresse de retículo endoplasmático, alterações microtubulares, dentre outros (GALLUZZI et al., 2017). Em ambos os casos, se uma célula é estimulada a iniciar o processo de morte celular tanto por estímulos extrínsecos quanto pelos sinais intracelulares, as membranas tornam-se permeáveis ao citocromo *c*, que é liberado pelas mitocôndrias no citosol. O citocromo *c*, por sua vez, recruta o Apaf-1 (do inglês, *Apoptotic protease activating factor 1*) e a pró-caspase 9 para compor o apoptossomo, que desencadeia uma cascata de

sinalização da caspase 9, resultando na apoptose (Figura 4) (BELLANCE; LESTIENNE; ROSSIGNOL, 2009; OUYANG et al., 2012; MARZBAN et al., 2015).

**Figura 4. Desenho esquemático das vias indutoras de apoptose.**



Fonte: Adaptado de MARZBAN et al., 2015.

A apoptose tem papel fundamental em diversas condições fisiológicas, tais como na embriogênese e no desenvolvimento de tecidos e órgãos, bem como em diversas condições patológicas, dentre elas, no câncer. As células tumorais são capazes de superar a resposta apoptótica por vários mecanismos, aumentando a expressão de proteínas anti-apoptóticas e reduzindo a expressão de proteínas pró-apoptóticas, o que caracteriza a capacidade dessas células de muitas vezes evadir da morte celular (BORTNER; CIDLOWSKI, 2014; FOUAD; AANEI, 2017).

Grande parte dos quimioterápicos utilizados atualmente possui atividade citotóxica, sendo capaz de induzir apoptose em células tumorais, atingindo diversos alvos moleculares como DNA, microtúbulos, tubulina, topoisomerases, proteassomos, tirosina quinases e

telomerasas, e desencadeando a morte da célula. No entanto, uma das principais causas de recidiva do tumor durante o tratamento com quimioterápicos é a resistência a apoptose induzida por medicamentos, destacando a necessidade de buscar novas drogas capazes de desencadear outros tipos de morte celular, tais como a necroptose (HE et al., 2017; KATZUNG; TREVOR, 2017).

#### **1.4.2. Necroptose e seu papel no tratamento do câncer**

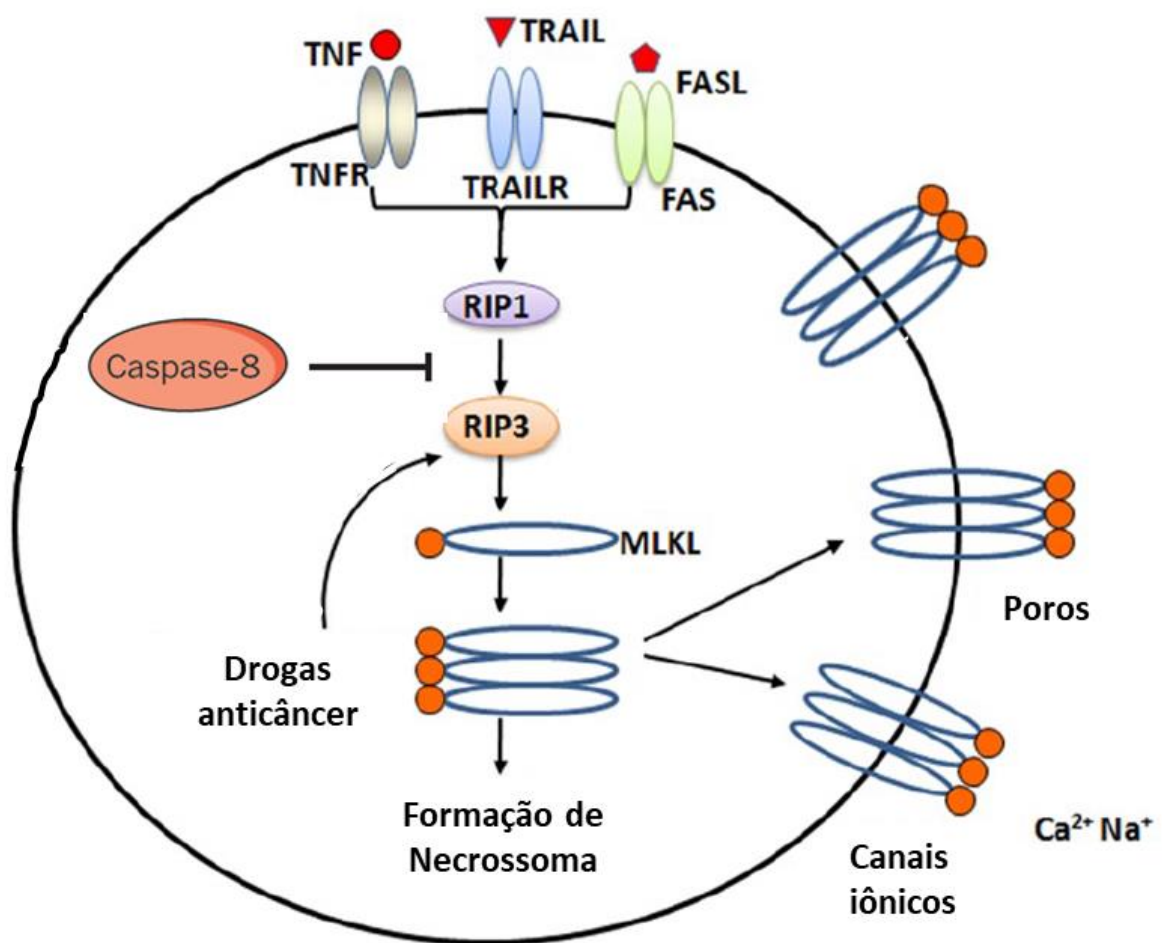
A necrose tem sido um termo utilizado para descrever um tipo de morte celular acidental como resultado de danos químicos e insultos tóxicos ou físicos. Este processo de morte celular passiva costuma ser associado à perda de células indesejadas em decorrência de lesão celular ou infecção, gerando um ambiente inflamatório, ao contrário da apoptose. No entanto, a necrose pode ser induzida de forma regulada como a apoptose (BORTNER; CIDLOWSKI, 2014; HE et al., 2017; SU et al., 2016; SIVIERO, 2013).

A necroptose é um tipo de necrose regulada que tem ganhado espaço dentro da comunidade científica. Este tipo de morte é iniciado após perturbações do microambiente intracelular e extracelular, sendo detectado por receptores de via de morte específicos, incluindo Fas e TRAIL (GALLUZZI et al., 2017). A necroptose depende criticamente de uma ativação sequencial de proteínas RIPK3 (do inglês, *receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3*) e MLKL (do inglês, *mixed lineage kinase domain like pseudokinase*), e é induzido por receptores de morte, interferons, receptores *toll-like*, sensores intracelulares de DNA e RNA, dentre outros mediadores (PASPARAKIS; VANDENABEELE, 2015). Fisiologicamente, a necroptose é ativada quando há falhas na maquinaria apoptótica durante o desenvolvimento embrionário e em reações de defesa do corpo a doenças (WANG et al., 2017).

Dentre os indutores de necroptose, o TNF (do inglês, *tumor necrosis factor*) é o mais estudado, pois é uma citocina que tem papel chave na indução da inflamação por infecção ou injúria tecidual. A sinalização desta citocina induz a expressão de muitos genes que regulam a inflamação. No entanto, em algumas condições, o TNF é um potente indutor de morte celular, incluindo a morte celular independente de caspase, como a necroptose. Na necroptose induzida por TNF, o receptor de TNF ativado interage com RIP1 (do inglês, *Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1*) e induz a dissociação de RIP1 na membrana plasmática. A RIP1 funciona como uma quinase que interage com a RIP3 e promove a fosforilação de RIP3, que se liga ao MLKL e induz fosforilação de MLKL. Esta fosforilação

desencadeia oligomerização do MLKL e sua translocação para a membrana plasmática, resultando em ruptura da membrana celular. Os oligômeros de MLKL aumentam a permeabilização da membrana por meio da formação de poros inespecíficos ou da interação com canais de cálcio a fim de promover influxo de cálcio e sódio e induzir morte celular. Interferons, infecções virais e algumas drogas anticâncer podem desencadear necroptose em modelos independente de RIP1 (Figura 5) (PASPARAKIS et al., 2015; WANG et al., 2017; YANG et al., 2017).

**Figura 5. Mecanismo de necroptose**



Fonte: adaptado de PASPARAKIS et al., 2015; WANG et al., 2017.

A caspase-8 é um fator determinante na apoptose e na necroptose, sendo requerida durante a ativação da apoptose e suprimida na ativação da necroptose. Estudos recentes têm demonstrado que esta caspase está frequentemente inativada em alguns tipos de câncer, devido a diversos mecanismos, tais como mutações gênicas e modificações epigenéticas induzidas muitas vezes por quimioterápicos. Esta inativação pode causar a evasão destas células a apoptose, uma das características do câncer que tem representado principal

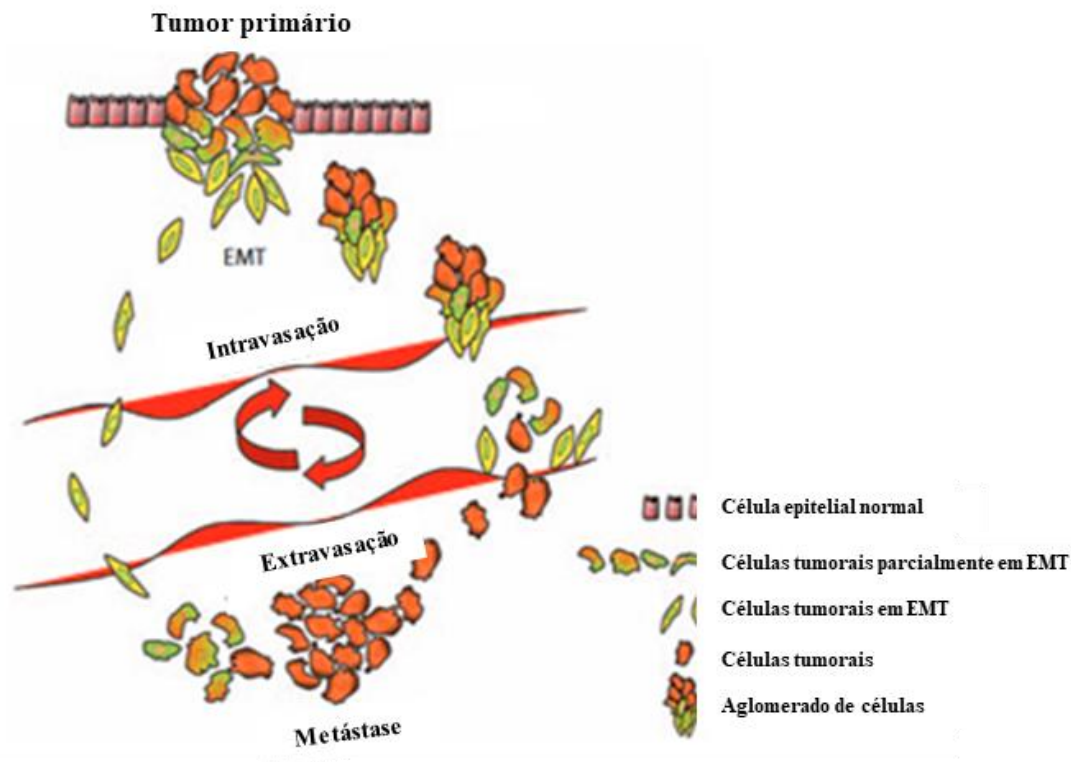
mecanismo de resistência à terapia anticâncer. A indução de necroptose, por sua vez, pode eliminar células que tiveram falha na maquinaria apoptótica, sendo uma alternativa de morte celular programada contra o câncer. Com isso, a descoberta de novos compostos desencadeadores de necroptose tem despertado interesse no meio científico para o tratamento de pacientes com cânceres resistentes à apoptose (CHEN; YU; ZANG, 2016; HANAHAN; WEINBERG, 2011; HE, et al., 2017).

### **1.5. Invasão, adesão e migração de células tumorais e a formação de metástases**

O surgimento de metástases é a maior causa de morte por câncer, sendo um fator crucial na definição do prognóstico de pacientes com câncer (WHO, 2017). Alguns processos são essenciais para o desencadeamento da cascata metastática, tais como angiogênese tumoral, desagregação de células do tumor primário regulada por um grupo de caderinas e cateninas, invasão e migração das células através da membrana basal e da matriz extracelular e subsequente invasão ao endotélio (GANGULY et al., 2013). O processo de formação de metástase envolve uma população de células tumorais denominadas células iniciadoras de metástase. Estas se originam do tumor primário e adquirem novas características, tais como capacidade de plasticidade e de reprogramação metabólica, potencial invasivo, resistência à morte celular e evasão ao sistema imune, a partir da aquisição de novas mutações durante a disseminação e colonização para tecidos distantes (CELIÀ-TERRASSA; KANG, 2016).

Inicialmente, células metastáticas perdem a interação com o tumor primário e invadem a matriz extracelular e o estroma circundante, por um processo conhecido como transição epitelial-mesenquimal (EMT, do inglês *epithelial-mesenchymal transition*). Isto resulta no intravasamento destas células ao lúmen de um vaso linfático ou sanguíneo, permitindo que atinjam órgãos distantes. Uma pequena fração dessas células adere ao endotélio, extravasam, invadindo novamente a matriz extracelular e migrando para outros tecidos, onde se proliferam formando uma nova massa tumoral (Figura 6) (BOUYSSOU et al., 2014; KSIAŻKIEWICZ; MARKIEWICZ; ZACZEK, 2012; HURST; WELCH, 2011).

**Figura 6. Formação de metástase**



Fonte: adaptado de KSIĄŻKIEWICZ; MARKIEWICZ; ZACZEK, 2012.

Tanto a proliferação celular como a formação de metástases exige interação contínua com os componentes da matriz extracelular. Esta matriz é composta por uma rede de macromoléculas, tais como fibronectina, laminina e colágeno-IV, que regulam processos biológicos como proliferação, diferenciação, cicatrização de feridas, migração e tumorigênese. Estes processos requerem a participação de várias proteínas sinalizadoras, como GTPases (do inglês, *hydrolyze guanosine triphosphate*), MAPKs (do inglês, *mitogen-activated protein kinases*), FAK (do inglês, *focal adhesion kinase*) e JNK (do inglês, *c-Jun N-terminal kinase*), que são recrutadas para os sítios de ligação de integrinas com a matriz extracelular. A principal diferença no comportamento entre células normais e tumorais reside no fato de que muitos receptores e componentes de sinalização encontram-se alterados, ativados constitutivamente, quando normalmente eles deveriam ser ativados apenas em uma situação particular (GANGULY et al., 2013; AHMAD KHALILI; AHMAD, 2015).

Com isso, a capacidade de iniciar o crescimento metastático é um importante gargalo durante a progressão do câncer e representa uma janela ideal para a intervenção terapêutica. A pesquisa no campo das vias metastáticas tem ajudado a identificar fatores que podem ser

direcionados para alcançar possíveis propósitos terapêuticos. Logo, a busca por compostos capazes de interferir nas vias moleculares envolvidas na formação de metástases pode ser útil para o desenvolvimento de respostas ao tratamento mais eficientes, aumentando a chance de cura dos pacientes (BOUYSSOU et al., 2014; CELIÀ-TERRASSA; KANG, 2016; GANGULY et al., 2013).

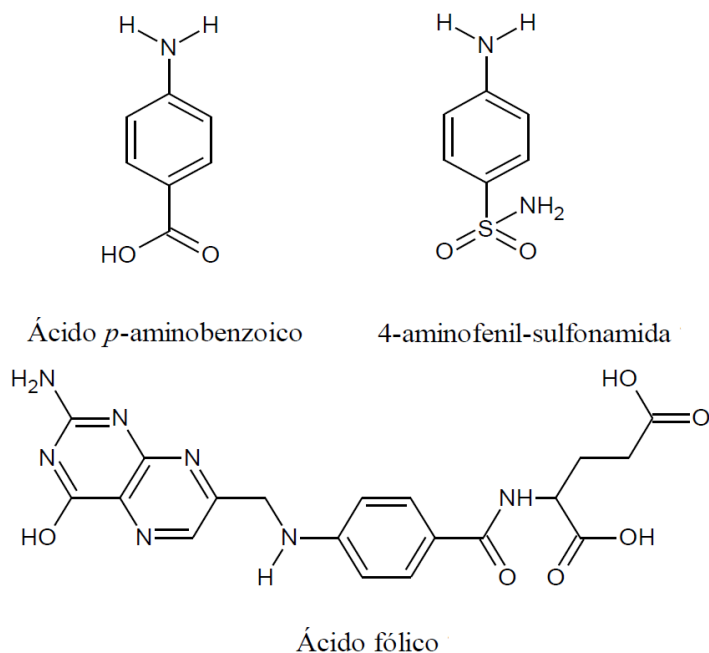
### **1.6. Síntese de Chalconas-Sulfonamidas**

As chalconas são moléculas precursoras de flavanóides e isoflavanóides, destacando-se como metabólitos secundários essenciais em muitas plantas e bactérias encontradas em diversos vegetais e frutas (BAHEKAR et al., 2016). Muitos estudos têm sido desenvolvidos a fim de buscar atividades biológicas destes compostos. Dentre os estudos, as chalconas vêm apresentando potente efeito farmacológico anti-leishmania (BOECK et al., 2006), anti-protozoário (MIHIGO et al., 2010), anti-inflamatório (CHEN et al., 2013; HSIEH et al., 2000; WON et al., 2005), imunomodulador (SAFDAR et al., 2017), inibidor de óxido nítrico (HERENCIA et al., 1999), anticâncer (KARTHIKEYAN et al., 2015; LEÓN-GONZÁLEZ et al., 2015) e anti-HIV (COLE et al., 2016).

Estas moléculas são facilmente obtidas a partir da reação de condensação de Claisen-Schmidt entre cetonas e aldeídos aromáticos substituídos na presença de catalisadores ácidos ou básicos e de solventes orgânicos (VOGEL, 1989). Com o objetivo de buscar novas moléculas mais eficazes frente a determinado alvo terapêutico, novas chalconas têm sido desenvolvidas a partir da adição de grupos orgânicos, como substituintes de anéis aromáticos, com propriedades biológicas conhecidas. Diversos substituintes em diferentes posições na estrutura química destas moléculas podem determinar diferentes atividades biológicas bem como específicos mecanismos de ação (SILVA et al., 2015).

Dentre os possíveis substituintes, destacam-se as sulfonamidas. As sulfonamidas constituem um grupo de antibióticos sintéticos utilizados no tratamento de doenças infecciosas causadas por microrganismos. Além disso, estes compostos têm sido identificados como agentes quimioterapêuticos após descoberta da eficiência da 4-aminofenil-sulfonamida contra estreptococos. A semelhança estrutural entre esta sulfonamida e o ácido *p*-aminobenzóico (PABA) pode estar relacionado com possível competição entre estes compostos em alguns processos metabólicos, como na síntese de ácido fólico (Figura 7) (SOLOMONS; FRYHLE, 2009).

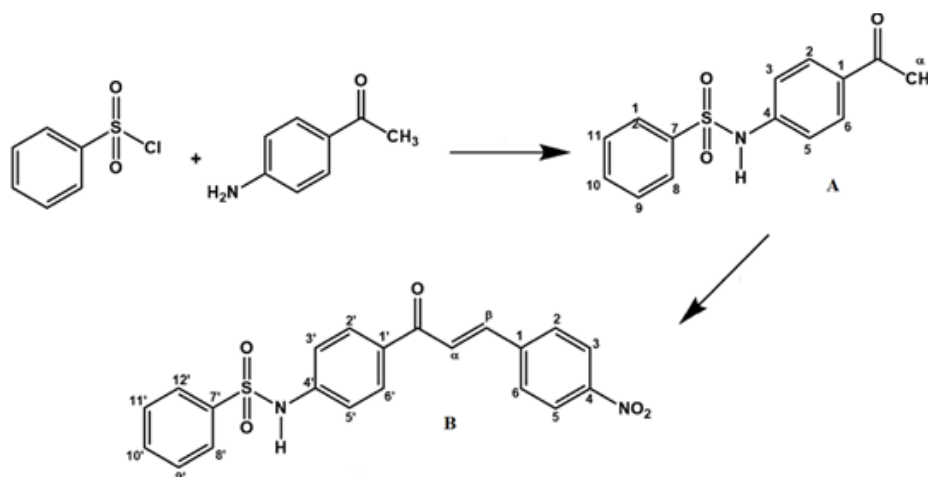
**Figura 7. Semelhança estrutural entre o ácido *p*-aminobenzoico (PABA) e a 4-aminofenil-sulfonamida e sua possível relação com a síntese de ácido fólico.**



Fonte: adaptado de SOLOMONS; FRYHLE, 2009.

A partir da adição destes substituintes, algumas atividades biológicas das chamadas chalconas-sulfonamidas (Figura 8) têm sido descritas, tais como antifilária (BAHEKAR et al., 2016), antimalária (DOMÍNGUEZ et al., 2005; NORELJALEEL, et al., 2018) e anticâncer (BONAKDAR et al., 2017), bem como inibidor da  $\alpha$ -glucosidase (SEO et al., 2005), de beta-secretase e acetilcolinesterase (KANG et al., 2012), de anidrase carbônica (ARSLAN et al., 2016; PEERZADA et al., 2018) e de ecto-5'-nucleotidase e fosfatase alcalina intestinal (EJAZ et al., 2017).

**Figura 8. Síntese química de derivado benzenosulfonamida (A) com consequente síntese química da chalcona-sulfonamida (B).**





Fonte: adaptado de SILVA et al., 2015.

### **1.7. Atividade Anticâncer de Chalconas-Sulfonamidas**

Poucos são os estudos que descrevem o mecanismo de ação antitumoral *in vitro* e/ou *in vivo* das chalconas-sulfonamidas. Alguns trabalhos recentes descrevem a síntese química destas moléculas, relatando o potencial citotóxico frente a células tumorais, como HEPG2 (Câncer de fígado), MCF-7 (Câncer de mama), SF-295 (Glioblastoma), PC-3 (Câncer de próstata) e HCT-116 (Câncer colorretal) (BONAKDAR et al., 2017; CUSTODIO et al, 2018; GHORAB et al., 2015). O efeito antitumoral destas moléculas pode estar relacionado com a inibição da anidrase carbônica, uma enzima que se encontra mais expressa em tumores hipóxicos e está envolvida na promoção de muitas mudanças adaptativas em tumores sólidos (PEERZADA et al., 2018). Além disso, as chalconas-sulfonamidas parecem interferir na capacidade de migração e na invasividade de células tumorais, demonstrando sua aparente importância na inibição da formação de metástases (EJAZ et al., 2017; LEE et al, 2010).

O mecanismo de ação anticâncer das chalconas-sulfonamidas ainda precisa ser explorado, visto que estas moléculas têm potencial para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento do câncer. Com isso, destaca-se a importância da realização do estudo mais aprofundado dos marcadores bioquímicos e moleculares de proliferação celular e das vias relacionadas com a indução do processo de morte celular a fim de esclarecer os mecanismos envolvidos no efeito antitumoral destas moléculas.

## 2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças complexas caracterizadas pelo crescimento descontrolado de células anormais com alto potencial invasivo. A complexidade patológica do câncer leva a alternativas terapêuticas muitas vezes utilizadas em associação no intuito de combater a carcinogênese. No entanto, nem sempre se tem alcançado resultados satisfatórios, observando-se elevadas taxas de recidiva do tumor e o aparecimento de metástases, além da indução de muitos efeitos colaterais (WEINBERG, 2013).

Atualmente, o câncer é considerado um problema de saúde pública mundial. O Instituto Nacional do Câncer – INCA, na última estimativa realizada para o biênio 2018/2019, considera que o Brasil deverá registrar 600 mil novos casos de câncer. Esse número vem aumentando a cada estimativa publicada pelo INCA, mostrando a relevância na realização de pesquisas cujo objetivo seja o tratamento do câncer em suas diversas modalidades. Apesar dos diversos esquemas terapêuticos já desenvolvidos para o tratamento do câncer, ainda se faz necessário o desenvolvimento de novos fármacos com toxicidade reduzida e índice terapêutico favorável, o que tem sido um desafio para a indústria farmacêutica (ALMEIDA et al., 2005).

Com isso, a química medicinal moderna tem investido no desenvolvimento de novos fármacos com base no conhecimento da fisiopatologia de doenças, no estudo de vias bioquímicas e na seleção de alvos moleculares, por meio da integração entre desenho molecular, síntese orgânica e avaliação biológica, a fim de identificar novos compostos com atividade biológica otimizada, baixa toxicidade e índice terapêutico favorável (ANDRICOPULO et al., 2009).

Neste contexto, as chalconas são importantes metabólitos secundários encontrados em algumas plantas comestíveis que demonstram um conjunto de propriedades farmacológicas, como antiprotozoário, antiinflamatório, imunomodulador, inibidor de óxido nítrico, anticâncer, anti-HIV, dentre outras (CHEN et al., 2013; COLE et al., 2016; HERENCIA et al., 1999; HSIEH et al., 2000; KARTHIKEYAN et al., 2015; LEÓN-GONZÁLEZ et al., 2015; MIHIGO et al., 2010; SAFDAR et al., 2017; WON et al., 2005). Diante disso, novas chalconas têm sido desenvolvidas a partir da inserção de grupos orgânicos, dentre eles as sulfonamidas. As sulfonamidas constituem um grupo de antibióticos sintéticos utilizados no tratamento de doenças infecciosas causadas por microrganismos. Além disso, estes compostos

têm sido identificados como agentes quimioterapêuticos (SOLOMONS; FRYHLE, 2009). Com isso, a introdução do grupo sulfonamida em chalconas tem sido uma ferramenta potente para a otimização da atividade biológica destes compostos (BAHEKAR et al., 2016).

O efeito antitumoral, antiinvasivo e antimigratório de algumas chalconas-sulfonamidas têm sido descrito (LEE et al, 2010; SILVA et al., 2015; EJAZ et al., 2017). No entanto, poucos são os estudos que descrevem o mecanismo de ação antitumoral destas moléculas. Logo, destaca-se a importância da síntese de novas chalconas-sulfonamidas como um atrativo para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento do câncer, e do estudo dos marcadores bioquímicos e moleculares de proliferação celular e das vias relacionadas com a indução do processo de morte celular, a fim de esclarecer os mecanismos envolvidos no efeito antitumoral destas moléculas.

Com isso, este trabalho teve como objetivo estudar o potencial antitumoral de novas chalconas-sulfonamidas sintéticas e os mecanismos envolvidos na atividade antiproliferativa da chalcona-sulfonamida sintética 185 (CSS185) por meio de ensaios *in vitro*. Para isso, foram utilizados marcadores bioquímicos e moleculares relacionados à proliferação celular e às vias relacionadas com a indução do processo de morte celular em células metastáticas derivadas de câncer colorretal (SW-620). O efeito antimigratório *in vitro* foi realizado utilizando o ensaio de migração celular em células B16F10.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

- ✓ Estudar o potencial antitumoral de novas chalconas-sulfonamidas sintéticas e os mecanismos envolvidos na atividade antiproliferativa e antimigratória da chalcona-sulfonamida sintética 185 (CSS185) por meio de ensaios *in vitro*.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar o potencial citotóxico de quatro novas chalconas-sulfonamidas sintéticas contra linhagens de células tumorais *in vitro*;
- ✓ Determinar a citotoxicidade das chalconas-sulfonamidas CSS99 e CSS185 frente a linhagens de células tumorais e não tumorais;
- ✓ Identificar o efeito antitumoral tempo/concentração dependente da CSS185 frente a linhagens de câncer colorretal (HCT-116 e SW-620);
- ✓ Monitorar em tempo real o efeito antiproliferativo da CSS185 contra a linhagem SW-620;
- ✓ Avaliar o efeito da CSS185 sobre a progressão do ciclo celular em células SW-620 de forma tempo e concentração dependente;
- ✓ Identificar as alterações morfológicas e o mecanismo molecular de indução de morte celular da CSS185 em células SW-620;
- ✓ Relacionar o efeito antitumoral da CSS185 frente a células SW-620 com possível indução de estresse oxidativo, dano de membrana citoplasmática e de DNA;
- ✓ Determinar o efeito antimigratório *in vitro* da CSS185 frente a células B16F10.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

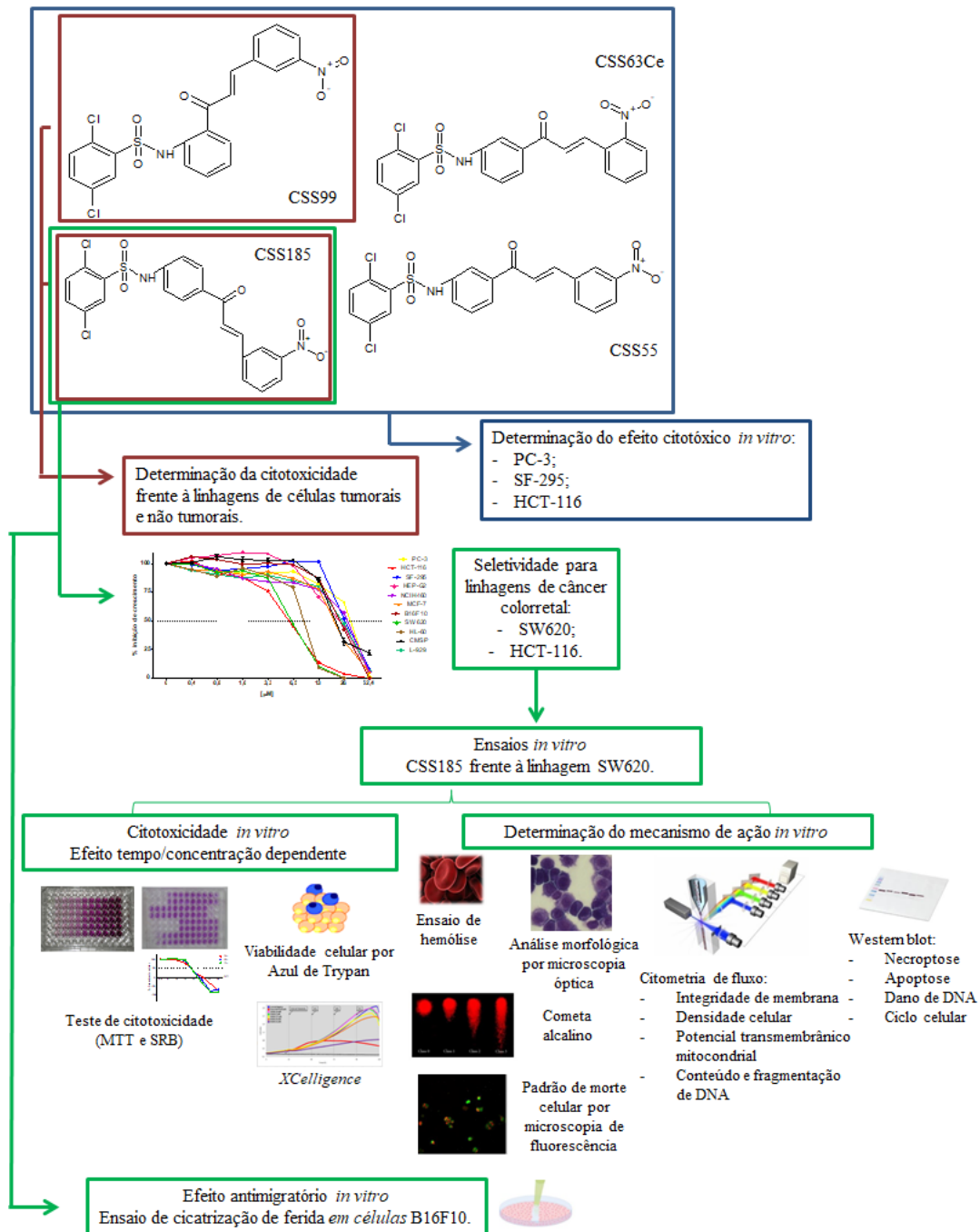
### 4.1. Materiais Utilizados

A descrição dos equipamentos, *softwares* de aquisição e análise de dados, bem como o fabricante dos reagentes utilizados está detalhada no Anexo A. As soluções preparadas e a descrição dos componentes dos kits utilizados estão detalhadas no Anexo B.

### 4.2. Planejamento Experimental

A Figura 9 apresenta o planejamento experimental onde estão ilustradas resumidamente todas as etapas deste trabalho. Quatro chalconas-sulfonamidas inéditas foram sintetizadas na Universidade Federal de Goiás (UFG), em colaboração com a Profa. Dra. Caridad Noda Perez e a Dra. Mirian Rita Carrilho de Castro. As amostras foram enviadas ao laboratório de Oncologia Experimental para realização de teste de atividade antitumoral *in vitro*. A triagem inicial para determinação do efeito citotóxico destes compostos foi realizado em três linhagens de células tumorais, utilizando o método do MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazólio). Após a identificação da atividade antiproliferativa dos compostos CSS99 e CSS185, o painel de linhagens celulares tumorais e não tumorais foi ampliado, sendo observado efeito citotóxico aparentemente seletivo do composto CSS185 para linhagens de células de câncer colorretal. Com isso, foram realizados ensaios para determinação do mecanismo de ação *in vitro* deste composto frente à linhagem SW-620, tais como: ensaio do SRB (sulforodamina B), para avaliação do perfil citotóxico/citostático do composto; ensaio de viabilidade celular por exclusão do azul de Tripán; monitoramento em tempo real do crescimento celular, utilizando *XCELLigence System*; avaliação da morfologia das células e do padrão de morte celular por microscopia óptica e de fluorescência; determinação da capacidade de induzir dano direto de membrana e dano de DNA, utilizando ensaio de hemólise e ensaio do cometa alcalino, respectivamente; estudo dos eventos celulares, utilizando a técnica de citometria de fluxo e expressão de proteínas, utilizando *Western blot*. Foi avaliado também o efeito antimigratório *in vitro* da CSS185 em células B16F10.

**Figura 9. Planejamento experimental.**



Fonte: elaborada pela autora.

### 4.3. Síntese Química de Novas Chalconas-sulfonamidas

As chalconas-sulfonamidas sintéticas inéditas (CSS185, CSS99, CSS63Ce e CSS55) foram sintetizadas por condensação de Claisen-Schmidt na Universidade Federal de Goiás (UFG), em colaboração com a Profa. Dra. Caridad Noda Peres e a pós-graduanda Mirian Rita Carrilho de Castro, e enviadas ao laboratório de Oncologia Experimental para realização de teste de atividade antitumoral *in vitro*.

### 4.4. Avaliação da Citotoxicidade *in vitro*

#### 4.4.1. Linhagens Celulares

As linhagens de células tumorais foram doadas pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (US-NCI, do inglês *United States – National Cancer Institute*) e utilizadas neste trabalho para avaliar a citotoxicidade dos compostos. A linhagem não tumoral de fibroblasto murino (L-929) foi obtida a partir do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ), enquanto que as células mononucleadas de sangue periférico (CMSP) foram obtidas de voluntários sadios, sendo utilizadas como modelo para a avaliação da citotoxicidade sobre células não tumorais (Tabela 1).

**Tabela 1. Linhagens celulares testadas durante o estudo**

<b>Linhagem celular</b>	<b>Tipo histológico</b>	<b>Origem</b>	<b>Concentração de plaqueamento (cél/mL)</b>
HCT-116	Carcinoma colorretal	Humana	$7 \times 10^4$
SW-620	Carcinoma colorretal metastático	Humana	$1 \times 10^5$
NCI-H460	Carcinoma de pulmão	Humana	$1 \times 10^5$
HEP-G2	Carcinoma hepatocelular	Humana	$1 \times 10^5$
PC-3	Adenocarcinoma de próstata	Humana	$1 \times 10^5$
SF-295	Glioblastoma	Humana	$1 \times 10^5$
MCF-7	Adenocarcinoma de mama metastático	Humana	$1 \times 10^5$
HL-60	Leucemia Promielocítica	Humana	$3 \times 10^5$
B16F10	Melanoma	Murino	$1 \times 10^5$
L-929	Fibroblastos	Murino	$1 \times 10^5$
CMSP	Células mononucleadas do sangue periférico	Humana	$1 \times 10^6$

Fonte: elaborada pela autora

#### **4.4.2. Manutenção das Linhagens Celulares**

As linhagens celulares foram cultivadas em garrafas de cultura de células de 25 cm<sup>2</sup> com volume de 50 mL ou de 75 cm<sup>2</sup> com volume de 250 mL em meio RPMI 1640 (Gibco) ou DMEM (Gibco), dependendo da linhagem, ambos suplementados com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina). As linhagens celulares foram manuseadas em ambiente estéril de câmara de fluxo laminar vertical (VECO, modelo Biosafe 12, classe II) e mantidas em incubadora a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> (NUAIRE, modelo *TS Autoflow*). A manutenção foi feita sempre que as células atingiam aproximadamente 70% de confluência. O crescimento das linhagens foi acompanhado diariamente por microscópio invertido (ZEISS, modelo Axiovert 40C).

Para a manutenção de células aderidas, o meio foi retirado e a garrafa lavada 2x com PBS (do inglês *Phosphate Buffer Solution*) estéril. Em seguida, foi adicionada tripsina-EDTA 0,5% (Gibco) diluída 10X em solução tampão (PBS), a fim de suspender as células. Depois de suspensas, a ação da tripsina foi inibida pela adição de meio suplementado com SBF. Parte das células foi removida da garrafa e o volume preenchido com meio completo. Para manutenção de células suspensas, apenas foi realizada a troca do meio.

#### **4.4.3. Obtenção de Células Mononucleadas do Sangue Periférico (CMSP)**

As células mononucleadas foram obtidas do sangue periférico de voluntários sadios coletado em tubos tipo *Vacutainer* contendo solução de EDTA K<sub>2</sub> (BD Vacutainer®). Após a coleta, 5 mL de sangue total foram diluídos em PBS (1:1) e vagarosamente depositados sobre 2 mL de Ficoll®-Hypaque (Sigma). Posteriormente, os tubos foram centrifugados por 30 minutos a 1500 rpm para separação das fases da solução. As células mononucleadas, concentradas na camada localizada na interface entre o plasma (fase clara) e os eritrócitos (fase escura), foram coletadas e transferidas para outro tubo onde foi acrescentado PBS, até atingir um volume final de 11 mL, sendo então centrifugado por 20 minutos a 1000 rpm. Esse procedimento foi repetido e o pellet de CMSP foi ressuspensionado em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (para uma concentração final de 100 U/mL penicillina, 100 µg/mL estreptomicina). Para estimular a proliferação dos linfócitos, foi adicionado ao meio 2% do agente mitogênico fito-hemaglutinina (Sigma). As células foram contadas, diluídas para uma concentração final de 1 x 10<sup>6</sup> células /mL, e então



plaqueadas para realização do teste de citotoxicidade, utilizando o método do MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazólio).

#### **4.4.4. Avaliação do efeito citotóxico utilizando o ensaio do MTT**

##### *Princípio do método*

O ensaio do MTT é um método colorimétrico quantitativo indireto que tem como objetivo quantificar a atividade mitocondrial por meio da redução do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazólio (MTT), de cor amarela, com consequente formação de cristais de formazan, de cor púrpura, em células metabolicamente ativas, sendo a quantificação realizada por absorvância em espectrofotômetro (MOSMANN, 1983).

##### *Procedimento Experimental*

As células em suspensão ou monocamadas foram plaqueadas em placas de 96 cavidades, sendo a concentração de plaqueamento determinada de acordo com as linhagens a serem testadas, descritas na Tabela 1. Após 24 horas de incubação em estufa a 37°C a 5% CO<sub>2</sub>, foi adicionado 100 µL de amostra teste diluídas em meio completo, em concentrações variaram de 52,4 a 0,4 µM, e as placas foram novamente incubadas por 72 horas. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo, com concentrações que variaram de 0,04 a 5 µM. Ao final do período de incubação, as placas foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 min e, em seguida, o sobrenadante foi retirado. Foi adicionado em cada poço 150 µL de solução de MTT (0,5 mg/mL), diluído em meio RPMI 1640, e as placas foram reincubadas por 3 horas. As placas foram, então, novamente centrifugadas a 3000 rpm por 10 min e o sobrenadante retirado. Para realização da leitura em espectrofotômetro de placa (Beckman Coulter Inc., modelo DTX-880), utilizando comprimento de onda de 595 nm, o formazan foi ressuspenso em 150 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) adicionado em cada poço. Para leitura foi utilizado o programa *Multimode Detection Software* (Beckman Coulter Inc.).

Para a análise do efeito tempo-dependente, este método também foi realizado após 24 e 48 horas de tratamento com a chalcona-sulfonamida 185 nas linhagens HCT-116 e SW-620.

### *Análise de dados*

Os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0. Os valores das absorbâncias foram transformados em porcentagem de inibição, baseado na média da absorbância do controle negativo. A concentração inibitória média (CI<sub>50</sub>) com os respectivos intervalos de confiança (IC 95%) foi obtida por regressão não linear.

O índice de seletividade (IS) dos compostos testados foi calculado a partir da razão entre o valor de CI<sub>50</sub> para linhagens não tumorais e para linhagens tumorais (IS= CI<sub>50</sub> de células não tumorais/ CI<sub>50</sub> de células tumorais) (BAGLA et al., 2014). O índice de seletividade da CSS185 para células de câncer colorretal quando comparado com as demais células tumorais também foi calculado.

#### **4.4.5. Avaliação do perfil citotóxico/citostático por meio do ensaio de Sulforodamina B (SRB)**

##### *Princípio do método*

O ensaio de Sulforodamina B baseia-se na habilidade do corante SRB (Sigma) de se ligar a resíduos de aminoácidos básicos em condições ácidas e de se dissociar em condições básicas, sendo possível determinar a densidade celular por meio do conteúdo celular proteico. Este corante possui dois grupos sulfônicos e se liga a proteínas das células precipitadas e fixadas na placa pelo ácido tricloroacético (TCA-Sigma). Diferente do método do MTT, o ensaio do SRB permite identificar o tipo de efeito exercido pela amostra teste, utilizando a absorbância do tempo zero e do controle negativo para normalizar os dados, sendo possível identificar se a amostra teste inibiu o crescimento celular ou induziu morte celular, ou ainda, se não causou nenhum efeito sobre as células. Além disso, este método também permite obter dados, como a concentração capaz de inibir 50% da proliferação celular (CI<sub>50</sub>), a concentração capaz de inibir o crescimento total das células (CI<sub>100</sub>) e a concentração capaz de induzir 50% de morte celular (CL<sub>50</sub>) (SHOEMAKER, 2006; VICHAI; KIRTIKARA, 2006).

##### *Procedimento Experimental*

As células foram contadas e plaqueadas em placas de 96 poços e após 24 horas de incubação em incubadora a 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, foi adicionado 100 µL de CSS185 diluída em meio completo em concentrações que variaram de 0,4 a 50 µM. A doxorubicina foi utilizada

como controle positivo, com concentrações que variaram de 0,04 a 5  $\mu\text{M}$ . As placas foram novamente incubadas por 24, 48 e 72 horas. Alguns poços foram fixados, corados e analisados no momento em que foi feito o tratamento das células para a determinação da absorbância do tempo zero ( $T_0$ ).

Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi retirado. Em seguida, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de TCA 10% em todos os poços e as placas foram incubadas por pelo menos 1 hora a 4°C para fixação das proteínas. Os poços foram lavados cinco vezes com 200  $\mu\text{L}$  de água destilada e 100  $\mu\text{L}$  de SRB 4% foram adicionados em todos os poços. As placas foram incubadas por 30 minutos em incubadora a 5% de  $\text{CO}_2$  a 37°C. Após o período de incubação, o corante foi removido e os poços foram lavados com 200  $\mu\text{L}$  de ácido acético. Por fim, o precipitado foi solubilizado em 200  $\mu\text{L}$  de tampão Tris base 10 mM e, em seguida, foi realizada a leitura em espectrofotômetro de placa (Beckman Coulter Inc., modelo DTX-880), utilizando o comprimento de onda de 540 nm. Para leitura foi utilizado o programa *Multimode Detection Software* (Beckman Coulter Inc.).

#### *Análise de dados*

Os valores de absorbância das amostras testadas (Abs) foram normalizados para obtenção dos percentuais de crescimento celular com base na média da absorbância do controle negativo (Ctrl) e do tempo zero ( $T_0$ ), sendo aplicadas as fórmulas  $(\text{Abs}-T_0)/(\text{Ctrl}-T_0)*100$ , para valores de absorbância maiores ou iguais ao tempo zero, e  $(\text{Abs}-T_0/T_0)*100$ , para valores de absorbância menores que o tempo zero. Os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism versão 6.0. A concentração capaz de inibir 50% da proliferação celular ( $\text{CI}_{50}$ ), a concentração capaz de inibir o crescimento total das células ( $\text{CI}_{100}$ ) e a concentração capaz de induzir 50% de morte celular ( $\text{CL}_{50}$ ) foi obtida por interpolação da curva concentração/resposta (BOYD; PAULL, 1995; SHOEMAKER, 2006).

#### **4.4.6. Quantificação direta da viabilidade celular utilizando o ensaio de exclusão por azul de Tripán**

##### *Princípio do método*

O teste de exclusão por azul de Tripán é um método quantitativo direto de avaliação da viabilidade celular, que permite quantificar separadamente células viáveis e células não

viáveis. O corante azul de Tripán penetra em todas as células, no entanto, apenas as células metabolicamente ativas (viáveis) conseguem expulsar o corante, enquanto que as células não viáveis retêm o corante e apresentam coloração azulada (PERES; CURI, 2005).

#### *Procedimento Experimental*

As células SW-620 foram plaqueadas na concentração de  $5 \times 10^4$  células por mL em placas de 24 poços. Após 24 horas de incubação, as células foram tratadas com CSS185 nas concentrações de 5; 7,5; 10 e 15  $\mu\text{M}$  por 48 horas. As concentrações e o período de incubação foram determinados a partir dos resultados obtidos pelos ensaios de MTT e SRB. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo na concentração de 0,5  $\mu\text{M}$ . Após o período de incubação as células foram transferidas para tubos eppendorf, que em seguida foram centrifugados por 5 minutos a 1500 rpm. O pellet foi ressuspense em 1 mL de PBS. Em uma alíquota de 90  $\mu\text{L}$  de suspensão de células, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de azul de Tripán 0,4%. As células viáveis e não viáveis foram contadas em câmara de Neubauer.

#### *Análise de dados*

Os dados foram analisados com base na média  $\pm$  erro padrão da média da triplicata de pelo menos três experimentos. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) seguida por teste de Tukey's para comparação com o controle negativo, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

#### **4.4.7. Monitoramento da viabilidade e da proliferação celular em tempo real utilizando o sistema XCELLigence**

##### *Princípio do método*

O XCELLigence System RTCA DP (Dual Plate) permite monitorar a proliferação celular de maneira dinâmica em tempo real. O equipamento é capaz de quantificar a proliferação e a viabilidade de células aderidas por impedância detectada por sensores microeletrônicos presentes na superfície dos poços de placas de 16 poços. O ensaio permite a avaliação da proliferação, viabilidade, morte e alterações morfológicas nas células, como aumento do tamanho celular (KE et al., 2011).

##### *Procedimento experimental*

Seguindo as sugestões do fabricante, foi realizada uma curva de concentração de células para a escolha do número de células ideal para o experimento. Com isso, a

concentração de plaqueamento, escolhida com base no índice celular, foi de  $5 \times 10^3$  células por poço. As células SW-620 foram plaqueadas nas E-plates de 16 poços (190  $\mu\text{L}$ ). A aderência, disposição e proliferação das células foram monitoradas a cada 30 minutos pelo sistema RT-DP. Aproximadamente 24 horas após o plaqueamento, quando as células estavam em fase de crescimento logarítmica, as mesmas foram tratadas com 10  $\mu\text{L}$  dos compostos dissolvidos em meio de cultura. O Dimetilsulfóxido (DMSO), veículo dos compostos teste, foi utilizado como controle negativo. O composto CSS185 foi testado nas concentrações de 2,5; 5; 7,5; 10 e 15  $\mu\text{M}$  e a doxorubicina, utilizada como controle positivo, foi testada na concentração de 0,5  $\mu\text{M}$ . As concentrações foram determinadas a partir dos resultados obtidos pelos ensaios de MTT e SRB.

#### *Análise de dados*

O resultado de impedância celular foi expresso como uma unidade arbitrária chamada de Índice Celular (do inglês, *Cell Index*). 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. Para obtenção de gráficos representativos do percentual de proliferação celular, a média do índice celular foi normalizada com base no controle negativo (veículo) referente a cada período de incubação analisado (24 h, 48 h e 72 h). Os gráficos foram construídos no programa GraphPad Prism 5.0.

### **4.5. Estudo do mecanismo de ação**

#### **4.5.1. Determinação da atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos *Mus musculus Swiss***

##### *Princípio do método*

O ensaio de hemólise permite avaliar o potencial da substância teste de causar dano direto na membrana celular de eritrócitos, seja pela formação de poros ou pela ruptura total através da quantificação espectrofotométrica da hemoglobina liberada em solução salina (BERLINCK et al., 1996).

##### *Procedimento experimental*

A coleta de sangue para o experimento de atividade hemolítica foi realizada em quatro camundongos (linhagem *Mus musculus Swiss*), tendo aprovação do comitê de ética em

pesquisa animal (protocolo n° 128/2016 – Anexo C). Os animais receberam anestesia geral com cloridrato de xilazina (10 mg/kg) e cloridrato de ketamina (90 mg/kg) e, em seguida, 2 – 3 ml de sangue foi coletado pelo plexo retro-orbital com o auxílio de um capilar. A eutanásia dos animais foi realizada por hipovolemia.

O sangue coletado foi diluído em 30 volumes de solução salina (NaCl 0,85% + CaCl<sub>2</sub> 10mM). Os eritrócitos foram lavados duas vezes em solução salina por centrifugação (1500 rpm / 5 min) para redução da contaminação plasmática e ressuspensos em solução salina para se obter uma suspensão de eritrócitos (SE) a 2%. Os experimentos foram realizados em placas com 96 cavidades, com a concentração da amostra CSS185 variando de 0,4 a 300 µM. Cada poço da 1ª fileira recebeu 100 µL da solução salina. Na 2ª, os poços receberam 80 µL da solução salina e 20 µL do veículo de diluição da amostra CSS185, neste caso, DMSO. Aos poços da 3ª fileira, foram adicionados 180µL de solução salina e 20 µL da amostra CSS185 em solução. Da 4ª fileira em diante os poços receberam 100 µL da solução salina, para realização da diluição seriada da amostra, com exceção da última fileira, que receberam 80 µL de solução salina e 20 µL de triton X-100 1% (controle positivo). As diluições foram feitas da 3ª à 11ª cavidade, retirando-se 100µL da solução da cavidade anterior e transferindo para a seguinte de modo que as concentrações foram sempre diluídas pela metade. Em seguida, 100µL da suspensão de eritrócitos 2% foram plaqueados em todos os poços. Após incubação de 1 hora sob agitação constante à temperatura ambiente (26 ± 2°C), as amostras foram centrifugadas (5000 rpm/ 3 min) e o sobrenadante transferido para uma outra placa para a medida da absorbância no espectrofotômetro de placas, utilizando comprimento de onda de 540 nm.

#### *Análise de dados*

A atividade hemolítica do composto CSS185 foi determinada a partir da normalização dos valores de absorbância a partir dos valores de absorbância dos controles positivo e negativo.

#### **4.5.2. Avaliação das alterações morfológicas por coloração com panótico rápido**

##### *Princípio do método*

A coloração com kit panótico rápido (Laborclin®) permite a visualização das características morfológicas das células por meio da coloração diferenciada da membrana celular, do citoplasma e do núcleo, sendo possível observar, por exemplo, alterações morfológicas que caracterizam diferentes processos de morte celular (GURR, 1971).

##### *Procedimento experimental*

As células SW-620 foram plaqueadas na concentração de  $5 \times 10^4$  células/mL em placas de 24 poços e, após 24 horas, foram tratadas com diferentes concentrações de CSS185 (5; 7,5; 10 e 15  $\mu\text{M}$ ), sendo incubadas por 24 e 48 horas em incubadora com 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ . A doxorrubicina (0,5  $\mu\text{M}$ ) foi utilizada como controle positivo, e o controle negativo foi tratado apenas com o veículo (DMSO). Após os períodos de incubação, as células 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®) para coloração de núcleo e citoplasma. Os poços foram lavados para remover o excesso de corante e, em seguida, as células foram visualizadas em microscópio óptico e fotografadas no aumento de 200x (Olympus, Tokyo, Japan).

#### **4.5.3. Análises por Citometria de Fluxo**

##### *Princípio da citometria de fluxo*

A citometria de fluxo é uma importante ferramenta de estudo de eventos celulares, que permite rápida e individualizada avaliação de uma quantidade significativa de células e de múltiplos parâmetros simultaneamente. Por meio do citômetro de fluxo, células em suspensão são contadas, examinadas e classificadas individualmente conduzidas em um canal de corrente fluida, sendo interceptadas por um feixe de luz proveniente de um laser. O equipamento detecta, desta maneira, a dispersão de cada célula em várias direções dependendo do tamanho, da estrutura interna, das características topográficas e da densidade óptica de cada célula. A detecção de um feixe de luz que passa pela partícula com um mínimo de desvio está relacionada com o tamanho celular, que se dá por dispersão linear (FSC, *Forward Scatter*), enquanto que a captação de um desvio ortogonal está relacionada com a complexidade da célula, em particular sua granulosidade, que ocorre por dispersão lateral

(SSC, *Side Scatter*). Além disso, a citometria de fluxo permite também detectar a fluorescência emitida por corantes químicos fluorescentes ligados a diferentes componentes celulares (SHAPIRO, 1995).

#### *Procedimento experimental para a realização dos experimentos de citometria de fluxo*

Todos os experimentos de citometria de fluxo foram realizados utilizando o citômetro Guava easyCyte™ 6-2L. As células SW-620 foram plaqueadas na concentração de  $5 \times 10^4$  células/mL em placas de 24 poços e, após 24 horas, foram tratadas com diferentes concentrações de CSS185 (5, 7,5, 10 e 15  $\mu\text{M}$ ), sendo incubadas por 24 e 48 horas em incubadora com 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ . A doxorrubicina (0,5  $\mu\text{M}$ ) foi utilizada como controle positivo, e o controle negativo foi tratado apenas com o veículo (DMSO). Após o período de incubação as células foram transferidas para tubos eppendorf, que em seguida foram centrifugados por 5 minutos a 1500 rpm. O pellet foi ressuspenso em 1 mL de PBS.

As células foram coradas utilizando os corantes, iodeto de propídeo e rodamina 123, de acordo com o evento celular de interesse, para o estudo da viabilidade celular, do conteúdo de DNA e do potencial transmembrânico mitocondrial.

#### *Análise de dados para os experimentos de citometria de fluxo*

A análise dos dados da citometria de fluxo foi feita com base na média  $\pm$  erro padrão da média e para a verificação da ocorrência de diferença estatística entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Tukey's, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). Para todos os parâmetros avaliados pela técnica de citometria de fluxo, 10 mil eventos foram adquiridos por cada replicada de cada amostra. Cada experimento foi realizado em triplicata e os resultados foram obtidos a partir de pelo menos três experimentos independentes.

#### **4.5.3.1. Avaliação do número de células e da integridade de membrana celular**

##### *Princípio do teste*

O iodeto de propídeo (PI, do inglês, *propidium iodide*) é um corante capaz de penetrar nas células cuja membrana esteja rompida (não-viáveis) e se ligar ao DNA, emitindo alta



fluorescência vermelha quando é excitado pelo laser. Enquanto isso, as células com membrana íntegra emitem baixa fluorescência (SHAPIRO, 1995).

#### *Procedimento experimental*

Após o período de tratamento, uma alíquota de 300 µL de suspensão de células tratadas e não tratadas foi incubada no escuro com 30 µL de uma solução de PI a 50 µg/mL (diluído em tampão fosfato). Após 10 minutos, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo. Foram obtidas informações sobre a contagem do número de células, morfologia (espalhamento frontal e lateral da luz, o que corresponde ao tamanho e granulosidade relativa entre as células, respectivamente) e integridade de membrana celular (DARZYNKIEWICZ et al., 1992).

#### **4.5.3.2. Avaliação do conteúdo e da fragmentação de DNA**

##### *Princípio do teste*

Esse teste baseia-se na capacidade do PI se ligar ao DNA. Inicialmente, a membrana plasmática das células foi permeabilizada por um detergente, permitindo que o iodeto de propídeo se ligasse ao DNA de todas as células. Células com o núcleo íntegro emitem alta fluorescência, e aquelas que apresentam núcleos com condensação da cromatina e DNA fragmentado incorporam menos o iodeto de propídeo e por isso emitem menor fluorescência. Além disso, o PI se intercala proporcionalmente à quantidade de DNA da célula, permitindo mensurar as fases do ciclo celular por meio da quantidade de DNA presente em cada fase do ciclo.

##### *Procedimento experimental*

Para realização do ensaio, uma alíquota de 300 µL de suspensão de células tratadas e não tratadas foi incubada com 3 µL de uma solução de lise (0,1% de citrato de sódio, 0,1 % de Triton X-100 em PBS) e 30 µL de iodeto de propídeo (50 µg/mL) em PBS. Após o período de incubação de 40 minutos no escuro, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo.

Para aquisição do percentual de células em cada fase do ciclo celular (G0/G1; S; G2/M), os gráficos gerados pelo citômetro de fluxo foram analisados no programa ModFit LT

(Verity Software House). A fragmentação de DNA foi quantificada pelo percentual de Sub-G1 (debris), dados obtidos pelo mesmo programa.

#### **4.5.3.3. Determinação do potencial mitocondrial transmembrânico – Rodamina 123**

##### *Princípio do teste*

A rodamina 123 é um corante fluorescente nucleofílico que, quando em contato com a célula, é sequestrado pra dentro da mitocôndria quando esta apresenta seu potencial transmembrânico inalterado, emitindo, assim, alta fluorescência quando atingidas pelo laser. Alterações no potencial mitocondrial transmembrânico levam ao efluxo da rodamina, gerando eventos que emitirão menor fluorescência quando comparado com as células que possuem mitocôndrias íntegras (FERLINI; SCAMBIA, 2007).

##### *Procedimento experimental*

Para realização do ensaio, uma alíquota de 200 µL de suspensão de células tratadas e não tratadas foi centrifugada e o pellet foi ressuspenso em 200 µL de solução de rodamina 123 (1 µg/mL). Após 15 minutos de incubação em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C no escuro, as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 200 µL de PBS e reincubadas por mais 30 minutos no escuro em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo (CURY-BOAVENTURA; POMPÉIA; CURI, 2004).

#### **4.5.4. Avaliação da indução de estresse oxidativo utilizando pré-tratamento com N-acetilcisteína (NAC)**

##### *Princípio do teste*

A N-acetil-cisteína (NAC) é um aminotiol precursor sintético de cisteína intracelular e de glutathiona (GSH) e, portanto, considerado um importante agente antioxidante capaz de sequestrar as espécies reativas de oxigênio (EROs) formadas durante o estresse oxidativo na célula. Com isso, a NAC tem sido amplamente utilizada como ferramenta de pesquisa para investigar o papel das EROs na indução de morte celular, como na apoptose (SUN, 2010).

### *Procedimento experimental*

As células SW-620 foram plaqueadas em placas de 96 poços. Após 24 horas de incubação em estufa a 37°C a 5% CO<sub>2</sub>, as células foram pré-tratadas com NAC (4 mM) por duas horas. Após o período de incubação, o meio contendo NAC foi removido e as células foram tratadas com 200 µL de CSS185 e Menadiona (controle positivo) diluídas de forma seriada em meio completo em concentrações que variaram de 50 µM a 0,2 µM. As placas foram novamente incubadas por 48 horas. Uma placa controle sem nenhum pré-tratamento foi feita concomitante ao pré-tratamento para assegurar que o NAC não estaria alterando a viabilidade celular. Ao final do período de incubação, as placas foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 min e, em seguida, o sobrenadante foi retirado. Foi adicionado em cada poço 150 µL de solução de MTT (0,5 mg/mL), diluído em meio RPMI 1640, e as placas foram reincubadas por 3 horas. As placas foram, então, novamente centrifugadas a 3000 rpm por 10 min e o sobrenadante retirado. Para realização da leitura em espectrofotômetro de placa (Beckman Coulter Inc., modelo DTX-880), utilizando comprimento de onda de 595 nm, o formazan foi ressuspensado em 150 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) adicionado em cada poço. Para leitura foi utilizado o programa *Multimode Detection Software* (Beckman Coulter Inc.).

### *Análise de dados*

Os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0. Os valores das absorbâncias foram transformados em porcentagem de inibição, baseado na média da absorbância do controle negativo. A concentração inibitória média (CI<sub>50</sub>) com os respectivos intervalos de confiança (IC 95%) foi obtida por regressão não linear.

#### **4.5.5. Determinação do potencial genotóxico utilizando ensaio do Cometa Alcalino**

##### *Princípio do teste*

O ensaio do cometa, também conhecido como *single-cell gel electrophoresis* (SCGE), é utilizado para detecção de dano genotóxico induzido por compostos químicos. Existem dois protocolos principais para a execução deste teste. A versão alcalina, mais utilizada por ser mais abrangente, é realizada em pH maior que 13 afim de induzir a desnaturação da molécula de DNA e detectar lesões de diversas naturezas, como quebras de fita simples e dupla, sítios álcali-lábeis, sítios de reparo por excisão incompletos e ligações cruzadas. A versão neutra,

por sua vez, é realizada em pH entre 7,0 e 8,5 para detectar apenas quebras de fita dupla de DNA ou ligações cruzadas entre DNA e DNA, DNA e proteína ou DNA e xenobióticos (OLIVE, 1989; OSTLING; JOHANSON, 1984; SINGH et al., 1988).

### *Procedimento experimental*

Para avaliação de possível dano genotóxico induzido pela chalcona-sulfonamida 185 em células SW-620, foi utilizado o teste do cometa alcalino. As células SW-620 foram plaqueadas na concentração de  $5 \times 10^4$  células/mL em placas de 24 poços e, após 24 horas, foram tratadas com diferentes concentrações de CSS185 (7,5, 10 e 15  $\mu\text{M}$ ), sendo incubadas por 24 horas em incubadora com 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ . A doxorrubicina (0,5  $\mu\text{M}$ ) foi utilizada como controle positivo, e o controle negativo foi tratado apenas com o veículo (DMSO). Após o período de incubação as células foram transferidas para tubos eppendorf, que em seguida foram centrifugados por 5 minutos a 1500 rpm.

### Preparo das lâminas

Lâminas de vidro foram previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal (Gibco) diluída a 0,5% em solução de PBS livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  à temperatura de  $60^\circ\text{C}$  e, em seguida, mantidas em temperatura ambiente até completa solidificação. O pellet de células tratadas e não tratadas foi ressuspenso em 200  $\mu\text{L}$  de solução de agarose de baixo ponto de fusão (1,5%; Gibco) a  $37^\circ\text{C}$ , e 100  $\mu\text{L}$  foi adicionado em cada lâmina pré-coberta com agarose, sendo obtidas duas lâminas de cada replicata. Para uniformizar a distribuição do material, as lâminas foram cobertas com lamínulas e mantidas a  $4^\circ\text{C}$  para solidificação da agarose.

### Lise celular

Após a solidificação, as lamínulas foram cuidadosamente removidas e as lâminas foram imersas em solução de lise (descrita no Anexo B) a  $4^\circ\text{C}$  e mantidas por, no mínimo, duas horas, protegidas da luz.

### Neutralização e eletroforese

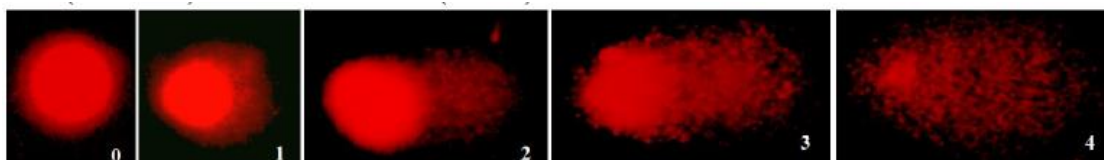
Ainda sobre proteção da luz, as lâminas foram imersas em uma solução de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) por 15 minutos. Em seguida, as lâminas foram dispostas

horizontalmente na cuba de eletroforese que, por sua vez, foi preenchida com o tampão de corrida alcalino (descrito no Anexo B) a 4°C. Após 60 minutos, a eletroforese (cuba BioRad, modelo *DNA Sub Cell Gel*) foi conduzida a 20 V e 300 mA (fonte *Life Technologies*, modelo 250) por 20 minutos a 4°C. Após a eletroforese, as lâminas foram novamente neutralizadas por 5 minutos e fixadas em etanol a 100%.

### Coloração e análise das lâminas

A coloração das lâminas foi realizada com solução de brometo de etídio (Sigma) a 20 µg/mL. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência e classificadas de acordo com os escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa (Figura 10). Foram contados 100 cometas por lâmina e atribuídos, por análise visual, a uma das cinco categorias - sem dano (0), baixo nível de dano (1), médio nível de dano (2), alto nível de dano (3) e dano máximo (4) - que relacionam a percentagem de DNA na cauda do cometa ao grau da lesão sofrida pela célula (LOVELL; THOMAS; DUBOW, 1999).

**Figura 10. Tipos de cometa e classificação por categoria de dano: 0 - sem dano (cauda < 5%); 1 - baixo nível de dano (5 - 20%); 2 - médio nível de dano (20 - 40%); 3 - alto nível de dano (40 - 95%) e 4 - dano máximo (> 95%).**



Fonte: adaptado de LOVELL; THOMAS; DUBOW, 1999.

O índice de dano (ID) foi obtido pela seguinte fórmula:

$$ID = \sum_{i=0}^4 n_i \times i$$

Onde  $n_i$  é o número de células com nível de dano  $i$  (0, 1, 2, 3 ou 4). A frequência de dano (FD) representa a percentagem de células que sofreram danos no DNA.

### *Análise de dados*

A análise dos dados foi feita com base na média  $\pm$  erro padrão da média de dois experimentos independentes (n=8) e para a verificação da ocorrência de diferença estatística entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA)

seguida por Teste de Tukey's, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ), utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0.

#### **4.5.6. Detecção e quantificação do padrão de morte celular por microscopia de fluorescência utilizando coloração com laranja de acridina e brometo de etídio**

##### *Princípio do teste*

A coloração utilizando dupla marcação com laranja de acridina e brometo de etídeo permite a detecção e quantificação de células em apoptose inicial, tardia e necrose, utilizando parâmetro de cor e aspectos morfológicos. Esta distinção é possível porque, enquanto a laranja de acridina penetra nas células vivas e mortas, resultando em emissão de fluorescência verde por intercalar no DNA e laranja, no RNA, o brometo de etídeo penetra somente nas células que possuem perda da integridade de membrana (apoptose tardia ou necrose), emitindo fluorescência laranja ao intercalar o DNA (KASIBHATLA et al., 2006).

##### *Procedimento experimental*

As células SW-620 foram plaqueadas na concentração de  $5 \times 10^4$  células/mL em placas de 24 poços e, após 24 horas, foram tratadas com diferentes concentrações de CSS185 (7,5, 10 e 15  $\mu\text{M}$ ), sendo incubadas por 24 e 48 horas em incubadora com 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ . A doxorubicina (0,5  $\mu\text{M}$ ) foi utilizada como controle positivo, e o controle negativo foi tratado apenas com o veículo (DMSO). Após o período de incubação, as células foram tripsinizadas, transferidas para tubos eppendorf, centrifugadas e ressuspensas em PBS. Uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  de suspensão de célula foi retirado e transferido para outro tubo. Foi preparada uma solução contendo 8  $\mu\text{L}$  de PBS, 2  $\mu\text{L}$  de laranja de acridina e 10  $\mu\text{L}$  de brometo de etídeo (20  $\mu\text{g/mL}$ ), sendo adicionado 1  $\mu\text{L}$  desta solução aos 50  $\mu\text{L}$  de suspensão de células. Trezentas células foram classificadas e contadas em microscópio de fluorescência.

##### *Análise de dados*

A análise dos dados foi feita com base na média  $\pm$  erro padrão da média de pelo menos três experimentos independentes e para a verificação da ocorrência de diferença estatística entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Tukey's, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ), utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0.

#### 4.5.7. Avaliação da expressão de proteínas por Western Blot

O *Western blot*, também chamado de *immunoblot*, é um método bioquímico e molecular utilizado para detectar a expressão proteica de uma determinada proteína em uma amostra, usando um anticorpo mono ou policlonal específico para a proteína de interesse (SIVIERO, 2013).

O procedimento de realização do ensaio do *Western blot* consiste em várias etapas: extração e quantificação de proteínas totais das células submetidas ao tratamento com o composto, separação das proteínas desnaturadas por peso molecular, utilizando eletroforese vertical em gel de poliacrilamida, eletrotransferência das proteínas para uma membrana capaz de ligar proteínas e a revelação de proteínas específicas, utilizando quimioluminescência (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979).

Os anticorpos primários (*Cell Signaling Technology*®) utilizados no experimento foram PARP (poli (ADP-ribose polimerase) íntegro, Bax, Caspases 3 e 8, MLKL (do inglês, *Mixed Lineage Kinase Domain Like*), RIP (do inglês, *Receptor-interacting Protein*), p53, Ciclina A2 e B1, pChk1 e pChk2. 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*®) acoplados à peroxidase (HRP) foram utilizados na detecção final das proteínas por quimioluminescência. Todos os anticorpos foram solubilizados em BSA 5%, diluídos de 1:1000, exceto a  $\beta$ -actina e os anticorpos secundários que foram preparados em diluição de 1:2000.

##### 4.5.7.1. Extração de proteínas

As células SW-620 foram plaqueadas e tratadas com o veículo (DMSO), com CSS185 nas concentrações de 10  $\mu$ M e 15  $\mu$ M e com a doxorrubicina na concentração de 0,5  $\mu$ M, utilizada controle positivo do experimento, durante 24 horas de incubação. Para o processo de extração, as células foram tripsinizadas e centrifugadas e o pellet lavado duas vezes com PBS. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em tampão de lise RIPA (*Milipore*) 1X acrescido de um coquetel de inibidores de proteases (1:100 v/v), ortovanodato de sódio (1:100 v/v) e PMSF (1:100 v/v). As amostras foram colocadas em gelo por duas horas, sendo sonicadas a cada 20 minutos. Ao final, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado, separado em alíquotas e armazenado a -20°C.

#### 4.5.7.2. Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas totais extraídas das células foi realizada por meio de método colorimétrico com o kit *DC Protein Assay (BioRad Laboratories)*, utilizando o método de Lowry. Para isso, uma curva padrão de BSA (0,2-2 mg/mL; Sigma) diluída em tampão RIPA completo foi utilizada para determinar a concentração de proteína. O tampão RIPA completo foi utilizado para marcar o branco experimental. Em seguida, 5 µL de cada amostra foi adicionado em triplicata em placa de 96 poços. Foram adicionados em todos os poços 25 µL de reagente A' (20 µL de reagente S + 1 mL de reagente A) seguido de 200 µL de reagente B (*BioRad Laboratories*). As amostras foram incubadas por 10 minutos no escuro sob agitação leve e lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 620 nm.

A curva de BSA foi gerada por regressão linear no programa GraphPad Prism versão 5.0, sendo plotado um gráfico da absorbância *versus* quantidade de proteínas. Os valores de absorbância obtidos de cada amostra foram aplicados à equação da reta para determinar a concentração de proteína de cada amostra.

#### 4.5.7.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A separação das proteínas totais baseada no peso molecular foi realizada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida em um sistema vertical (BioRad, modelo *mini-PROTEAN® Tetra Cell*) (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979). O gel de resolução foi confeccionado para uma concentração final de 12,5% em tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 (*BioRad Laboratories*). O gel de empilhamento foi colocado sobre o gel de 12,5%, com concentração final de 5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 (*BioRad Laboratories*).

O marcador de peso molecular *Full-Range Rainbow Marker* (12-225 kDa; *GE Healthcare*) foi usado sempre no primeiro poço da esquerda para monitorar a separação das proteínas. Foi aplicado nos poços do gel de concentração 30 µg de proteína total de cada amostra, carregada com o tampão de amostra 5X (Anexo B). A corrida de eletroforese foi realizada sob voltagem constante de 100 V e amperagem livre (para duas placas; fonte elétrica *PowerPac™*, modelo *HCPower Supply*) à temperatura ambiente, utilizando um tampão de corrida para eletroforese. O tempo de corrida variou entre 1h e 40 minutos a 2 horas.



#### **4.5.7.4. Eletrotransferência**

As proteínas separadas foram transferidas para uma membrana de PVDF Hybond-P (*GE Healthcare*). Para isso, o gel foi colocado em contato com a membrana previamente lavada em metanol entre esponjas e papéis de filtro banhados na solução de transferência (detalhado no Anexo B). A eletrotransferência foi realizada pelo modo de imersão (BioRad, modelo *MiniTrans Plot Modulo*) sob voltagem livre e amperagem de 400 mA por 1h e 20 minutos a 4°C (fonte elétrica *PowerPac™*, modelo *HCPower Supply*).

#### **4.5.7.5. Imunodeteção e Quimioluminescência**

Após a transferência, as membranas foram incubadas em solução de leite desnatado 3% em TBS por uma hora sob agitação constante, a fim de bloquear ligações proteicas inespecíficas. Após o período de incubação, foram realizadas três lavagens com TBS-Tween 0,1% (TBS-T) de 5 minutos e mais uma lavagem com TBS. As membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com os anticorpos primários diluídos em solução de BSA 5% em TBS. Após o mesmo processo de lavagem realizada anteriormente com TBS-T e TBS, as membranas foram incubadas por uma hora com o anticorpo secundário ligado à peroxidase (HRP) diluído em solução de leite desnatado 5% em TBS por 1 hora, sob agitação. As membranas foram então novamente lavadas e a revelação foi realizada utilizando peróxido de hidrogênio e luminol (kit *Clarity and Clarity Max Western ECL Blotting Substrates* - BioRad).

As membranas foram fotografadas por um captor de imagens (*GE Healthcare*, modelo *ImageQuant® 300*) utilizado para captação de quimioluminescência gerado pelo método de detecção de bandas. As imagens foram editadas no próprio programa para sobreposição de imagem das bandas e do marcador e, em seguida, foram quantificadas utilizando o programa Image J. Os valores de quantificação foram obtidos a partir da normalização dos dados com base na quantificação da  $\beta$ -actina (anticorpo de referência experimental).

### **4.5.8. Avaliação do efeito antimigratório *in vitro* da chalcona-sulfonamida 185 em células B16F10**

#### **4.5.8.1. Ensaio de migração celular**

*Princípio do teste*

O ensaio de migração celular, do inglês *Wound-healing assay*, é um método simples, de baixo custo e um dos primeiros métodos desenvolvidos para o estudo da migração celular

*in vitro*. As etapas básicas do ensaio envolvem a realização de uma “ferida” em uma monocamada de células, com captura de imagens no início e em intervalos regulares durante a migração celular até o fechamento da ferida, sendo realizada comparação entre as imagens a fim de observar a migração das células (LIANG; PARK; GUAN, 2007; RODRIGUEZ; XU; GUAN, 2005).

#### *Procedimento experimental*

As células B16F10 foram plaqueadas em placas de 24 poços contendo 1 mL de meio de cultura suplementado com 10% de SBF. Quando as células atingiram confluência de aproximadamente 90%, foi realizada uma lesão na monocamada de células utilizando uma ponteira (p200) pressionada contra o assoalho da placa de cultura, formando uma fenda na camada de células. A cultura foi lavada três vezes com PBS para retirada completa dos resíduos celulares da fenda formada. Em seguida, foi adicionado 1 mL de meio suplementado com apenas 0,25% de SBF a fim de induzir privação de nutrientes e inibir a proliferação celular. Os poços foram fotografados (aumento 50x) a fim de capturar imagens correspondentes ao tempo zero ( $T_0$ ) de cada poço.

As células foram então tratadas com concentrações não citotóxicas de CSS185 (2,5 e 5  $\mu\text{M}$ ) e o controle negativo recebeu o veículo utilizado para diluição do composto (DMSO). A migração celular foi monitorada após 3, 6, 12 e 24 horas de incubação, até que ocorresse o fechamento do corte induzido pela migração das células do controle negativo. As células foram visualizadas em microscópio óptico e fotografadas novamente no aumento de 50x para fins comparativos (Olympus, Tokyo, Japan).

Após a captura de imagem, as células foram tripsinizadas, coradas com iodeto de propídeo, contadas e analisadas, utilizando citometria de fluxo, para confirmar que as células estavam migrando e não proliferando e que as concentrações utilizadas de CSS185 não interferiram na proliferação e na viabilidade celular das células B16F10.

#### *Análise de dados*

O percentual de migração celular foi quantificado baseado na área do corte do tempo zero e após 24 horas de incubação, utilizando o programa Image J. A migração das células para a área de corte foi expressa como percentual de migração celular, pela seguinte equação:

$$\% \text{ migração celular} = [(A_{T_0} - A_{T_{24h}}) / A_{T_0}] \times 100\%$$

onde,  $A_{T_0}$  é a área do corte mensurada imediatamente após a realização da mesma, e  $A_{T_{24h}}$  é a área do corte 24 horas após a realização da mesma (YUE et al., 2010).

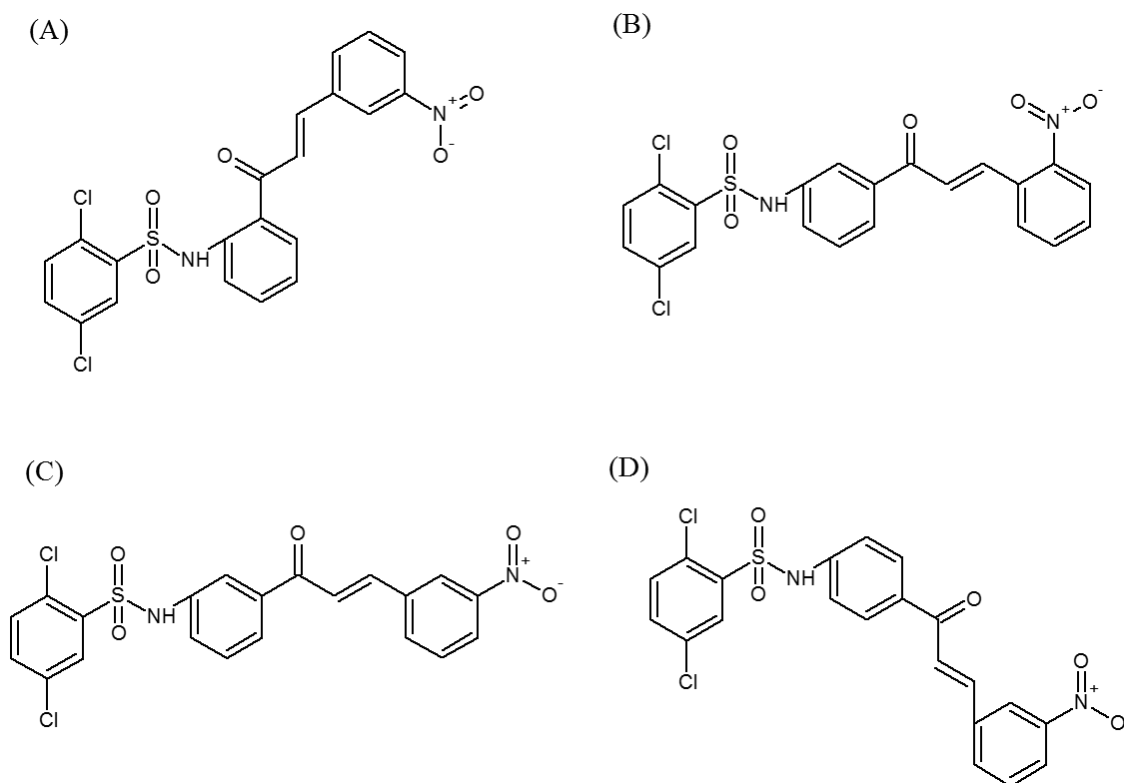
A análise dos dados foi feita com base na média  $\pm$  erro padrão da média de pelo menos dois experimentos independentes realizados em triplicata e para a verificação da ocorrência de diferença estatística entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Tukey's, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ), utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Avaliação do potencial citotóxico de novas chalconas-sulfonamidas sintéticas

Quatro novas chalconas-sulfonamidas foram sintetizadas na Universidade Federal de Goiás e enviadas ao Laboratório de Oncologia Experimental para avaliação do potencial citotóxico frente a linhagens de células tumorais. As chalconas-sulfonamidas sintéticas (CSS) utilizadas neste estudo apresentam estrutura química similar, com mesma fórmula molecular ( $C_{21}H_{14}O_5SN_2Cl_2$ ) e peso molecular (477.312 g/mol), apresentando apenas mudanças na posição do grupamento sulfonamida e do radical nitro ( $NO_2$ ) (Figura 11).

**Figura 11. Estrutura química das chalconas-sulfonamidas (CSS). (A) CSS99; (B) CSS63Ce; (C) CSS55; (D) CSS185.**



Fonte: Estruturas desenhadas pelo grupo de pesquisa da Universidade Federal de Goiás.

O potencial citotóxico dos compostos foi avaliado inicialmente contra as células tumorais SF-295, PC-3 e HCT-116 pelo ensaio do MTT. O composto CSS63Ce não mostrou efeito citotóxico frente às linhagens de células tumorais testadas, apresentando valor de  $CI_{50}$  maior que 52  $\mu$ M. Os compostos CSS55, CSS99 e CSS185, por sua vez, apresentaram efeito citotóxico frente a todas as linhagens de células tumorais testadas. O composto CSS55 apresentou valores de  $CI_{50}$  que variaram de 10,14 a 30,65  $\mu$ M para as linhagens PC-3 e SF-

295, respectivamente. O composto CSS99 apresentou valor de  $CI_{50}$  semelhante frente às linhagens de células tumorais testadas, variando de 3,65 a 5,76  $\mu\text{M}$  em HCT-116 e SF-295, respectivamente, enquanto que o composto CSS185 apresentou menor valor de  $CI_{50}$  frente à linhagem HCT-116 ( $CI_{50}=5,59 \mu\text{M}$ ) quando comparado a  $CI_{50}$  frente às linhagens SF-295 (26,88  $\mu\text{M}$ ) e PC-3 (29,52  $\mu\text{M}$ ) (Tabela 2). A doxorubicina foi utilizada como controle positivo do experimento.

**Tabela 2. Avaliação da atividade citotóxica de novas chalconas-sulfonamida sintéticas frente a linhagens de células tumorais avaliado pelo ensaio do MTT após 72 horas de incubação. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo.**

Compostos	$CI_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )		
	Intervalo de confiança de 95%		
	PC-3	HCT-116	SF-295
<b>CSS99</b>	4,9 (4,09-6,03)	3,65 (3,29-4,06)	5,76 (5,15-6,43)
<b>CSS63Ce</b>	>52	>52	>52
<b>CSS55</b>	10,14 (7,67-13,41)	13,85 (12,11-16,43)	30,65 (27,91-33,69)
<b>CSS185</b>	29,52 (26,8-32,49)	5,59 (5,22-6,01)	26,88 (27,91-33,69)
<b>Doxorubicina</b>	0,76 (0,59-0,93)	0,21 (0,16-0,29)	0,41 (0,21-0,47)

Os valores de  $CI_{50}$  estão apresentados em  $\mu\text{M}$  e foram calculados a partir de regressão não linear, utilizando o programa GraphPad Prism Software versão 5.0. Os intervalos de confiança (IC 95%) foram obtidos por meio de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata, sendo mostrados entre parênteses.

Fonte: elaborada pela autora.

Dando seguimento ao estudo, o painel de linhagens celulares para teste de citotoxicidade foi ampliado para as chalconas-sulfonamidas CSS99 e CSS185, totalizando nove linhagens de células tumorais e duas não tumorais. A CSS99 apresentou valores de  $CI_{50}$  que variaram de 2,87 a 8,42  $\mu\text{M}$  para as linhagens SW-620 e HEP-G2, respectivamente, enquanto que para linhagens de células não tumorais, este composto apresentou  $CI_{50}$  de 10,10 e 23,80  $\mu\text{M}$  nas células L-929 e CMSP, respectivamente. Esta amostra não foi testada contra as linhagens MCF-7, HL-60 e B16F10. O composto CSS185 apresentou menor valor de  $CI_{50}$  para as linhagens de câncer colorretal, HCT-116 (5,59  $\mu\text{M}$ ) e SW-620 (6,27 $\mu\text{M}$ ) e para a linhagem HL-60 (8,46  $\mu\text{M}$ ), enquanto que para as demais linhagens de células tumorais este valor variou de 19,76 a 29,52  $\mu\text{M}$  para as linhagens MCF-7 e PC-3, respectivamente. O valor de  $CI_{50}$  da CSS185 frente às linhagens de células não tumorais L-929 e CMSP foi de 24,10 e 22,54  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Tabela 3).

A citotoxicidade para as linhagens de células não tumorais L-929 e CMSP e para as linhagens de células tumorais foi comparada por meio do cálculo do índice de seletividade (IS). Foi possível observar um efeito citotóxico aproximadamente quatro vezes maior da amostra CSS185 sobre as linhagens de câncer colorretal HCT-116 e SW-620 (IS=4) quando comparado com as demais linhagens de células tumorais e não tumorais testadas, com exceção da linhagem HL-60 (IS=2,8). O índice de seletividade da doxorubicina, quando comparado o valor de  $CI_{50}$  em CMSP com o valor de  $CI_{50}$  em células tumorais, variou de 2 a 138 dependendo da linhagem testada.

**Tabela 3. Efeito antiproliferativo das chalconas-sulfonamidas CSS99 e CSS185 em linhagens tumorais e não tumorais avaliado pelo ensaio do MTT, após 72 h de incubação.**

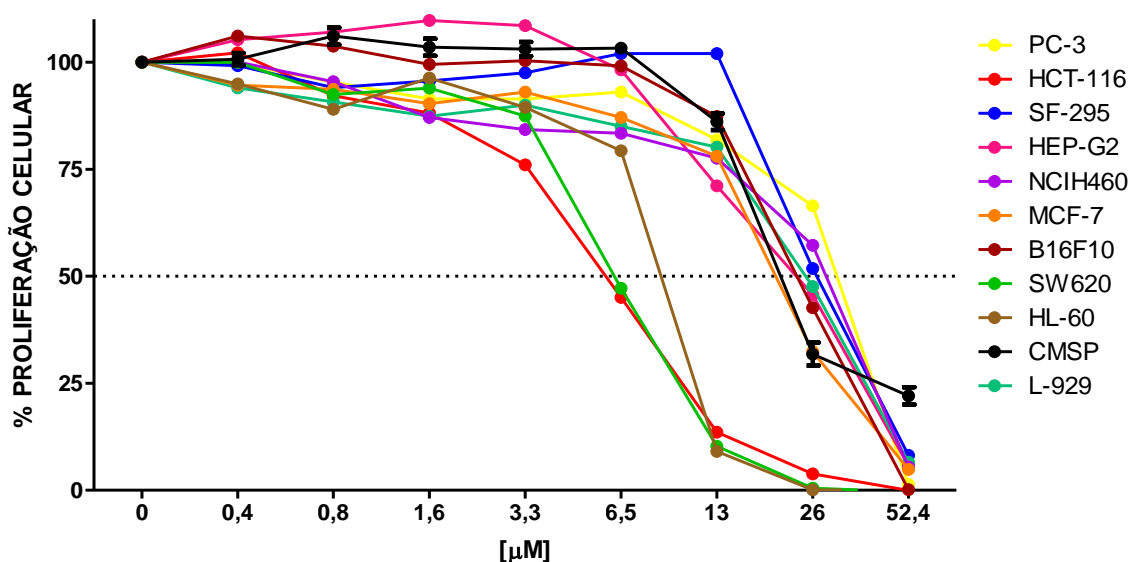
LINHAGENS	$CI_{50}$ ( $\mu$ M)			
	Intervalo de confiança de 95%			
	CSS99	CSS185	Doxorrubicina	
<b>Tumorais</b>	<b>PC-3</b>	4,9 (4,09-6,03)	29,52 (26,82-32,49)	0,76 (0,59-0,93)
	<b>HCT-116</b>	3,65 (3,29-4,06)	5,59 (5,22-6,01)	0,21 (0,16-0,29)
	<b>SF-295</b>	5,76 (5,15-6,43)	26,88 (27,91-33,69)	0,41 (0,21-0,47)
	<b>NCI-H460</b>	5,51 (4,94-6,14)	24,00 (20,27-28,41)	0,15 (0,13-0,18)
	<b>SW-620</b>	2,87 (2,56-3,25)	6,27 (5,84-6,74)	0,06 (0,04-0,10)
	<b>HEP-G2</b>	8,42 (7,06-10,04)	22,05 (18,79-25,87)	0,33 (0,29-0,37)
	<b>MCF-7</b>	NT	19,76 (18,09-21,58)	0,15 (0,12-0,19)
	<b>HL-60</b>	NT	8,46 (7,69-9,30)	0,02 (0,01-0,02)
	<b>B16F10</b>	NT	23,66 (22,14-25,28)	1,35 (1,13-1,61)
	<b>Não-tumorais</b>	<b>L-929</b>	10,10 (9,01-11,29)	24,10 (21,40-27,14)
<b>CMSP</b>		23,80 (20,01-28,28)	22,54 (20,59-24,66)	2,76 (2,30-3,31)

Os valores de  $CI_{50}$  estão apresentados em  $\mu$ M e foram calculados a partir de regressão não linear utilizando o programa GraphPad Prism Software versão 5.0. Os intervalos de confiança (IC 95%) foram obtidos por meio de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata, sendo mostrados entre parênteses. Doxorubicina foi utilizada como controle positivo. (NT – não testado)

Fonte: elaborada pela autora.

O perfil citotóxico da chalcona-sulfonamida 185 (CSS185) frente a 11 linhagens de células tumorais e não tumorais avaliado pelo ensaio do MTT após 72 h de incubação está representado no gráfico da Figura 12. Devido ao aparente perfil de seletividade da amostra CSS185 quanto ao seu efeito citotóxico frente a linhagens de câncer colorretal (Figura 12), e considerando que este câncer é o terceiro tipo mais incidente e um dos cânceres que mais mata tanto homens como mulheres, a amostra foi selecionada para dar continuidade aos estudos.

**Figura 12. Perfil citotóxico da chalcona-sulfonamida 185 (CSS185) frente a 11 linhagens de células tumorais e não tumorais avaliado pelo ensaio do MTT após 72 h de incubação.**



Fonte: elaborado pela autora.

Inicialmente, foi avaliada a relação tempo dependência do efeito antitumoral deste composto frente às linhagens HCT-116 e SW-620. A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que o composto CSS185 não apresentou efeito citotóxico frente à linhagem HCT-116 ( $CI_{50} > 52 \mu M$ ) após 24 h de incubação, enquanto que a molécula foi capaz de inibir a proliferação celular da linhagem SW-620, com valor de  $CI_{50}$  de  $28,35 \mu M$  no mesmo tempo de incubação. Após 48 h de incubação, o composto apresentou valor de  $CI_{50}$  de 18,10 e  $10,31 \mu M$  para as linhagens HCT-116 e SW-620, respectivamente (Tabela 4).

Devido ao efeito da CSS185 frente à linhagem de câncer colorretal metastático humano (SW-620) com apenas 24 horas de incubação esta linhagem foi escolhida para dar continuidade aos estudos do possível mecanismo envolvido no efeito antitumoral *in vitro* deste composto.

**Tabela 4. Efeito antiproliferativo da CSS185 frente às linhagens HCT-116 e SW-620 após 24, 48 e 72 horas de incubação determinado pelo método MTT.**

LINHAGEM	CI <sub>50</sub> (μM)		
	Intervalo de confiança de 95%		
	24 h	48 h	72 h
<b>HCT-116</b>	>52	18,10 (14,08-23,26)	5,59 (5,22-6,01)
<b>SW-620</b>	28,35 (25,16-31,93)	10,31 (9,28-11,46)	6,27 (5,84-6,74)

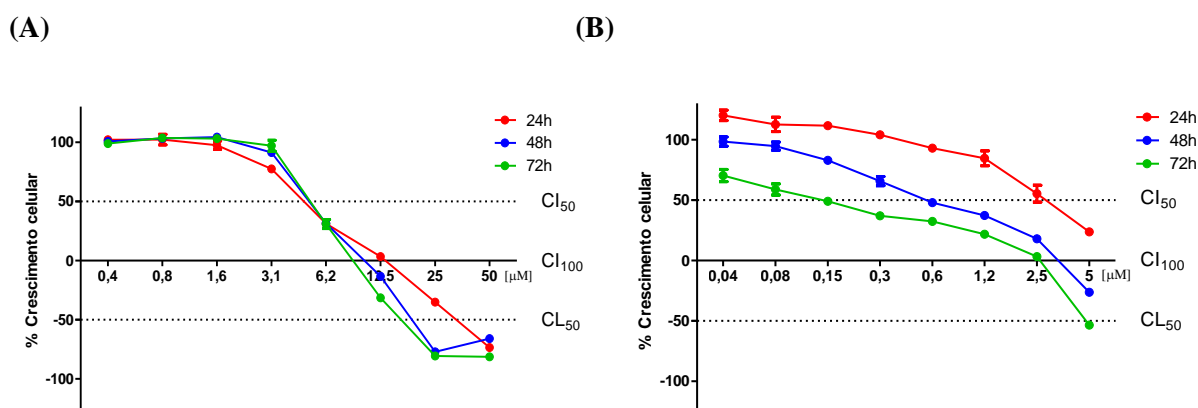
Os valores de CI<sub>50</sub> estão apresentados em μM e foram calculados a partir de regressão não linear utilizando o programa GraphPad Prism Software versão 5.0. Os intervalos de confiança (IC 95%) foram obtidos por meio de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata, sendo mostrados entre parênteses.

Fonte: elaborada pela autora.

## 5.2. Estudo do efeito antiproliferativo da chalcona-sulfonamida 185 (CSS185) sobre células de câncer colorretal metastático (SW-620).

A realização do ensaio do SRB permitiu verificar o perfil de inibição do crescimento celular da chalcona-sulfonamida 185 frente à linhagem SW-620, por meio da avaliação do perfil citostático e citotóxico da amostra. Pelo ensaio do SRB foi possível observar que o composto CSS185 tem efeito citostático e citotóxico de maneira concentração-dependente, dando início ao efeito citotóxico entre as concentrações de 6,2 e 12,5 μM após 24 h, 48 h e 72 h de incubação. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo do experimento, demonstrando efeito citotóxico apenas após 48 h e 72 h de incubação, entre as concentrações de 2,5 e 5 μM (Figura 13).

**Figura 13. Avaliação do efeito citostático/citotóxico concentração- e tempo-dependente da chalcona-sulfonamida 185 (CSS185) e da doxorrubicina utilizando o ensaio do SRB.**



Curva representativa do efeito citostático/citotóxico do composto CSS185 (A) e da Doxorrubicina (B), utilizada como controle positivo do experimento. Curva acima do eixo x representativo do efeito citostático; curva abaixo do eixo x representativo do efeito citotóxico. Os gráficos foram construídos no programa GraphPad Prism



Software versão 6.0 a partir dos valores de absorvância previamente normalizados com base na média da absorvância do controle negativo e do tempo zero. Legenda: CI<sub>50</sub> - concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular; CI<sub>100</sub> - a concentração capaz de inibir o crescimento celular total; CL<sub>50</sub> - concentração capaz induzir 50% de morte celular.

Fonte: elaborado pela autora.

O método do SRB também permite calcular a concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular (CI<sub>50</sub>), a concentração capaz de inibir o crescimento celular total (CI<sub>100</sub>) e a concentração capaz induzir 50% de morte celular (CL<sub>50</sub>) por interpolação da curva concentração/resposta. A chalcona-sulfonamida 185 apresentou valores semelhantes de CI<sub>50</sub> e de CI<sub>100</sub> nos diferentes tempos de incubação, diferindo nos valores de CL<sub>50</sub> que variaram de 24,9 µM a 46 µM nos tempos de 72 h e 24 h, respectivamente (Tabela 5). A doxorubicina foi utilizada como controle positivo do experimento.

A fim de determinar as concentrações para o estudo do mecanismo de ação da CSS185, foi realizado um método quantitativo direto de baixo custo, o ensaio de exclusão por azul de Tripán, utilizando quatro concentrações escolhidas a partir dos resultados prévios obtidos pelo ensaio do MTT (Figura 14A) e do SRB (Figura 13A; Tabela 5). Os ensaios foram realizados após incubação de 48 horas das células SW-620 com a chalcona-sulfonamida 185 (Figura 14B). Por meio do ensaio de viabilidade celular por exclusão de azul de Tripán foi possível observar que a CSS185 foi capaz de reduzir o número de células viáveis nas concentrações de 7,5, 10 e 15 µM (\*p<0,05), não interferindo no número de células não viáveis. A concentração de 5 µM não reduziu o número de células viáveis (Figura 14B).

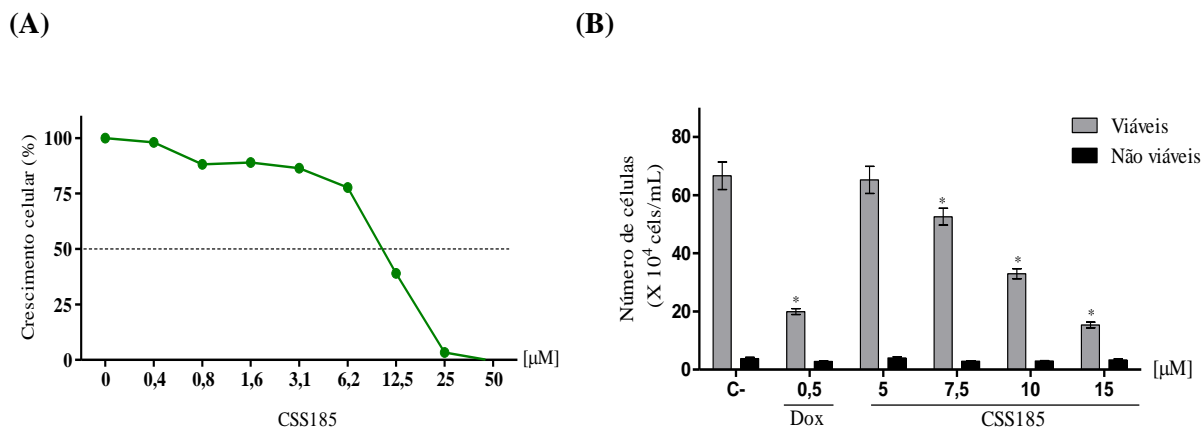
**Tabela 5. Determinação da concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular (CI<sub>50</sub>), da concentração capaz de inibir o crescimento celular total (CI<sub>100</sub>) e da concentração capaz induzir 50% de morte celular (CL<sub>50</sub>) da chalcona-sulfonamida 185 (CSS185) e da doxorubicina frente à linhagem SW-620, após 24h, 48h e 72h de incubação.**

Amostras	Tempo	CI <sub>50</sub> µM	CI <sub>100</sub> µM	CL <sub>50</sub> µM
CSS185	24h	3,3	12,3	46
	48h	3,2	10,2	32,6
	72h	2,9	8,5	24,9
Doxorubicina	24h	3,5	-	-
	48h	0,5	3,8	-
	72h	0,1	1,6	-

Os valores foram obtidos por meio de interpolação da curva concentração/resposta, utilizando o programa GraphPad Prism 6.0. Os dados foram obtidos a partir dos resultados de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata.

Fonte: elaborado pela autora.

**Figura 14. Efeito da chalcona-sulfonamida 185 (CSS185) sobre a viabilidade de células SW-620.**



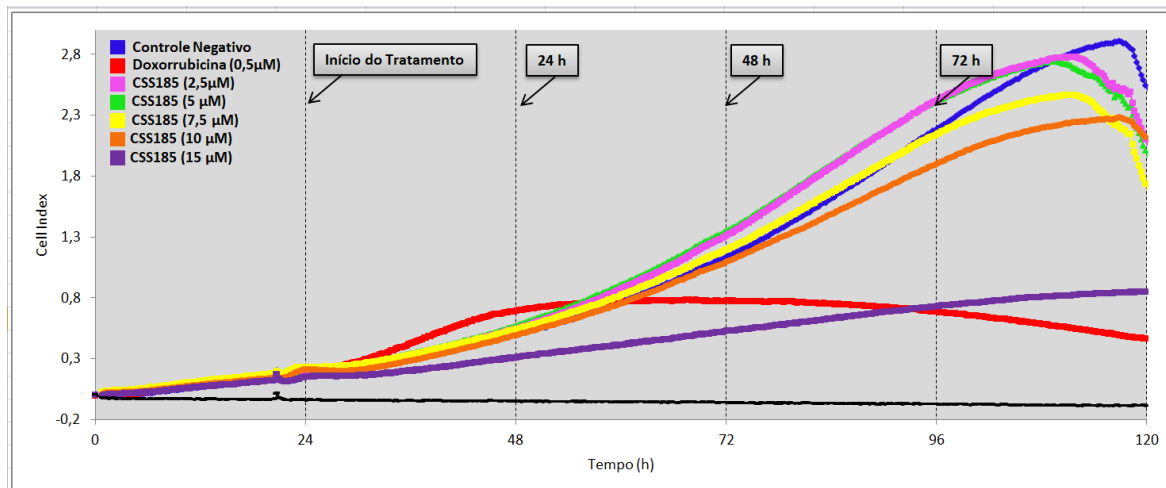
Curva de percentual de crescimento celular de células SW-620 determinado pelo ensaio do MTT após 48 h de incubação com CSS185 (A). Quantificação direta da viabilidade celular de células SW-620 por exclusão de azul de Tripã após 48 horas de incubação com CSS185 (B). Para o ensaio por exclusão de azul de Tripã, a doxorubicina (Dox 0,5 μM) foi utilizada como controle positivo do experimento. Os dados correspondem à média ± E.P.M. de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata. (\*) p<0,05 comparado ao controle negativo (C-) por ANOVA, seguido de teste de Tukey's.

Fonte: elaborado pela autora.

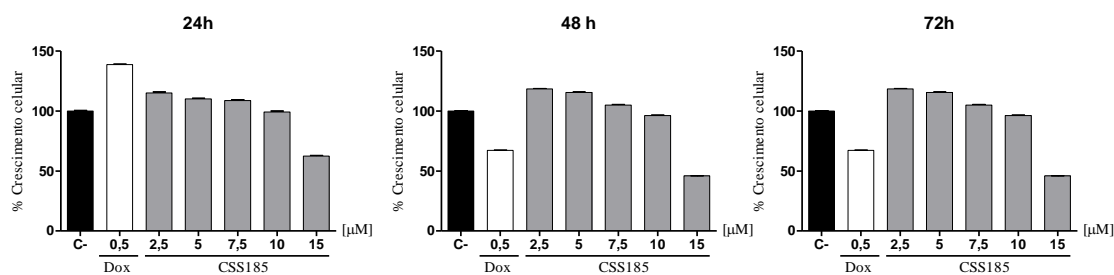
O perfil de inibição tumoral da amostra CSS185 em células SW-620 também foi avaliado por meio de monitoramento em tempo real do crescimento celular, utilizando *XCELLigence System* (Figura 15A). A partir da normalização dos valores de *cell index*, baseado no valor do controle negativo referente a cada período de incubação analisado, foi possível estimar o percentual de inibição do crescimento celular. A chalcona-sulfonamida 185 (15 μM) foi capaz de inibir 37%, 53% e 67% do crescimento das células SW-620 após 24, 48 e 72 h de incubação, respectivamente, enquanto que na concentração de 10 μM inibiu 13% do crescimento celular somente após 72 h de incubação. A doxorubicina (0,5 μM) inibiu 32% e 69% do crescimento celular após 48 e 72 h de incubação, respectivamente (Figura 15B).

**Figura 15. Monitoramento em tempo real da inibição do crescimento de células SW-620 induzido pela chalcona-sulfonamida 185 (CSS185), utilizando XCELLigence System.**

(A)



(B)



*Cell index* representativo do crescimento da linhagem SW-620, após tratamento com CSS185 (2,5, 5, 7,5, 10 e 15  $\mu\text{M}$ ) e Doxorubicina (0,5  $\mu\text{M}$ ), de um experimento representativo (A). Média do *cell index* normalizado com base no controle negativo (veículo) referente a cada período de incubação analisado (24 h, 48 h e 72 h) (B).

Fonte: elaborado pela autora.

### 5.3. Estudo do mecanismo de ação antitumoral *in vitro* da chalcona-sulfonamida 185 em células de câncer colorretal metastático (SW-620)

#### 5.3.1. Influência da chalcona-sulfonamida 185 sobre o ciclo celular de células de câncer colorretal metastático (SW-620)

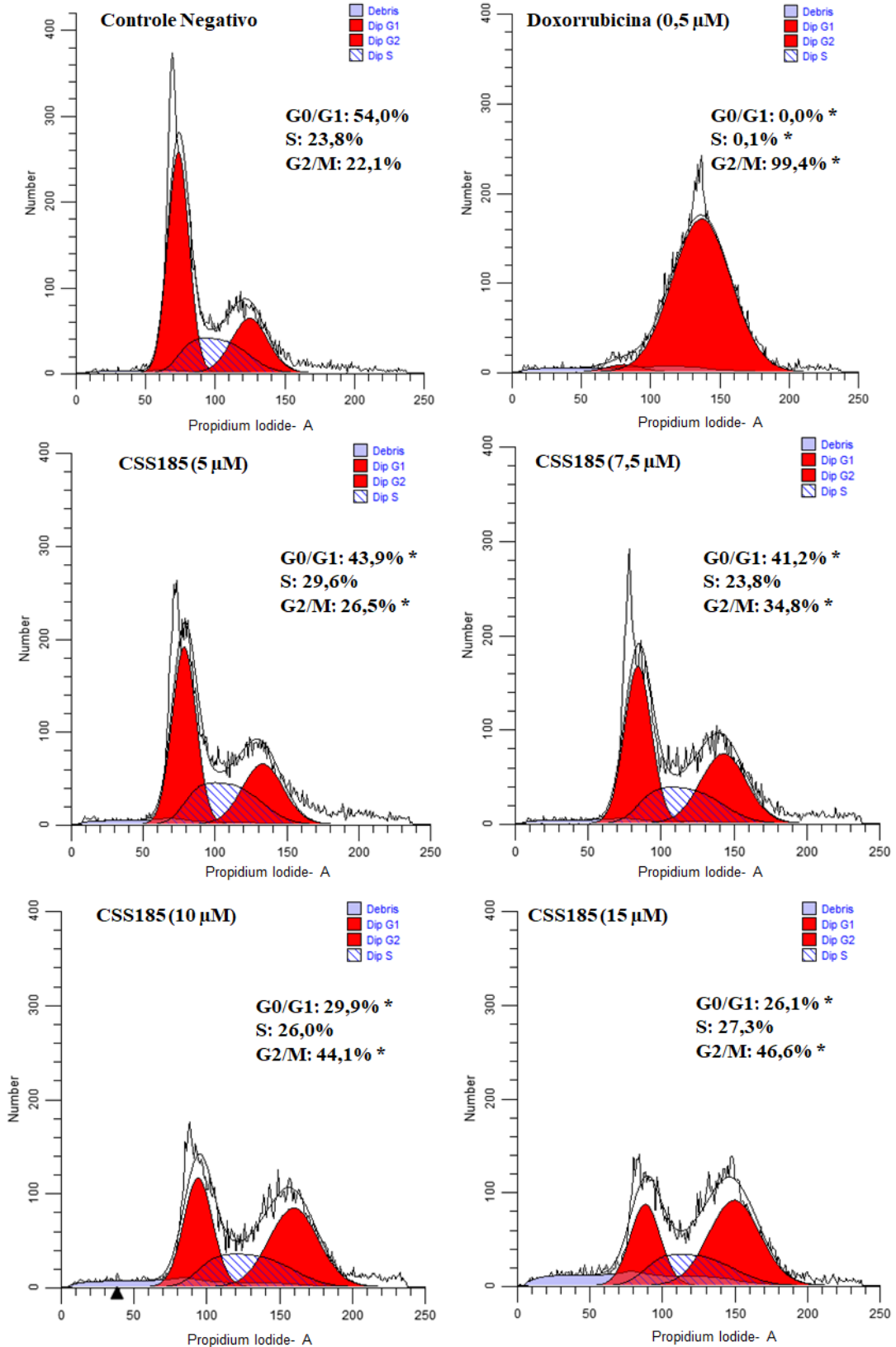
Muitos agentes antineoplásicos inibem a proliferação e induzem morte celular de células tumorais por meio da inibição do ciclo celular. Com isso, no intuito de verificar a relação do ciclo celular com o efeito antitumoral do composto CSS185, foi realizada uma análise do conteúdo de DNA de células SW-620 tratadas com CSS185 por citometria de fluxo, utilizando o corante iodeto de propídio, após 24 e 48 horas de tratamento. A partir desta

análise, foi possível observar um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) do percentual de células na fase G2/M em todas as concentrações testadas de CSS185 (5  $\mu\text{M}$ , 7,5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  e 15  $\mu\text{M}$ ) após 24 horas de incubação (Figura 16A) e nas concentrações de 7,5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  e 15  $\mu\text{M}$  após 48 horas de incubação (Figura 16B). A maior parte das células tratadas com doxorrubicina (0,5  $\mu\text{M}$ ), utilizada como controle positivo do experimento, estava na fase G2/M em ambos os tempos de tratamento.

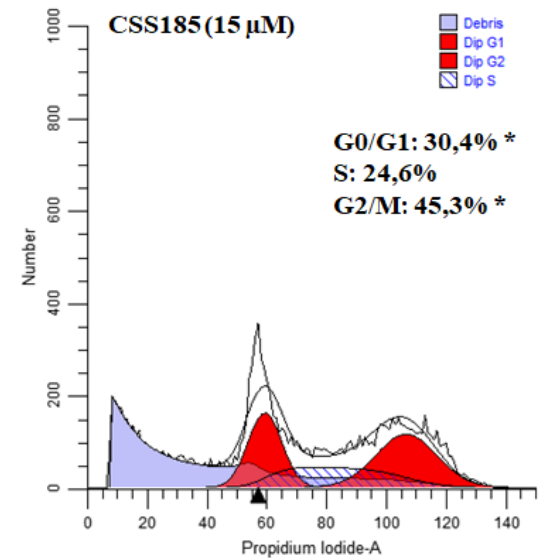
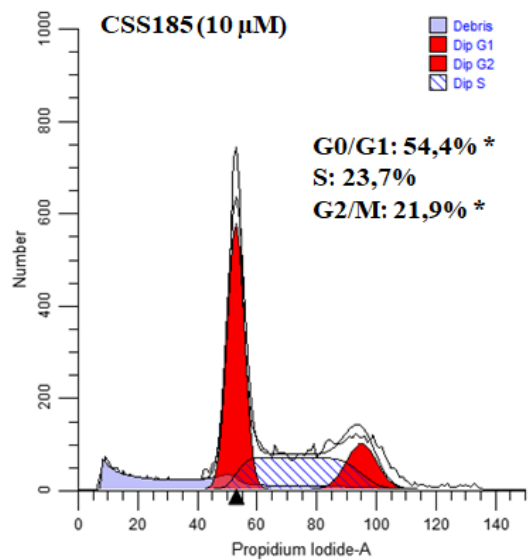
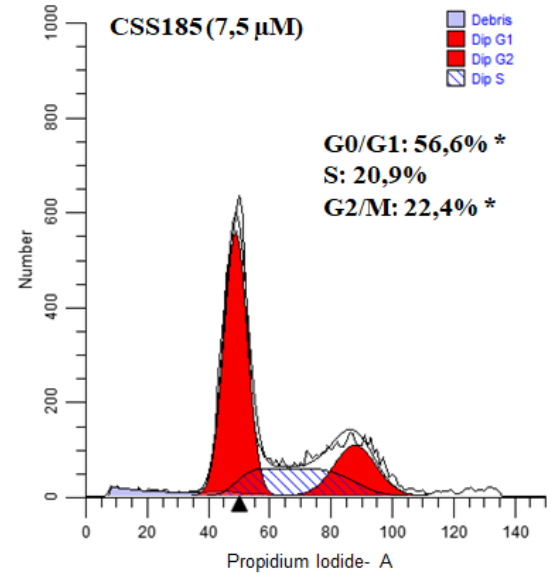
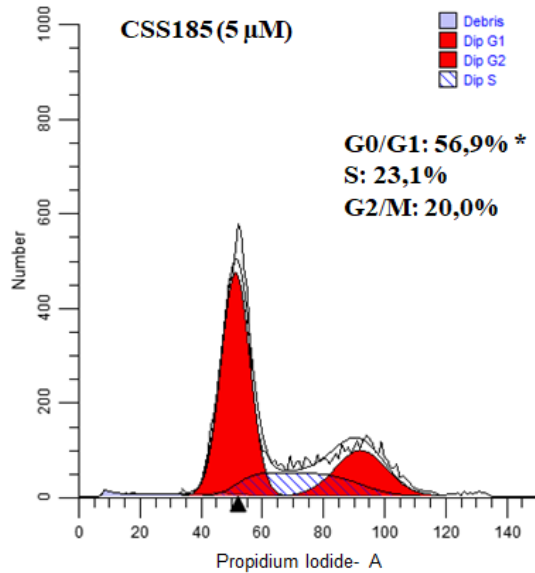
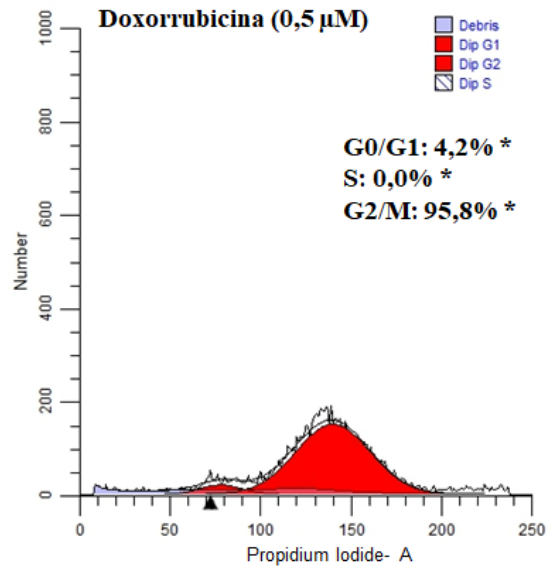
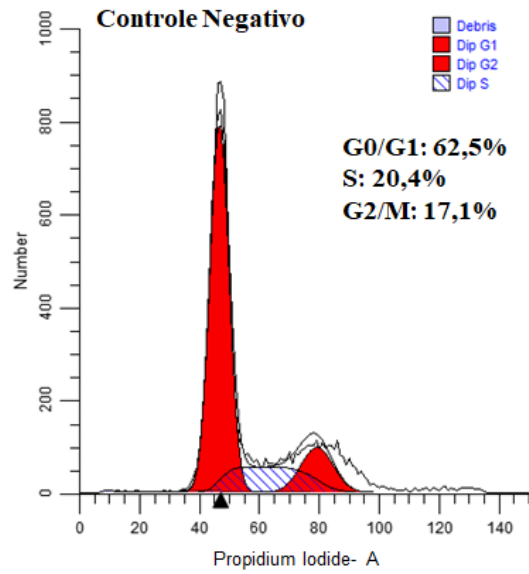
Para comprovar os efeitos da chalcona-sulfonamida 185 sobre as fases específicas do ciclo celular, a análise da expressão de proteínas-chave envolvidas na progressão do ciclo celular, como pP53, ciclinas A2 e B1, pChk1 e pChk2, foi realizada por *Western blot*, a partir da extração de proteínas de células SW-620 tratadas com CSS185 (10  $\mu\text{M}$  e 15  $\mu\text{M}$ ) após 24 horas de incubação. A expressão de pP53, ciclina A2 e pChk1 foi observada somente na doxorrubicina (0,5  $\mu\text{M}$ ), utilizada como controle positivo do experimento. Foi possível observar um aumento da expressão de ciclina B1 e pChk2, proteínas relacionadas com a regulação do ciclo celular na fase G2/M, nas células tratadas com doxorrubicina (0,5  $\mu\text{M}$ ) e com CSS185 (10  $\mu\text{M}$ ) e uma diminuição da expressão de ciclina B1 quando tratadas com CSS185 (15  $\mu\text{M}$ ) quando comparado com o controle negativo (Figura 16C).

**Figura 16. Influência da chalcona-sulfonamida 185 (CSS185) sobre o ciclo celular de células SW-620.**

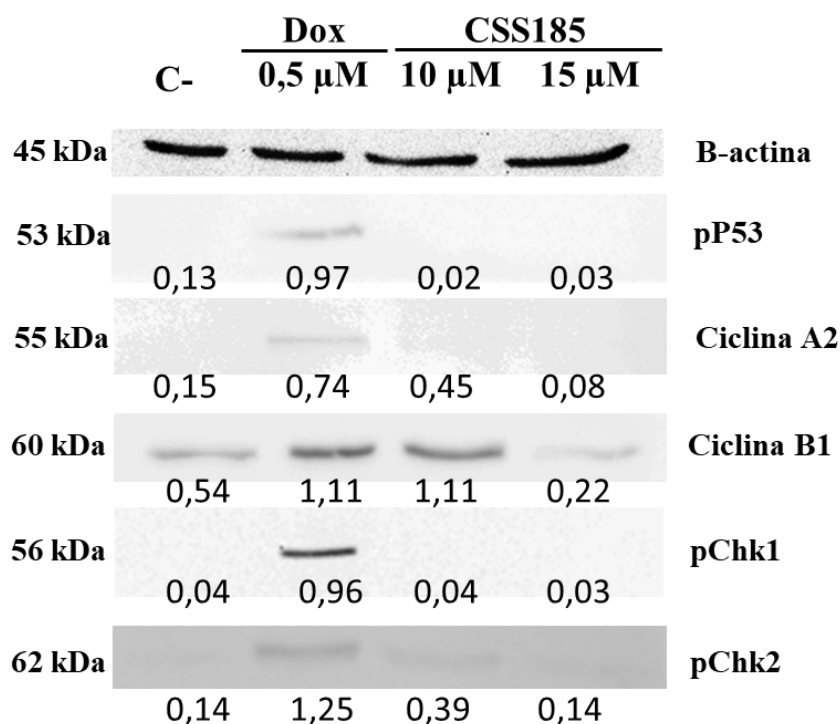
**(A)**



(B)



(C)



Avaliação do conteúdo de DNA de células SW-620 tratadas com CSS185 após 24 horas (A) e 48 horas (B) de incubação, avaliado por citometria de fluxo. Avaliação da expressão de proteínas relacionadas com o ciclo celular de células SW-620 tratadas com CSS185 após 24 horas de incubação (C). A doxorubicina (Dox - 0,5  $\mu$ M) foi utilizada como controle positivo do experimento. Os dados de citometria de fluxo estão apresentados como os valores da média  $\pm$  E.P.M., obtidos por pelo menos três experimentos realizados em triplicata. \*  $p < 0,05$  comparado com o controle negativo (C-) por ANOVA seguido de teste de Tukey's. Dez mil eventos foram analisados por replicata em cada experimento.

Fonte: elaborado pela autora.

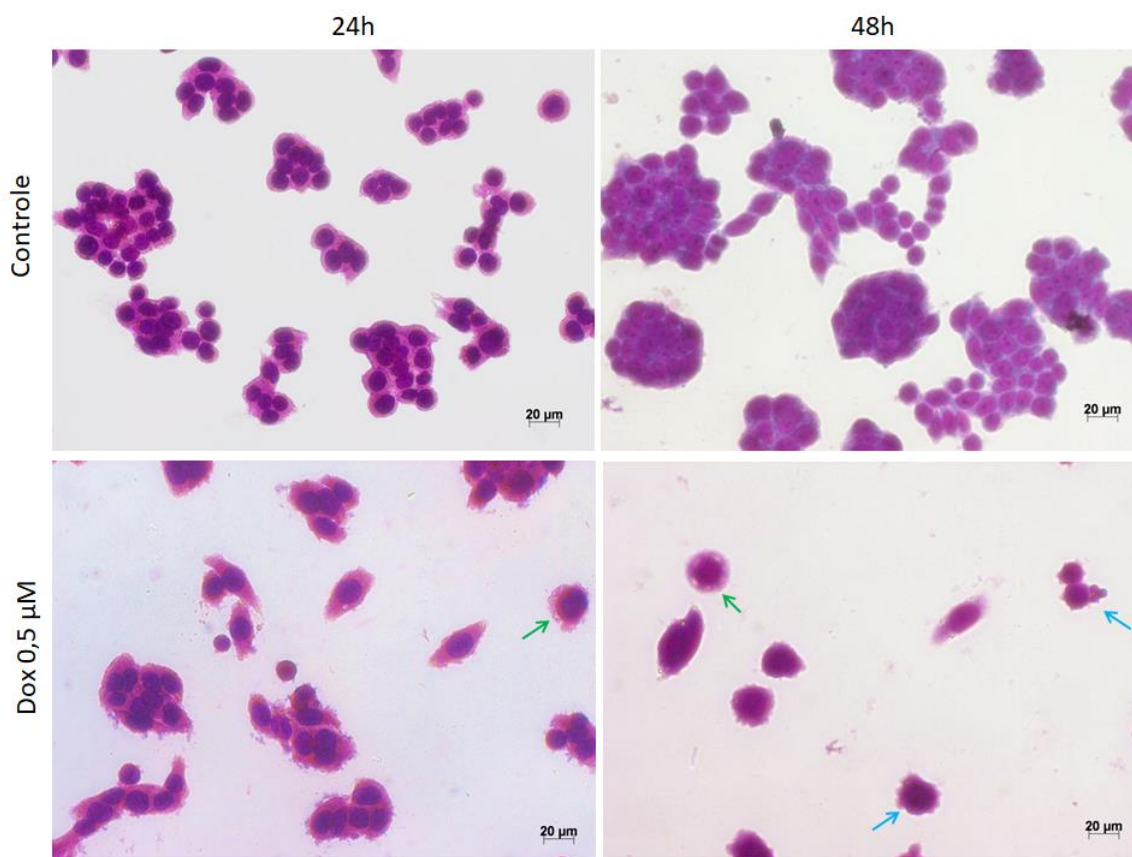
### 5.3.2. Mecanismo de morte celular envolvido no efeito citotóxico da chalcona-sulfonamida 185 sobre células de câncer colorretal metastático (SW-620)

A fim de verificar o mecanismo de morte envolvido no efeito citotóxico da chalcona-sulfonamida 185 (CSS185), foi realizada a análise morfológica das células SW-620 tratadas com CSS185 por coloração com o kit panótico rápido, utilizando microscopia óptica (Figura 17). Após 24 horas de incubação, não foi possível observar alterações significativas nas células tratadas com CSS185 nas concentrações de 5 e 7,5  $\mu$ M, enquanto que, várias alterações celulares e uma rarefação celular foram observadas nas concentrações de 10 e 15  $\mu$ M. Na concentração de 10  $\mu$ M foi possível observar corpos apoptóticos na membrana de algumas células, com formação de *blebs*, e condensação e fragmentação nuclear. Além destas

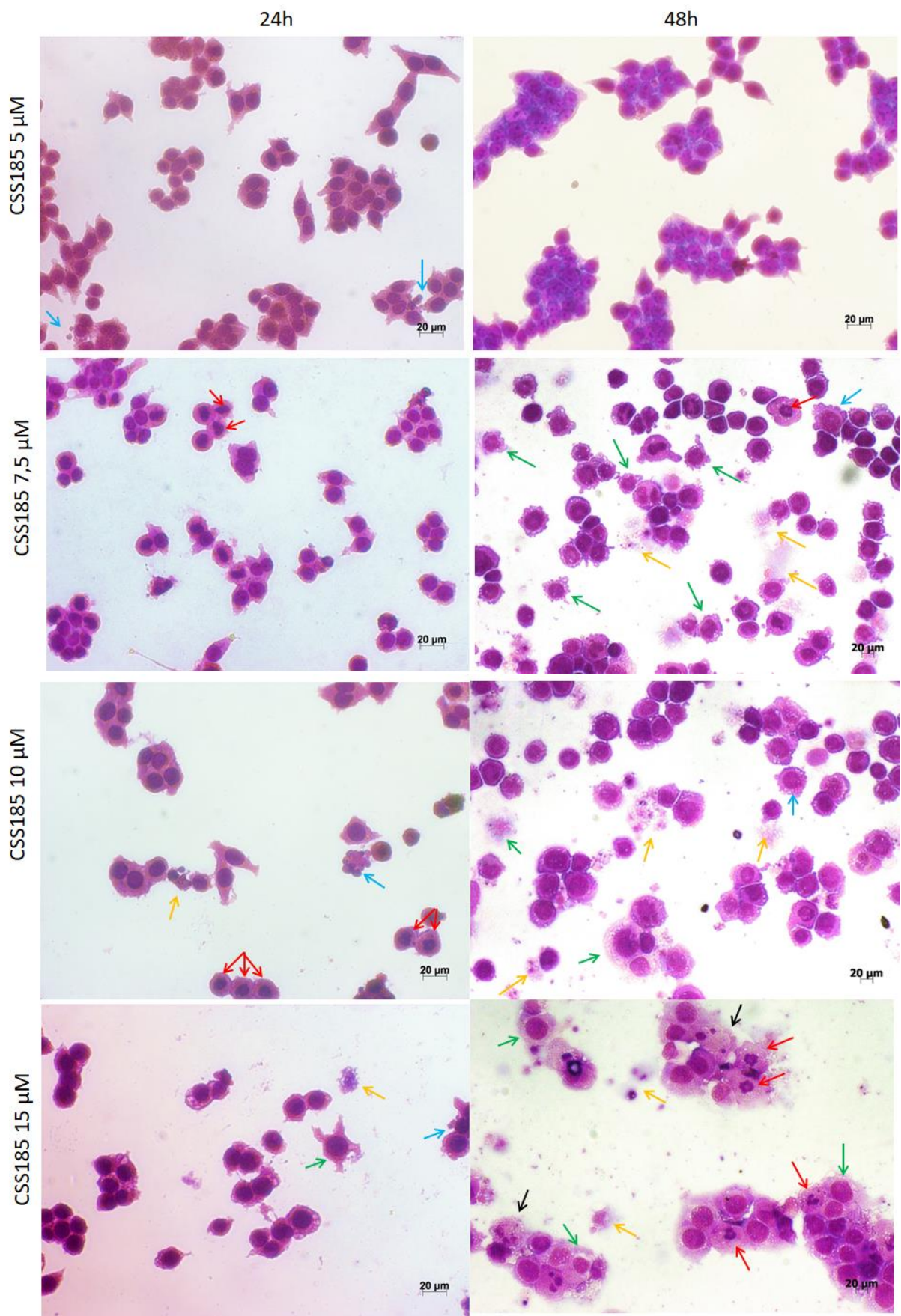
alterações, uma alteração na membrana citoplasmática e o aparecimento de restos celulares foram observados nas células tratadas com CSS185 na concentração de 15  $\mu\text{M}$ .

Após incubação de 48 horas, foi possível observar aumento de tamanho celular em todas as concentrações testadas de CSS185 (5, 7,5, 10 e 15  $\mu\text{M}$ ). Outras alterações celulares foram observadas, tais como rarefação celular, alteração na membrana citoplasmática, restos celulares com aparente liberação extracelular de componentes citoplasmáticos e aparecimento de algumas células com corpos apoptóticos nas concentrações de 7,5, 10 e 15  $\mu\text{M}$ , além de condensação e fragmentação nuclear mais frequente na maior concentração testada (15  $\mu\text{M}$ ). Em células tratadas com doxorubicina (0,5  $\mu\text{M}$ ), utilizada como controle positivo, foi observada rarefação celular, alterações de membrana citoplasmática com formação de *blebs* e aumento do tamanho celular após 24 e 48 horas de incubação, características estas compatíveis com morte celular por apoptose. Com isso, possivelmente o efeito citotóxico da CSS185 em células SW-620 pode está relacionado com indução de morte celular por apoptose e/ou necrose.

**Figura 17. Avaliação das alterações celulares em células SW-620 após 24h e 48 h de tratamento com chalcona-sulfonamida 185 (CSS185), coradas com kit panótico rápido.**







Legenda: setas azuis – corpos apoptóticos, formação de “blebs”; setas verdes – alterações na membrana citoplasmática; setas vermelhas – condensação de cromatina/fragmentação nuclear; setas pretas – liberação

extracelular de componentes citoplasmáticos; setas laranjas – restos celulares. Doxorubicina (Dox - 0,5  $\mu\text{M}$ ) foi utilizada como controle positivo do experimento. Células visualizadas por microscopia óptica (200X).  
Fonte: elaborado pela autora.

Como foi observada a presença de células com aparente dano de membrana citoplasmática por microscopia óptica, foi avaliada a especificidade deste dano. Para isso, foi realizado o ensaio de hemólise em eritrócitos de camundongos a fim de verificar a capacidade da chalcona-sulfonamida 185 de induzir lise na membrana de eritrócitos. O composto não induziu dano à membrana de eritrócitos de camundongos em concentrações de até 300  $\mu\text{M}$  ( $\text{EC}_{50} > 300 \mu\text{M}$ , dados não mostrados). A ausência de atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos sugere que a citotoxicidade da CSS185 não está relacionada com dano inespecífico de membrana.

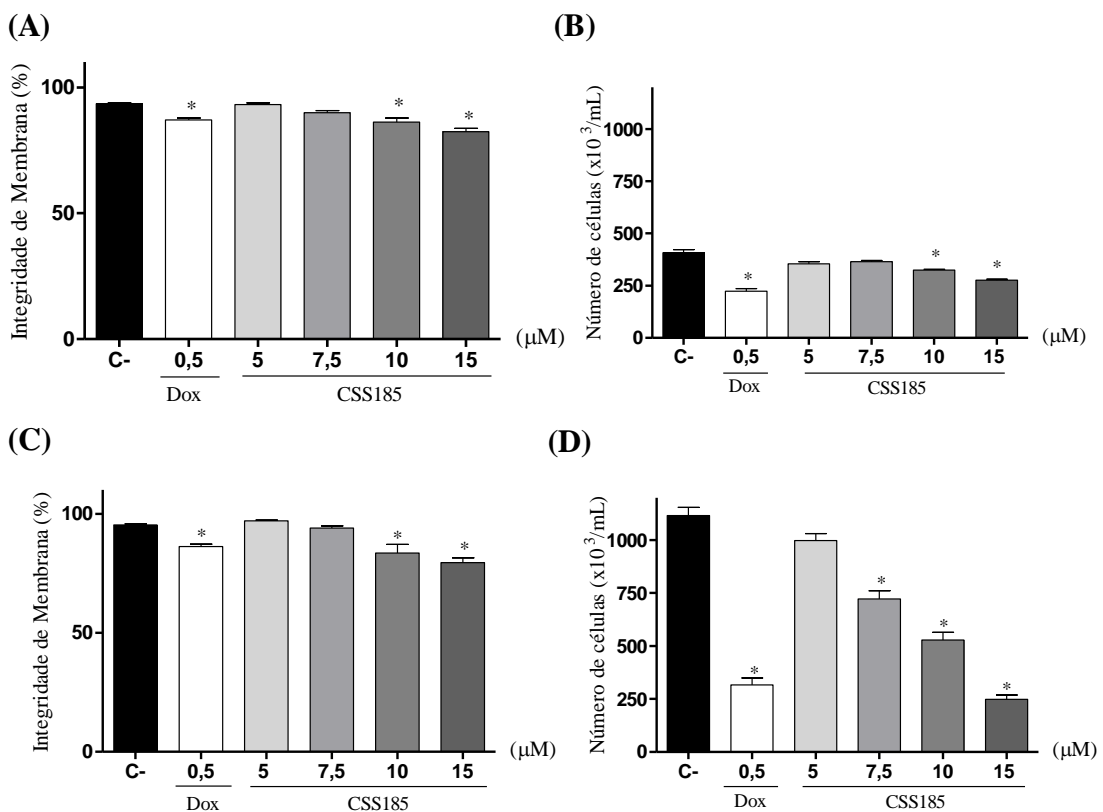
Com isso, a fim de confirmar algumas modificações na morfologia celular observadas por microscopia, como alterações de membrana citoplasmática, rarefação celular e presença de restos celulares, foi realizada uma análise da integridade de membrana por citometria de fluxo das células SW-620 tratadas com CSS185. Para isso, foi utilizado o iodeto de propídeo, um corante hidrofílico capaz de entrar apenas em células com membrana rompida e de corar o núcleo celular, emitindo fluorescência, portanto, sendo possível distinguir células viáveis, com membrana íntegra, das células não viáveis, com membrana rompida.

Como observado na Figura 18A e 18C, o composto CSS185 foi capaz de induzir dano à membrana de células SW-620 nas concentrações de 10 e 15  $\mu\text{M}$ , após 24 e 48 horas de incubação, corroborando com os achados de microscopia óptica. Além disso, a contagem de células pelo citômetro de fluxo também foi avaliada, sendo observada uma diminuição significativa do número de células SW-620 quando tratadas com CSS185 nas concentrações de 10 e 15  $\mu\text{M}$  após 24 horas de incubação e nas concentrações de 7,5, 10 e 15  $\mu\text{M}$  após 48 horas de incubação, quando comparado com o controle negativo (\* $p < 0,05$ ) (Figura 18B e 19D), corroborando também com os achados de microscopia, como a rarefação celular, anteriormente apresentados.

Apesar da maior redução da viabilidade celular induzida pela CSS185 (10  $\mu\text{M}$ ) após 48 horas de incubação (16,5% de células inviáveis) quando comparado com o tempo de 24 horas (13,8% de células inviáveis), esta não interferiu na duplicação das células quando comparado os dois tempos de incubação, tendo em vista que foi observado duplicação do número de células de 24 para 48 horas (Figura 18). Isto corrobora com os achados de

microscopia, em que apesar do maior número de células em processo de morte celular após 48 horas de incubação, foram observadas mais células nas lâminas de 48 horas do que naquelas fotografadas após 24 horas de incubação. Na concentração de 15  $\mu\text{M}$ , no entanto, além de induzir perda da integridade de membrana de maneira tempo-dependente, a CSS185 inibiu a duplicação de células SW-620 quando comparados os tempos de 24 e 48 horas.

**Figura 18. Efeito da chalcona-sulfonamida 185 (CSS185) sobre viabilidade celular de células SW-620.**



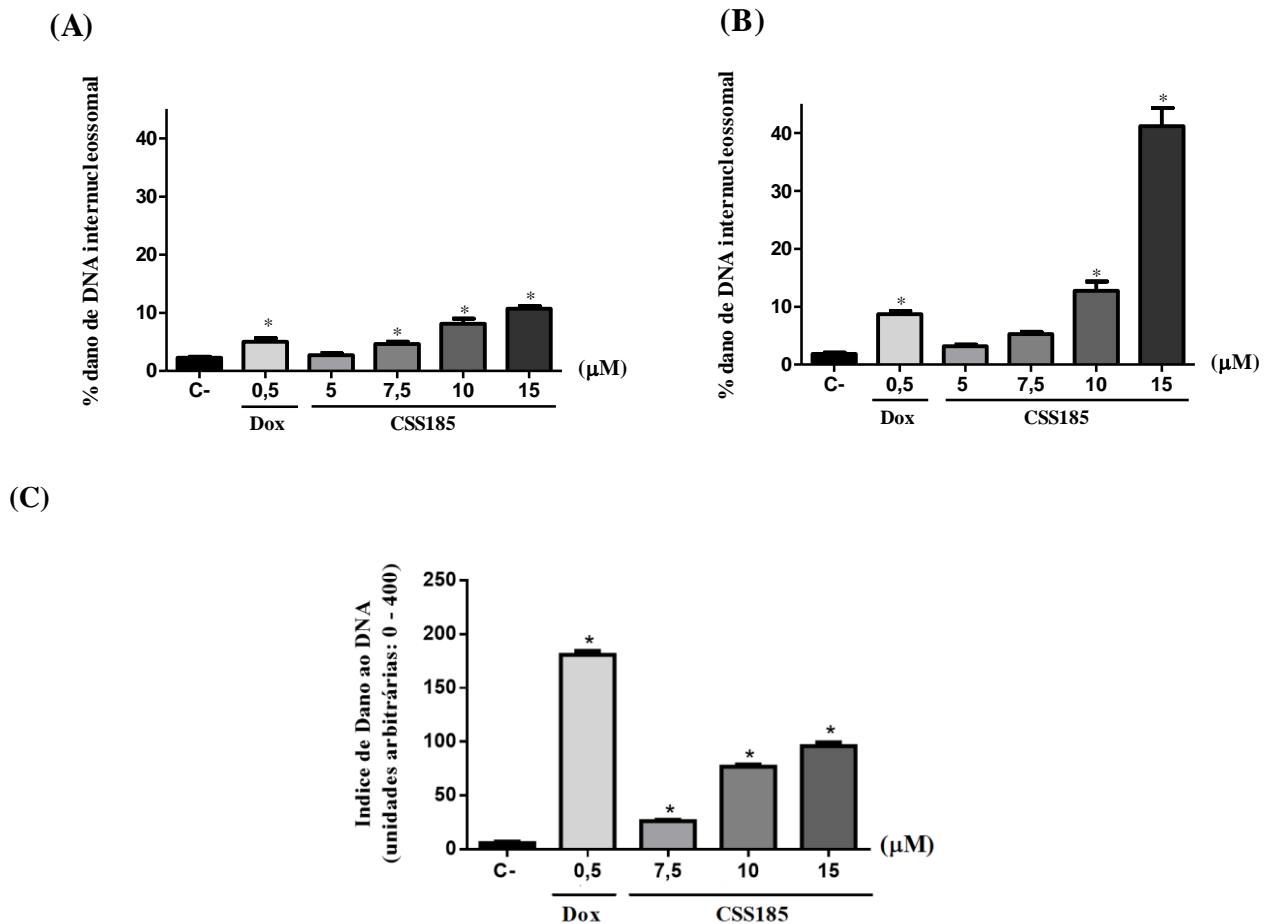
Avaliação do percentual de integridade de membrana e do número de células, utilizando citometria de fluxo, após 24 h (A, B) e 48 h (C, D) de tratamento. A doxorubicina (Dox - 0,5  $\mu\text{M}$ ) foi utilizada como controle positivo do experimento. Os dados estão apresentados como os valores da média  $\pm$  E.P.M., obtidos por pelo menos três experimentos realizados em triplicata. \*  $p < 0,05$  comparado com o controle negativo (C-) por ANOVA seguido de teste de Tukey's. Dez mil eventos foram analisados em cada experimento.

Fonte: elaborado pela autora.

A indução de alterações nucleares, como condensação de cromatina e fragmentação nuclear, foi observada em células SW-620 tratadas com CSS185 na microscopia. Muitos processos de morte celular estão relacionados com fragmentação nuclear. Portanto, a fim de confirmar estes achados, foi avaliada a indução de fragmentação internucleossomal por meio da análise do percentual das células na fase sub-G1, utilizando citometria de fluxo, e a extensão de possível quebra de fita simples e dupla, sítios álcali-lábeis, sítios de reparo por excisão incompleto e ligações cruzadas de DNA, utilizando ensaio do cometa alcalino.

Como observado na Figura 19A e 19B, a chalcona-sulfonamida 185 induziu um aumento no número de células na fase sub-G1 após 24 e 48 horas de incubação, respectivamente. Após 24 horas, 4,6%, 8,1% e 10,7% das células SW-620 encontravam-se na fase sub-G1 quando tratadas nas concentrações de 7,5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M e 15  $\mu$ M, respectivamente, sendo estes percentuais significativamente ( $p < 0,05$ ) maiores que o controle negativo que apresentou 2,3% de células nesta fase. Após 48 horas, o percentual de células em sub-G1 foi significativo apenas nas concentrações de 10  $\mu$ M (12,7%) e 15  $\mu$ M (41,2%) de CSS185 quando comparado com o controle negativo (1,8%). Apesar da presença de fragmentação nuclear observada por microscopia em células SW-620 tratadas com CSS185 (7,5  $\mu$ M) após 48 horas de tratamento, na concentração de 7,5  $\mu$ M (5,3%) o percentual de células em sub-G1 não foi significativo quando comparado com o controle negativo.

**Figura 19. Avaliação após 24 horas (A) e 48 horas (B) de tratamento avaliado a partir do percentual de células na fase Sub-G1 por citometria de fluxo e sobre a indução de quebra de fita simples e dupla de DNA após 24 horas de tratamento (C) avaliado pelo teste do cometa alcalino.**



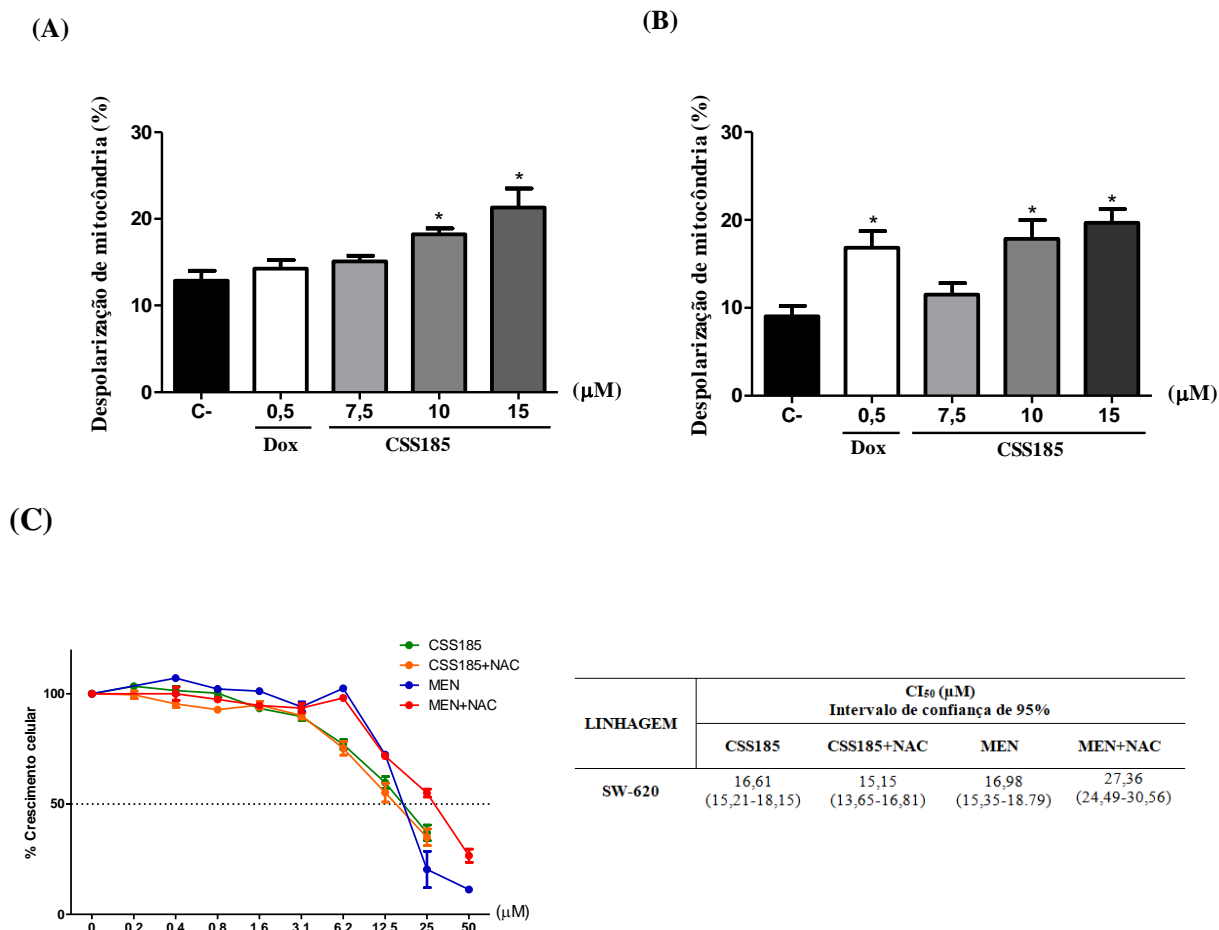
A doxorubicina (Dox 0,5  $\mu$ M) foi utilizada como controle positivo do experimento. Os dados estão apresentados como os valores da média  $\pm$  E.P.M., obtidos por pelo menos três experimentos realizados em triplicata. \*  $p < 0,05$  comparado com o controle negativo (C-) por ANOVA seguido de teste de Tukey's. Fonte: elaborada pela autora.

Por meio do teste do cometa alcalino, foi possível observar significativa ( $p < 0,05$ ) indução de quebra de fita simples e/ou dupla de DNA em todas as concentrações testadas de CSS185 após 24 horas de tratamento (Figura 19C), mostrando possível potencial genotóxico da molécula. Estes achados corroboraram com a citometria, sugerindo que a fragmentação nuclear induzida pelo composto CSS185 possivelmente está relacionada com quebra de fita simples e/ou dupla de DNA. A doxorubicina (0,5  $\mu$ M) induziu significativa fragmentação internucleossomal em ambos os tempos de incubação e quebra de fita simples e/ou dupla de DNA após 24 horas de incubação quando comparado com o controle negativo.

O potencial transmembrânico mitocondrial está diretamente relacionado com a viabilidade celular, podendo estar alterado em alguns processos de morte celular. Logo, com o objetivo de verificar o papel da mitocôndria no efeito citotóxico da chalcona-sulfonamida 185, o potencial transmembrânico da mitocôndria ( $\Delta\Psi_m$ ) foi avaliado, utilizando citometria de fluxo por meio da incorporação do corante Rodamina 123 após 24 e 48 horas de tratamento (Figura 20).

Como observado na Figura 20A, o composto CSS185 induziu significativa ( $*p < 0,05$ ) despolarização mitocondrial em 18,2% e 21,3% das células SW-620 tratadas com 10  $\mu$ M e 15  $\mu$ M de CSS185, respectivamente, quando comparado com o controle negativo (DMSO), em que foram observados 12,9% das células com membrana mitocondrial despolarizada após 24 horas de incubação. O percentual de indução da despolarização mitocondrial foi semelhante após 48 horas de tratamento, com significativa ( $*p < 0,05$ ) despolarização de 17,9% e 19,7% das células tratadas com 10  $\mu$ M e 15  $\mu$ M de CSS185, respectivamente, enquanto que no controle negativo (DMSO) apenas 9% das células apresentou despolarização (Figura 20B). A doxorubicina, utilizada como controle positivo, causou despolarização mitocondrial em 14,3% e 16,8% das células após 24 e 48 horas de tratamento, respectivamente, sendo o percentual de despolarização significativo ( $*p < 0,05$ ) apenas no tempo de 48 horas.

**Figura 20.** Efeito da chalcona-sulfonamida 185 (CSS185) sobre o potencial transmembrânico mitocondrial de células SW-620 avaliado por citometria de fluxo após 24 horas (A) e 48 horas (B) de tratamento e sobre a proliferação celular de células SW-620 pré-tratadas ou não com N-acetil-L-cisteína (NAC, 4 mM) por 2 horas, avaliado pelo teste do MTT após 48 horas de incubação (C).



A doxorubicina (Dox 0,5 μM) foi utilizada como controle positivo do experimento de citometria de fluxo e a menadiona (curva concentração-resposta 0,2 – 50 μM) foi utilizada como controle positivo do teste do MTT com pré-tratamento com NAC. Os dados de citometria estão apresentados com os valores da média ± E.P.M., obtidos por pelo menos três experimentos realizados em triplicata. \*  $p < 0,05$  comparado com o controle negativo (C-) por ANOVA seguido de teste de Tukey's. Os valores de  $CI_{50}$  estão apresentados em μM e foram calculados a partir de regressão não linear utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software). Os intervalos de confiança (IC 95%) foram obtidos por meio de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata, sendo mostrados entre parênteses.

Fonte: elaborada pela autora.

A disfunção mitocondrial por muitas vezes é acompanhada de geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Com isso, a fim de investigar a influência das EROs no efeito citotóxico da chalcona-sulfonamida (CSS185), as células SW-620 foram pré-tratadas por 2 horas com N-acetil-L-cisteína (NAC, 4 mM), um agente antioxidante capaz de sequestrar as EROs formadas. Em seguida, estas células foram tratadas com concentrações seriadas do

composto CSS185 para determinar o valor de  $CI_{50}$  pelo teste do MTT após incubação de 48 horas (Figura 20C). Não foi possível observar indução de EROs pela chalcona-sulfonamida 185, utilizando o NAC como antioxidante, visto que o composto apresentou valor de  $CI_{50}$  ( $CI_{50} = 15 \mu M$ ) semelhante com ou sem pré-tratamento com NAC. O controle positivo do experimento, a menadiona ( $CI_{50} = 16,98 \mu M$ ), por sua vez, apresentou maior valor de  $CI_{50}$  quando as células foram pré-tratadas com NAC ( $CI_{50} = 27,36 \mu M$ ).

A fim de verificar o processo de morte celular relacionado com o efeito citotóxico da chalcona-sulfonamida 185, foi realizado o ensaio de coloração com laranja de acridina e brometo de etídio, utilizando microscopia de fluorescência para contagem diferencial de células viáveis, em apoptose inicial, tardia ou necrose. O composto CSS185 induziu um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de células necróticas com conseqüente redução do número de células viáveis após 24 horas (Figura 21A) e 48 horas (Figura 21B) de incubação nas concentrações de  $10 \mu M$  e  $15 \mu M$ . Estes achados corroboram com as alterações celulares encontradas na microscopia óptica e citometria de fluxo, sugerindo que o processo de morte celular envolvido no efeito citotóxico da CSS185 pode ser a necrose.

A partir destes resultados, foi realizado um ensaio de *Western blot* no intuito de avaliar a expressão de proteínas relacionadas com morte celular em células SW-620 tratadas com CSS185, utilizando as concentrações de  $10 \mu M$  e  $15 \mu M$  após 24 horas de tratamento. Na Figura 21C, é possível observar a clivagem do PARP, uma importante proteína que é clivada quando há indução de morte celular, em ambas as concentrações testadas de CSS185. Além disso, foi observada uma redução da expressão da proteína pro-apoptótica Bax em ambas as concentrações testadas, enquanto que a doxorrubicina ( $0,5 \mu M$ ), utilizada como controle positivo, aumentou a expressão desta proteína.

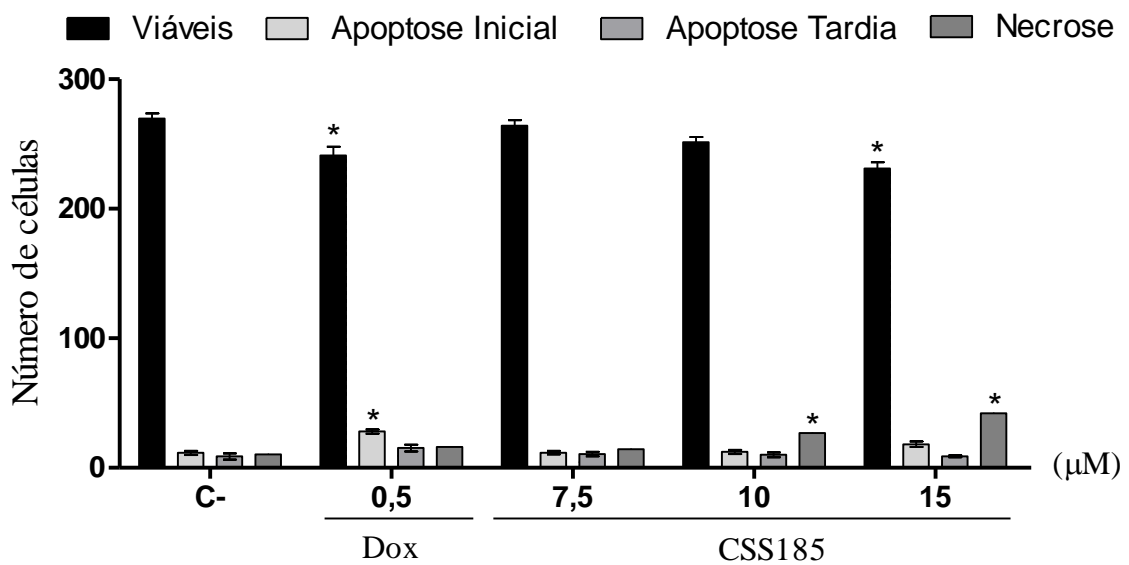
A expressão das caspases 3 e 8 também foi avaliada, sendo observada uma redução da expressão da caspase 3 com o aparecimento de bandas de peso molecular 17 e 19 kDa, podendo corresponder a clivagem ou degradação desta caspase em ambas as concentrações de CSS185 testadas; e inibição da clivagem da caspase 8 na concentração de  $15 \mu M$ . Nas células tratadas com doxorrubicina ( $0,5 \mu M$ ) e CSS185 ( $10 \mu M$ ) foi observado clivagem da caspase 8 bem como no controle negativo (Figura 21C).

Visto a relação da inibição da clivagem de caspase 8 com o processo de morte celular programada denominado necroptose, foi avaliado a influência do composto CSS185 sobre

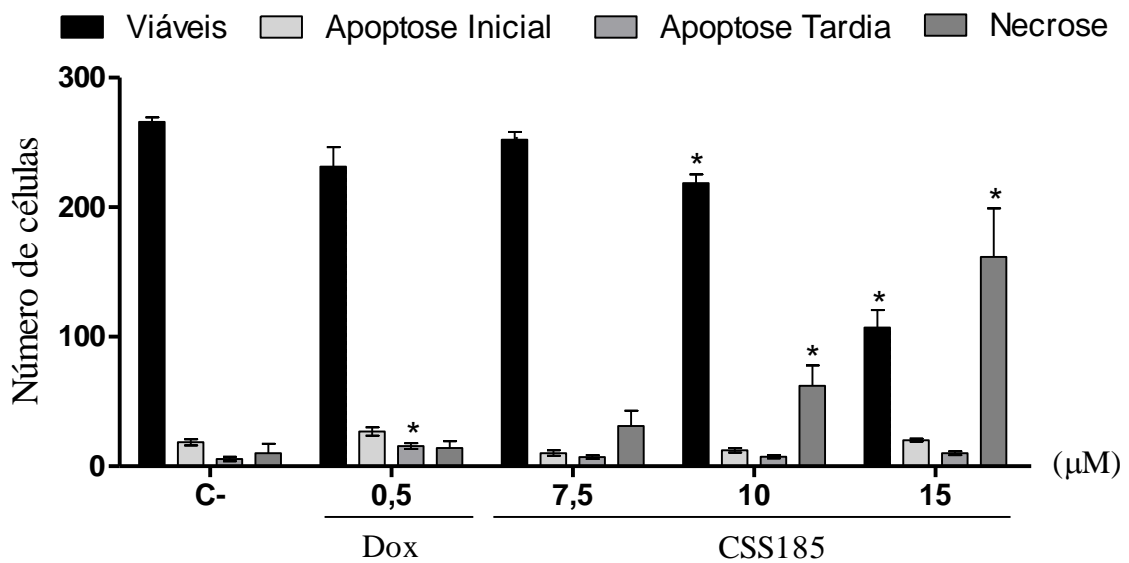
proteínas características deste processo de morte, MLKL e RIP. A molécula CSS185 reduziu a expressão das proteínas MLKL e RIP em ambas as concentrações testadas quando comparado com o controle negativo, sugerindo que um dos mecanismos de morte induzidos pela chalcona-sulfonamida 185 é a necroptose, sendo esta associada ou não com a ativação de caspases, dependendo da concentração testada (Figura 21C).

**Figura 21. Efeito da chalcona-sulfonamida 185 (CSS185) sobre o processo de morte celular em células SW-620.**

(A)

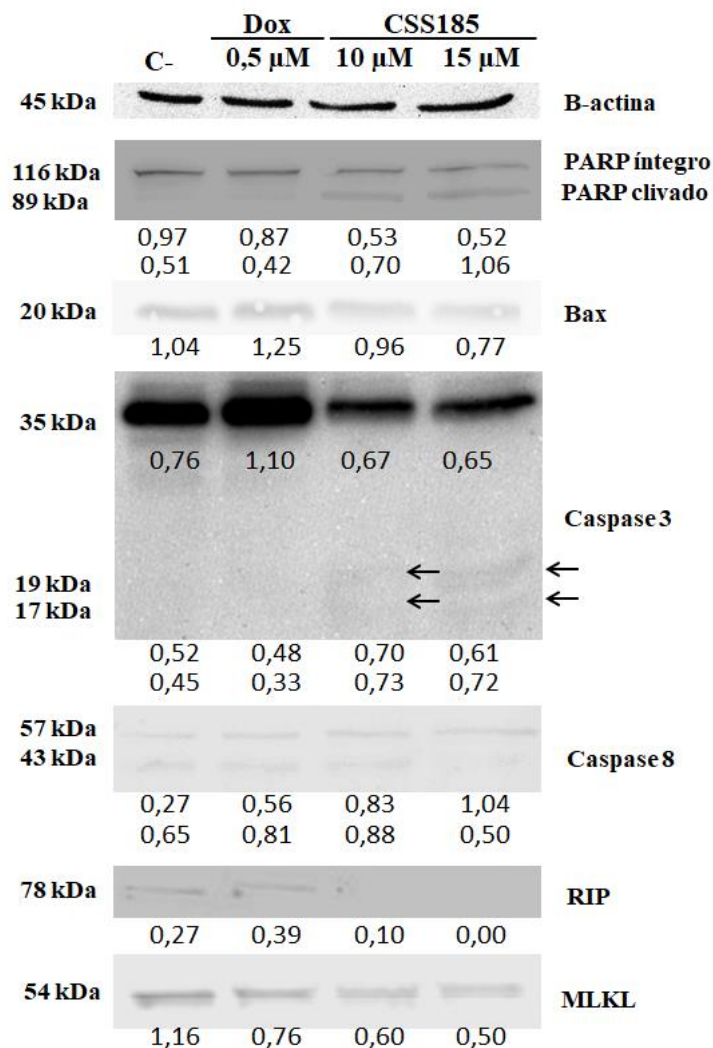


(B)





(C)



Processos de morte celular envolvidos no mecanismo de ação citotóxica da CSS185 em células SW-620, após 24 horas (A) e 48 horas (B) de incubação, determinado por coloração com laranja de acridina e brometo de etídio e avaliado por microscopia de fluorescência. Expressão de proteínas relacionadas com os processos de morte celular (apoptose e necroptose) envolvidos no mecanismo de ação citotóxica da CSS185 em células SW-620 após 24 horas de incubação (C). A doxorubicina (Dox 0,5 µM) foi utilizada como controle positivo do experimento. Os dados estão apresentados com os valores da média ± E.P.M., obtidos por pelo menos três experimentos realizados em triplicata. \*  $p < 0,05$  comparado com o controle negativo (C-) por ANOVA seguido de teste de Tukey's.

Fonte: elaborado pela autora.

### 5.3.3. Efeito antimigratório *in vitro* da chalcona-sulfonamida 185 em células B16F10 por meio do ensaio de migração celular

Com base em estudos prévios encontrados na literatura quanto ao efeito das chalconas-sulfonamidas sobre a adesão, migração e invasão celular, foi realizado um ensaio preliminar

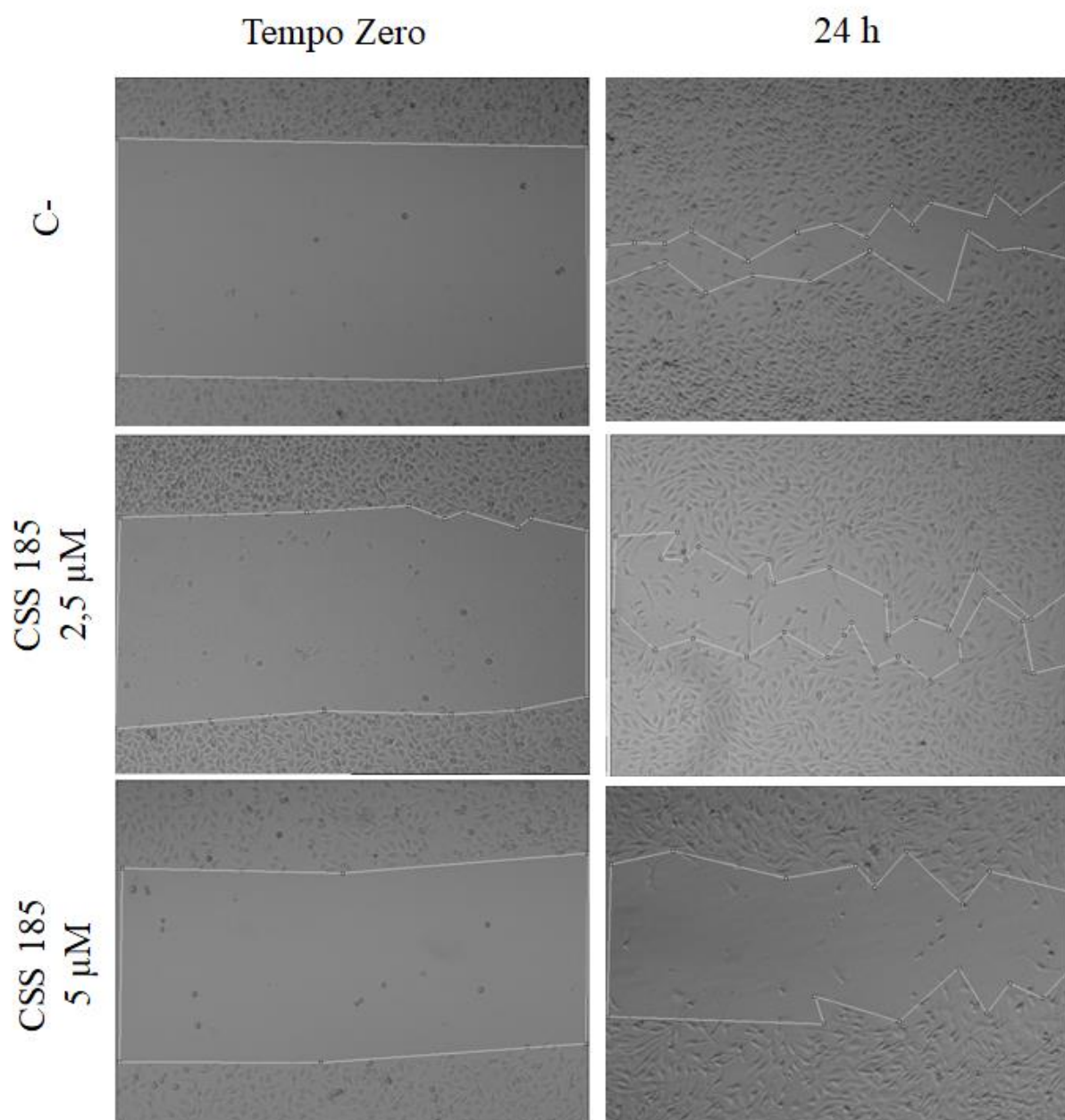
de migração celular em células B16F10 a fim de verificar o possível efeito antimigratório *in vitro* da CSS185. Para realização do ensaio, foram utilizadas concentrações da CSS185 sem efeito antiproliferativo, 2,5 e 5  $\mu\text{M}$ . Para o acompanhamento da migração celular, as células foram fotografadas em microscópio óptico invertido no tempo zero (sem tratamento) e após 24 horas de incubação com o composto, utilizando aumento de 50x (Figura 22A). O percentual de migração celular foi calculado com base na área do corte do tempo zero e após 24 horas. A figura 22B mostra que a CSS185, em ambas as concentrações, foi capaz de inibir a migração das células B16F10 de forma significativa quando comparado com o controle negativo.

Após a captura de imagem, as células foram tripsinizadas, coradas com iodeto de propídeo, contadas e analisadas, utilizando citometria de fluxo, para confirmar que as células estavam migrando e não proliferando e que as concentrações utilizadas de CSS185 não interferiram na proliferação e na viabilidade celular das células B16F10. Na Figura 22C, foi observado que houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) do número das células do controle negativo e das células tratadas com CSS185 quando comparadas com o tempo zero ( $T_0$ ), podendo estar relacionado com a presença de 0,25% de SBF. No entanto, não houve diferença estatística quanto ao número de células tratadas com CSS185 quando comparado com o controle negativo, após 24 horas de incubação. Além disso, não foi observada alteração na viabilidade das células tratadas com CSS185, sugerindo que o resultado obtido não teve interferência do efeito citotóxico da molécula.

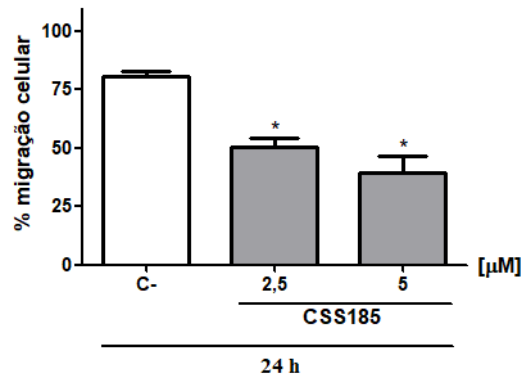
Com isso, sugere-se que a CSS185 pode ter efeito antimigratório em concentrações não citotóxicas. Logo, é necessário que outros experimentos sejam realizados a fim de confirmar o efeito antimigratório da chalcona-sulfonamida 185. Estes resultados foram de suma importância, abrindo perspectivas para um estudo mais aprofundado deste efeito.

**Figura 22. Efeito antimigratório da chalcona-sulfonamida 185 (CSS185) sobre células B16F10 murino.**

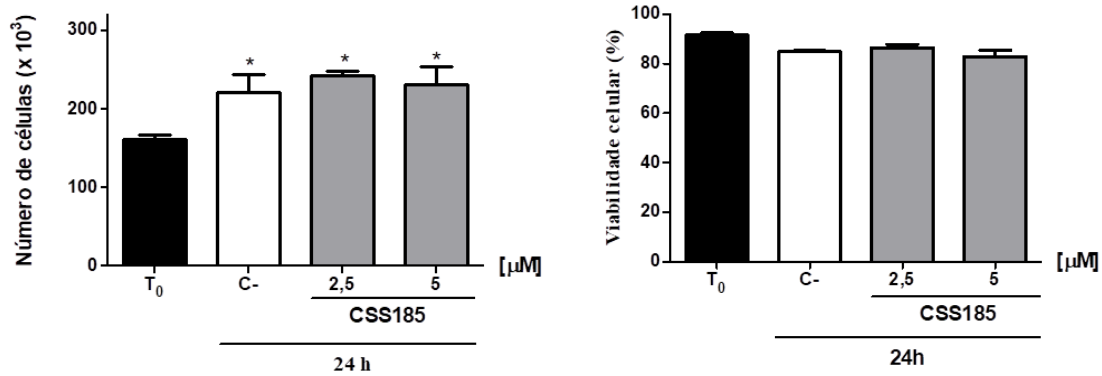
(A)



(B)



(C)



Ensaio de migração celular; à esquerda, fotos do corte realizado com ponteira antes do tratamento (tempo zero), à direita, fotos do corte 24 horas após o tratamento com CSS185 (2,5 e 5  $\mu\text{M}$ ); células fotografadas por microscopia óptica (50x). (A). Quantificação do percentual de migração celular com base no tempo zero utilizando Image J; os dados estão apresentados com os valores da média  $\pm$  E.P.M., obtidos a partir de pelo menos dois experimentos realizados em triplicata. \* $p < 0,05$  comparado com o controle negativo por ANOVA seguido de teste de Tukey's (B). Proliferação e viabilidade celular de células B16F10 após realização do corte (tempo zero - T<sub>0</sub>) e após tratamento de 24 horas com CSS185 (2,5 e 5  $\mu\text{M}$ ), utilizando citometria de fluxo (C). O controle negativo (C-) foi tratado com o veículo da amostra (DMSO). Os dados estão apresentados com os valores da média  $\pm$  E.P.M., obtidos a partir de pelo menos dois experimentos realizados em triplicata. \*  $p < 0,05$  comparado com o controle negativo (B) e com o tempo zero (T<sub>0</sub>) (C) por ANOVA seguido de teste de Tukey's. As células tratadas com CSS185 também foram comparadas com o controle negativo (C-) ( $p < 0,05$ ) não sendo observada diferença estatística entre os grupos. Dez mil eventos foram analisados em cada experimento de citometria de fluxo.

Fonte: elaborada pela autora.

## 6. DISCUSSÃO

A complexidade do câncer desafia constantemente a comunidade científica a buscar novas estratégias terapêuticas para combater a progressão tumoral e otimizar o tratamento de pacientes com essa doença. Com isso, a química medicinal tem buscado o desenvolvimento de novas moléculas, utilizando o conhecimento sobre a fisiopatologia da doença e das vias bioquímicas envolvidas, a fim de selecionar novos alvos moleculares e assim identificar novos compostos com atividade biológica otimizada e direcionada. A adição de grupamentos químicos a moléculas com atividade biológica conhecida por meio de síntese química tem sido frequente no intuito de determinar diferentes atividades biológicas bem como específicos mecanismos de ação (ANDRICOPULO et al., 2009; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2016; SILVA et al., 2015).

Tendo em vista o significativo potencial biológico de chalconas e sulfonamidas, a adição de um grupo sulfonamida à estrutura de uma chalcona tem sido desenvolvida por meio de síntese química, a fim de identificar novas moléculas com potencial terapêutico otimizado. Algumas atividades biológicas de chalconas-sulfonamidas têm sido descritas, tais como antifilária (BAHEKAR et al., 2016), antimalária (DOMÍNGUEZ et al., 2005) e anticâncer (BONAKDAR et al., 2017), bem como inibidor da  $\alpha$ -glucosidase (SEO et al., 2005), de  $\beta$ -secretase e acilcolinesterase (KANG et al., 2012), de anidrase carbônica (ARSLAN et al., 2016) e de ecto-5'-nucleotidase e fosfatase alcalina intestinal (EJAZ et al., 2017). No entanto, o estudo do mecanismo de ação anticâncer destas moléculas ainda precisa ser explorado; pois apesar da forte perspectiva quanto ao potencial antitumoral das chalconas-sulfonamidas, poucos são os estudos que descrevem as possíveis vias relacionadas com este efeito.

Com isso, este trabalho teve como objetivo estudar o potencial antitumoral de novas chalconas-sulfonamidas sintéticas e os mecanismos envolvidos na atividade antiproliferativa da chalcona-sulfonamida sintética 185 (CSS185) por meio de ensaios *in vitro*, avaliando os marcadores bioquímicos e moleculares de proliferação celular e as vias relacionadas com a indução do processo de morte celular em células metastáticas derivadas de câncer colorretal (SW-620), bem como, avaliar seu potencial antimigratório *in vitro* em linhagem melanoma B16F10.

Estudos recentes têm relatado a síntese química de novas chalconas-sulfonamidas e seu potencial antitumoral. O efeito antitumoral *in vitro* destas moléculas foi descrito em

algumas linhagens de células tumorais, tais como HEPG2 (câncer de fígado) (GHORAB et al., 2015), MCF-7 (câncer de mama) (BONAKDAR et al., 2017), SF-295 (glioblastoma), PC-3 (câncer de próstata) e HCT-116 (câncer colorretal) (CUSTODIO et al, 2018). No entanto, o mecanismo de ação desta classe de moléculas ainda não foi explorado. Com base nestes estudos, moléculas que contêm porções de sulfonamida e de chalcona podem levar a novas arquiteturas híbridas com perfis biológicos aprimorados (BONAKDAR et al., 2017; CUSTODIO et al, 2018; GHORAB et al., 2015).

No presente estudo, quatro novas chalconas-sulfonamidas sintéticas com estrutura química similar e mesma fórmula molecular foram testadas inicialmente contra três linhagens de células tumorais humanas. Possivelmente mudanças na posição do grupamento sulfonamida e do radical nitro ( $\text{NO}_2$ ) foram capazes de modificar a potência do efeito citotóxico destas moléculas, com variação do valor de  $\text{CI}_{50}$ , sendo observado desde a ausência de atividade até potencial efeito antiproliferativo. O posicionamento da sulfonamida na posição *meta* do anel benzênico das chalconas CSS55 e CSS63Ce pode estar relacionado com a redução da atividade das moléculas. Este posicionamento do anel benzênico juntamente com a posição *orto* do radical  $\text{NO}_2$  na molécula CSS63Ce possivelmente interferiu na atividade da molécula, visto que não foi observado citotoxicidade desta frente às linhagens de células tumorais testadas. Além disso, o posicionamento da sulfonamida na posição *para* pode estar relacionado com menor efeito da CSS185 frente às linhagens SF-295 e PC-3 e/ou com a aparente seletividade deste composto contra a linhagem HCT-116.

O efeito antitumoral das chalconas-sulfonamidas CSS99 e CSS185 pode ser compreendido pela semelhança estrutural entre a sulfonamida e o ácido *p*-aminobenzóico (PABA). Similaridades estruturais entre estes compostos podem gerar competição entre eles em algum processo metabólico celular. Ao inibir a enzima diidropteroato-sintetase, enzima responsável pela incorporação do ácido PABA no processo de síntese de ácido fólico, moléculas com tal semelhança estrutural podem afetar células que precisam sintetizar seu próprio ácido fólico (SOLOMONS; FRYHLE, 2009). Portanto, modificações no posicionamento do grupo sulfonamida de algumas moléculas podem interferir no efeito das mesmas, como observado neste estudo.

A utilização de quimioterápicos no tratamento do câncer resulta no aparecimento de diversos efeitos colaterais, como náuseas, vômitos, perda de peso, alopecia, úlceras gástricas, dentre outras. Uma das principais causas desses efeitos é a baixa seletividade desses fármacos

por células tumorais, afetando também células normais de elevada taxa de proliferação, como as células da pele, do trato gastrointestinal e do sangue (ANAZETTI et al., 2003). A descoberta de novos fármacos antineoplásicos com poucos ou insignificantes efeitos colaterais é um dos principais objetivos buscados por pesquisadores. Por isso, é de grande importância verificar o efeito de um determinado composto sobre células com atividade proliferativa normal (ZUCO et al., 2002; ANAZETTI et al., 2003).

Para isso, neste estudo, o painel de linhagens celulares foi ampliado para as amostras com potencial efeito antitumoral (CSS99 e CSS185), sendo testadas frente a nove linhagens de células tumorais e duas não tumorais, com distintas origens histológicas, utilizando método do MTT. Para a amostra CSS99 não houve padrão evidente de seletividade por uma determinada origem histológica, apresentando valor de  $CI_{50}$  semelhante entre a linhagem tumoral de hepatocarcinoma (HEP-G2 -  $CI_{50}$  8,42  $\mu$ M) e não tumoral de fibroblasto murino (L-929 -  $CI_{50}$  10,10  $\mu$ M), e valor de  $CI_{50}$  cerca de duas vezes maior para CMSP (23,8  $\mu$ M), no entanto com valor de  $CI_{50}$  menor (variando de 2,87 a 5,76  $\mu$ M) nas demais linhagens de células tumorais testadas. A amostra CSS185 se mostrou mais sensível para as linhagens derivadas de câncer colorretal HCT-116 ( $CI_{50}$  5,59  $\mu$ M) e SW-620 ( $CI_{50}$  6,27  $\mu$ M), apresentando valores de  $CI_{50}$  cerca de quatro vezes menor quando comparado com as demais linhagens de células tumorais e não tumorais testadas (dado obtido a partir o cálculo do índice de seletividade). A CSS185 também apresentou menor valor de  $CI_{50}$  para a linhagem leucêmica HL-60 (8,46  $\mu$ M).

Tendo em vista a agressividade do câncer colorretal, responsável pelo alto índice de morte de indivíduos com esse tipo de tumor (WHO, 2017), a descoberta de novos compostos com efeito aparentemente seletivo para este tipo de célula e o estudo do mecanismo de ação envolvido no efeito antiproliferativo destes compostos, é de suma importância. Com isso, a exibição de efeito citotóxico mais sensível da chalcona-sulfonamida 185 contra células de câncer colorretal abre perspectivas para um estudo mais aprofundado do mecanismo de ação desta molécula.

A fim de dar início ao estudo do mecanismo de ação da chalcona-sulfonamida 185, foi avaliada a relação tempo dependência do efeito antiproliferativo deste composto frente às linhagens de câncer colorretal, HCT-116 e SW-620. Nos resultados obtidos foi observado que a CSS185 apresentou citotoxicidade frente à linhagem SW-620 desde as primeiras 24 horas de incubação, enquanto que o efeito sobre a linhagem HCT-116 foi observado apenas após 48

horas de incubação. Logo, é possível perceber que dependendo do contexto celular de cada linhagem e do tempo de incubação, a CSS185 pode apresentar perfil citotóxico distinto, podendo distinguir também quanto ao mecanismo de ação. A partir destes resultados, foi dada continuidade ao estudo do mecanismo de ação da CSS185 frente à linhagem SW-620.

A maioria dos agentes anticâncer convencionais tem potencial citostático e citotóxico. O paclitaxel, por exemplo, pode atuar de forma citostática ou citotóxica dependendo da concentração testada. Em baixas concentrações, o paclitaxel exibe um perfil de citostaticidade, inibindo a proliferação celular, induzindo a hiperpolarização mitocondrial, mas não induz a apoptose. Esse efeito está relacionado com a desaceleração do ciclo celular ao invés de uma parada em uma fase específica do ciclo. Em concentrações mais altas, o paclitaxel apresenta um perfil citotóxico, induzindo a morte celular por apoptose e a despolarização mitocondrial, com aumento do número de células na fase G<sub>2</sub>/M do ciclo celular (PASQUIER et al., 2004). Logo, a determinação da citostaticidade ou da citotoxicidade *in vitro* depende de diversos fatores, como as concentrações testadas, o tempo de incubação e o contexto celular (RIXE; FOJO, 2007; WEISSENSTEIN et al., 2014).

Muitos ensaios colorimétricos têm sido descritos para realização de testes de citotoxicidade *in vitro* de células tumorais. O ensaio do MTT é intensamente utilizado para a determinação da viabilidade e da proliferação celular desde seu desenvolvimento por Monsmann nos anos de 1980 (VAN TONDER; JOUBERT; CROMARTY, 2015). No entanto, este ensaio oferece algumas desvantagens, devido à distinta capacidade das células quanto à habilidade de reduzir o corante, bem como baixa reprodutibilidade dos resultados de acordo com a variação da densidade de células. Além disso, por meio do ensaio do MTT não é possível distinguir o efeito citostático e/ou citotóxico de uma determinada molécula (KEEPERS et al., 1991). Com isso, o ensaio do SRB tem sido bastante utilizado devido a sua maior linearidade e sensibilidade, demonstrando melhor reprodutibilidade dos resultados, além de oferecer mais informações sobre o efeito antiproliferativo de uma molécula, sendo possível inferir e diferenciar o efeito citostático e/ou citotóxico de uma determinada molécula (KEEPERS et al., 1991; PAPAISIS et al., 1997).

A fim de determinar o perfil citostático e/ou citotóxico da CSS185 foi realizado o ensaio da sulforodamina B. A partir deste ensaio, foi possível verificar que o composto atua de maneira citostática e citotóxica desde 24 horas de incubação até 72 horas, com perfil antiproliferativo semelhante em todos os tempos de incubação. No presente estudo, os valores



de  $CI_{50}$  foram distintos quando o efeito antitumoral da CSS185 foi testado em células SW-620 pelos ensaios de MTT e SRB. Isto é esperado, tendo em vista o valor da concentração capaz de inibir 50% da proliferação celular ( $CI_{50}$ ) calculado a partir deste método do SRB é baseado apenas efeito citostático de uma molécula, diferentemente do ensaio do MTT. Isto resulta, por muitas vezes, em distinto valor de  $CI_{50}$  dependendo do método utilizado, devido a diferente forma de normalização dos dados, sensibilidade dos testes e principalmente devido o princípio de cada teste (KEEPERS et al., 1991).

O crescimento das células SW-620 tratadas com CSS185 foi monitorado em tempo real por meio do sistema *XCelligence*, utilizando concentrações determinadas previamente pelos ensaios de quantificação indireta e direta da viabilidade celular, pelos métodos MTT e de exclusão do azul de Tripan, respectivamente. Apesar da distinção entre os métodos, quanto a forma de avaliação, sensibilidade, análise e interpretação, foi possível concluir que a CSS185 na concentração de 15  $\mu\text{M}$  demonstrou elevada citotoxicidade nas primeiras 24 horas de incubação, com queda significativa na curva de crescimento celular, enquanto que, na concentração de 10  $\mu\text{M}$  esta queda foi observada a partir de 48 horas de incubação, não sendo observado queda na curva de crescimento nas concentrações de 2,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  e 7,5  $\mu\text{M}$ . Isto pode ser justificado pela forma de distribuição e de crescimento da linhagem SW-620 no fundo do poço, visto que esta linhagem consiste em pequenas células esféricas e bipolares não ocupando todo o substrato disponível para crescimento, o que pode interferir no índice de célula (*Cell index*) demonstrado no resultado gráfico do sistema de *Xcelligence*.

O consumo de flavonóides tem sido associado com a prevenção, controle e tratamento de vários tipos de câncer. No câncer colorretal, muitos destes flavonóides estão associados com o controle e a prevenção da doença, afetando a carcinogênese por meio de diferentes alvos, incluindo a progressão do ciclo celular e a indução de apoptose (KELLO et al., 2016). As chalconas, moléculas precursoras de flavonóides e isoflavonóides, têm oferecido vantagens como agentes anticâncer, comparado com outros flavonóides, devido à interação com o DNA e baixo risco de mutagênese (AMADO et al., 2014; CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009; DIMMOCK et al., 1999; FONSECA et al., 2015; PERICLEOUS; MANDAIR; CAPLIN, 2013).

O mecanismo de citotoxicidade de muitos agentes anticâncer convencionais é baseado no dano de DNA e subsequente indução de apoptose. No entanto, as células tumorais também podem responder a agentes capazes de desacelerar o ciclo celular, sendo conhecidos como

agentes citostáticos. Estes compostos não matam células cancerosas, mas impedem que essas células se proliferem (RIXE; FOJO, 2007). A citostaticidade pode ser o passo inicial para diferentes mecanismos de morte celular. A parada do ciclo celular, apesar de não estar necessariamente correlacionada com a probabilidade de morte, pode induzir morte celular, enquanto que a citotoxicidade resulta em morte celular por apoptose, necrose ou autofagia (WEISSENSTEIN et al., 2014).

Os agentes citostáticos atuam, muitas vezes, inibindo a progressão da carcinogênese. Existem proteínas reguladoras chave no controle do ciclo celular, que são atualmente alvos para a terapia do câncer. Algumas proteínas são responsáveis por acelerar o ciclo celular e se tornam oncogênicas se permanentemente ativas ou expressas em altas taxas, como as proteínas Ras, Raf, CDK 4/6 e myc. Em contraste, outras proteínas desaceleram ou interrompem o ciclo celular e, assim, suprimem a oncogênese, a menos que estejam inativadas ou mutadas, como p53, p21, p16 e pRb (KLAASSEN; WATKINS, 2012). O sorafenib, por exemplo, é um inibidor de multiquinases responsável pela inibição da expressão da proteína Raf e dos receptores de fator de crescimento, sendo considerado um agente citostático devido aos seus efeitos sobre a proliferação celular e a angiogênese (RIXE; FOJO, 2007).

Por meio da análise do conteúdo de DNA de células SW-620 tratadas com CSS185 foi possível observar que a CSS185 induziu um aumento do número de células na fase G<sub>2</sub>/M em todas as concentrações testadas após 24 horas de incubação. No entanto, este aumento parece ser reversível com o decorrer do tempo nas concentrações de 5 µM, 7,5 µM e 10 µM, tendo em vista que, o aumento do número de células em G<sub>2</sub>/M foi menos expressivo após 48 horas de incubação nestas concentrações, apesar de significativo nas concentrações de 7,5 µM e 10 µM quando comparado com o controle negativo. Por outro lado, na concentração de 15 µM, a parada em G<sub>2</sub>/M foi mantida em ambos os períodos de tratamento de maneira significativa.

Um grupo de proteínas é ativado e inativado durante o ciclo celular. As ciclinas são catalisadas e ativadas na presença de enzimas do tipo proteína quinase, denominadas quinases dependentes de ciclinas (Cdk). Esta ligação permite que estas quinases realizem a função de fosforilar outras proteínas envolvidas no ciclo celular. Cada ciclina é específica para determinados períodos do ciclo celular, sendo a ciclina A sintetizada na fase S e na fase G<sub>2</sub> enquanto que a ciclina B tem seus níveis celulares presentes durante as fases G<sub>2</sub> e M (ALEEM; ARCECI, 2015).

A indução de estresse durante o processo de replicação e a resposta celular ao dano de DNA em células tumorais alarma a ativação de cascatas de quinases ATR/Chk1 (do inglês, *ATM- and RAD3 - related/checkpoint 1*) e ATM/Chk2 (do inglês, *ataxia telangiectasia mutated/checkpoint 2*), dependendo do tipo de estresse genotóxico. A ativação destas fornece uma barreira anticâncer, geralmente levando à eliminação de células tumorais com alto potencial proliferativo (SHERR; BARTEK, 2017). ATM é ativada em resposta a radiação ionizante, agentes radiomiméticos e agentes que causam quebra de dupla fita de DNA, resultando em fosforilação e ativação de Chk2, que fosforila CDC25c (Ser 216). A supressão da atividade de CDC25c fosfatase resulta na inibição da fosforilação do complexo CDK1/Ciclina B, mantendo CDK1 em uma forma inativa e prevenindo a entrada na fase de mitose (ALEEM; ARCECI, 2015). ATR, por sua vez, é uma quinase essencial para a progressão do ciclo celular não perturbado e funciona como um sensor de ponto de verificação de DNA de fita simples, fosforilando Chk1 e outras proteínas necessárias para indução da parada do ciclo celular quando há dano. Se os pontos de checagem são defeituosos ou inibidos farmacologicamente, o dano ao DNA não será reparado e as células entram em processo de morte celular devido ao acúmulo de lesões. No entanto, se o dano ao DNA for subsequentemente reparado, a parada pode ser revertida (ALEEM; ARCECI, 2015; SHERR; BARTEK, 2017)

Com isso, a expressão proteica de proteínas envolvidas com o controle destas fases do ciclo celular foi avaliada por *Western blot* em células SW-620 tratadas com CSS185 nas concentrações de 10 e 15  $\mu\text{M}$  por 24 horas. O aumento da expressão de ciclina A2 e pChk1 foi observado apenas na doxorrubicina, utilizada como controle positivo do experimento. Enquanto que a CSS185 induziu aumento da expressão de ciclina B1 e pChk2 na concentração de 10  $\mu\text{M}$ , com redução da expressão desta ciclina na concentração de 15  $\mu\text{M}$ , enquanto que a expressão de pChk2 não teve diferença quando comparado com o controle negativo.

O p53 é um supressor tumoral responsável pela regulação negativa do crescimento celular, tendo importante papel na resposta ao estresse celular. Mutações no gene p53 são frequentes em uma variedade de cânceres humanos, levando à desregulação do ciclo celular, instabilidade genômica, resistência a sinais de estresse e conseqüente desenvolvimento do câncer. Estas mutações promovem ganho de função oncogênica, exacerbando as propriedades malignas das células tumorais, bem como induzindo a formação de metástases e resistência à

terapia. Com isso, a mutação no p53 é um importante alvo na terapia do câncer (PARRALES; IWAKUMA, 2015; VIJAYAKUMARAN et al., 2015).

A mutação do gene p53 está presente em células SW-620, sendo um dos genes responsável pela estimulação da oncogênese (AHMED et al., 2013). Com isso, foi avaliada a expressão da proteína pP53 de células SW-620 tratadas com CSS185. A expressão de pP53 foi observada apenas nas células tratadas com doxorubicina. Logo, é possível sugerir que o efeito antitumoral da CSS185 não está relacionado com alterações na expressão da proteína pP53.

A associação entre o ciclo celular e o câncer tem sido mostrada em vários estudos, sendo a inibição do ciclo celular alvo para o tratamento do câncer, em que os complexos ciclinas-CDK e a inibição de aurora quinase são um dos maiores alvos (JEONG et al., 2011; SHERR; BARTEK, 2017). Com isso, pode-se sugerir que o efeito citostático e citotóxico da CSS185 em células SW-620 pode estar relacionado com o aumento do número de células na fase G2/M do ciclo celular associado com aumento da expressão de ciclina B1e pChk2 de maneira concentração dependente, possivelmente devido a indução de estresse durante o processo de replicação, sendo esta uma resposta celular ao dano de DNA com consequente morte celular. Além disso, a expressão de outras quinases envolvidas nesta fase do ciclo celular pode estar alterada.

Não foram encontrados estudos descrevendo o mecanismo de ação envolvido no efeito antitumoral de chalconas-sulfonamidas. No entanto, estudos têm mostrado o efeito citotóxico de vários derivados de chalconas em diversas linhagens de câncer (DRUTOVIC et al., 2014; KELLO et al., 2016; KIM et al., 2015). Tipicamente, a forma de indução de morte celular por estes compostos é a apoptose, resultante de uma variedade de eventos celulares, como alteração mitocondrial, modificação no metabolismo oxidativo com mudança no conteúdo de ATP dentro da célula e alteração na expressão de genes envolvidos na regulação da apoptose (VASCONCELOS et al., 2013).

Diversos artigos relatam potencial efeito citotóxico de chalconas e seus derivados frente a células de câncer colorretal, dentre elas HCT-116 (DRUTOVIC et al., 2014; KIM et al., 2015), Caco-2 (KELLO et al., 2016) e HT-29 (FONSECA et al., 2015). Em geral, as chalconas induzem parada das células na fase G2/M do ciclo celular, fragmentação e condensação nuclear e morte por apoptose em células HCT-116, decorrente de inibição da

formação de microtúbulos com ativação de caspases (DRUTOVIC et al., 2014), ou inibição da via Wnt/ $\beta$ -catenina (FONSECA et al., 2015); e autofagia dependente de p53/JNK (KIM et al., 2015). A inibição do crescimento de células Caco-2 por chalconas foi relatada com indução de parada também em G2/M e morte celular por apoptose com indução de espécies reativas de oxigênio (KELLO et al., 2016).

A fim de identificar o padrão de morte celular envolvido no efeito citotóxico da chalcona-sulfonamida 185, as alterações morfológicas induzidas por esta molécula em células SW-620 foram avaliadas por coloração com kit panótico rápido, utilizando microscopia óptica. A partir da concentração de 10  $\mu$ M, células SW-620 tratadas com CSS185 durante 24 horas exibiram núcleo aparentemente com fragmentação e condensação de cromatina, formação de *blebs* na membrana de algumas células, além da presença de alteração de membrana citoplasmática e de restos celulares na concentração de 15  $\mu$ M. As alterações celulares observadas nas concentrações de 10 e 15  $\mu$ M indica um perfil citotóxico iniciado pelo composto já nas primeiras 24 horas de tratamento, como foi observado no ensaio do SRB. Após 48 horas, foi possível observar esse perfil citotóxico desde a concentração de 7,5  $\mu$ M, sendo observadas alterações, como rarefação celular, alteração na membrana citoplasmática, restos celulares com aparente liberação extracelular de componentes citoplasmáticos e aparecimento de algumas células com corpos apoptóticos.

A indução de morte por perda da integridade da membrana celular foi observada por citometria de fluxo, utilizando o corante iodeto de propídeo. Neste experimento foi possível observar perda da integridade de membrana das células SW-620 tratadas com CSS185 nas concentrações de 10  $\mu$ M e 15  $\mu$ M após 24 e 48 horas de incubação, corroborando com os achados de microscopia. Apesar das alterações celulares observadas por microscopia óptica nas células tratadas com CSS185 (7,5  $\mu$ M) após 48 horas de incubação, a redução do percentual de células viáveis, nesta concentração e neste período de tratamento, não foi significativa com relação ao controle negativo. Além disso, houve uma redução significativa do número de células tratadas com CSS185 (10  $\mu$ M e 15  $\mu$ M) após 24 horas de tratamento, e de células tratadas com CSS185 (7,5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M e 15  $\mu$ M) após 48 horas de tratamento, corroborando com os achados de rarefação celular na microscopia óptica.

Vale ressaltar que, nas células tratadas com CSS185 (10  $\mu$ M), apesar da perda de integridade de membrana em ambos os períodos de tratamento, houve duplicação do número de células quando comparamos o tempo de incubação de 24 horas com 48 horas; enquanto

que, na concentração de 15  $\mu\text{M}$ , não foi observada esta duplicação. Estes achados podem estar relacionados com a indução da parada do ciclo celular pela CSS185. Como relatado anteriormente, na concentração de 10  $\mu\text{M}$  foi observada uma possível reversão da indução de parada na fase G2/M pelas células SW-620, devido à redução do percentual de células nesta fase quando comparado os tempos de 24 horas (44,1%) com 48 horas (21,9%) de incubação, enquanto que, na concentração de 15  $\mu\text{M}$ , o percentual de células em G2/M foi mantido em ambos os tempos.

A atividade de muitos agentes quimioterapêuticos envolve a indução de morte celular por apoptose. A apoptose é caracterizada por diversas alterações morfológicas tais como condensação nuclear associada a fragmentação de DNA, formação de corpos apoptóticos e ativação de caspases. Em uma fase tardia da apoptose, a célula apresenta perda da integridade de membrana (DRUTOVIC et al., 2014). Quanto às alterações nucleares, a CSS185 induziu fragmentação de DNA internucleossomal em células SW-620, com aumento do número de células em fase sub-G1, induzindo quebra de fita simples e/ou dupla de DNA em todas as concentrações testadas (7,5; 10 e 15  $\mu\text{M}$ ), corroborando com os achados de microscopia óptica. Estes achados podem estar relacionados com a possível indução de estresse durante o processo de replicação, desencadeando uma resposta celular ao dano de DNA associado com os achados de ciclo celular com consequente morte celular. A indução de fragmentação de DNA por chalconas tem sido observada em células de câncer colorretal SW-620, HCT-116 e Caco-2, com consequente morte por apoptose (DRUTOVIC et al., 2014; KELLO et al., 2016; LEE et al., 2014).

Uma das características bioquímicas da apoptose é a externalização da fosfatidilserina, liberando citocromo *c* da mitocôndria com consequente despolarização mitocondrial (BORTNER; CIDLOWSKI, 2014). Esta despolarização é induzida pela família de proteínas pró-apoptóticas Bcl-2, permeabilizando a membrana da mitocôndria, caracterizando e desencadeando a via intrínseca da apoptose. Essas alterações no potencial transmembrânico mitocondrial também podem ser observadas em outros tipos de morte celular, como na autofagia (GREEN; LLAMBI, 2015). A chalcona-sulfonamida 185 foi capaz de induzir discreta despolarização mitocondrial em células SW-620, nas maiores concentrações testadas (10 e 15  $\mu\text{M}$ ) em ambos os períodos de incubação.

A indução de um processo de morte celular por algumas drogas pode estar relacionado com o rompimento do equilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e as

defesas antioxidantes, resultando em estresse oxidativo e consequente morte (LEE et al., 2015). Além disso, o efeito citotóxico de algumas chalconas tem sido associado com disfunção mitocondrial podendo vir acompanhada de geração de EROs com consequente morte celular (KELLO et al., 2016).

A utilização de compostos antioxidantes, como tocoferol e N-acetilcisteína (NAC), induz efeito protetor ao dano oxidativo (LEE et al., 2015). Com isso, a fim de verificar possível indução de geração de EROs associado com o efeito citotóxico da CSS185, células SW-620 pré-tratadas com NAC foram incubadas com esta molécula. No entanto, o pré-tratamento com NAC não inibiu um possível dano oxidativo induzido pela CSS185, visto que foi observado mesmo valor de  $CI_{50}$  quando comparado com células que não receberam o pré-tratamento com NAC. Em um estudo realizado por Lee e colaboradores (2014), uma naftochalcona testada em células SW-620, induziu morte celular por apoptose, no entanto, não foi observado geração de EROs, corroborando com os dados apresentados neste estudo.

A fim de confirmar o processo de morte celular envolvido no mecanismo citotóxico da CSS185, foi realizado um ensaio de coloração com laranja de acridina e brometo de etídio, utilizando microscopia de fluorescência para contagem diferencial de células viáveis, em apoptose inicial, apoptose tardia e necrose. Neste ensaio, foi observado que a CSS185 induziu significativamente o aumento do número de células necróticas, sugerindo que as alterações celulares observadas, tais como fragmentação nuclear, alterações na membrana citoplasmática com aparente perda de conteúdo citoplasmático e presença de restos celulares, possivelmente estão relacionadas com indução de morte celular por necrose.

A morte celular por necrose engloba uma variedade de processos de morte celular com um denominador comum: a perda da integridade da membrana plasmática seguida de extravasamento citoplasmático. A morfologia celular necrótica pode ser também observada em estágios tardios de morte celular programada, como na apoptose e na autofagia, quando células mortas não são eliminadas por fagocitose. Este processo é conhecido como necrose secundária e é independente de qualquer outro evento de sinalização. A necrose pode ser induzida e desencadeada de maneira regulada como a apoptose. Um tipo de necrose programada que tem sido muito explorada é a necrose dependente de RIP quinase, também conhecida como necroptose. Este tipo de morte requer a ativação da quinase de RIP3 e pode resultar em rápida morte celular com características de necrose (SU et al., 2016; GREEN; LLAMBI, 2015).

A necroptose é caracterizada por sinais de processos controlados, como disfunção mitocondrial, aumento de geração de EROs pelas mitocôndrias, depleção de ATP, falha da homeostase de cálcio, agregação perinuclear de organelas, proteólise por calpaínas e catepsinas, ativação de PARP, ruptura lisossômica, com ruptura da membrana plasmática (SU et al., 2016; SIVIERO, 2013). Neste tipo de morte, o teor de cálcio aumenta no citosol, pois os mecanismos que o retiram estão falhos. Como consequência, ocorre falta de ATP, induzindo assim a morte da célula. Este aumento de cálcio no citosol e na matriz extracelular pode desencadear a despolarização da membrana interna mitocondrial e permeabilização dessa membrana (SIVIERO, 2013).

Este tipo de necrose programada tem sido uma via de morte alternativa, principalmente quando há o desenvolvimento de resistência a drogas antineoplásicas indutoras de apoptose. Como a via necroptótica utiliza componentes que são diferentes da via apoptótica, células cancerígenas resistentes a agentes pró-apoptóticos podem ser sensíveis à indutores de necroptose. Por exemplo, a apoptose precisa da ativação de caspases, mas a necroptose pode induzir morte em células tumorais quando as caspases são inibidas ou defeituosas (SU et al., 2016). Muitos estudos tem validado esta hipótese, relatando que quimioterápicos, como o paclitaxel, o etoposídeo e o 5-fluorouracil (5-FU), que induzem dano ao DNA têm mostrado recentemente indução de morte celular por necroptose via RIP1/RIP3/MLKL (BROWN et al, 2015; JANG et al., 2011; TENEV et al., 2011).

No presente estudo, no intuito de esclarecer o possível mecanismo de ação envolvido no efeito citotóxico da chalcona-sulfonamida 185, foi avaliada a expressão de proteínas relacionadas à morte celular tanto por apoptose como por necroptose. Confirmando a indução de morte celular pela CSS185, foi observada clivagem do PARP, um importante marcador de morte celular, nas células SW-620 tratadas com o composto. A hiperativação de PARP pode estar relacionada com a liberação de fatores indutores de apoptose bem como de diversos tipos de necrose, dentre elas a necroptose (GALLUZZI et al., 2017). Na apoptose, o primeiro substrato de reconhecimento das caspases são as enzimas de reparo do DNA, como o PARP. A clivagem do PARP pela caspase impede sua ação neste processo de reparação. No entanto, quando há danos excessivos ao DNA a maior atividade de PARP consome seu NAD (do inglês, *Nicotinamide adenine dinucleotide*). Nova síntese de NAD consome ATP e eventuais perdas do estoque de energia causam a morte celular por necrose (SIVIERO, 2013).



Muitos genes estão envolvidos na regulação da apoptose. Enquanto o Bcl-2 é um regulador anti-apoptótico, o Bax é um regulador pró-apoptótico. O equilíbrio entre a expressão de Bcl-2 e Bax desempenha um importante papel na manutenção da morfologia e da função celular. Alguns estudos têm demonstrado que a expressão de Bcl-2 é reduzida por chalconas, enquanto que a expressão de Bax é aumentada, sugerindo que a expressão de Bax e Bcl-2 está envolvida em eventos apoptóticos associados com o efeito citotóxico de chalconas em linhagens de câncer colorretal (VASCONCELOS et al., 2013). Além disso, a via extrínseca da apoptose envolve a ligação de fatores de morte à receptores de morte com consequente ativação de caspase-8. Na via mitocondrial ou intrínseca, por outro lado, vários desencadeadores de apoptose, como dano de DNA, causam ativação de caspase-9. Nestas duas vias, com a ativação das caspases iniciadoras ocorre a ativação de caspases efetoras como caspase-3 e -7. A caspase-3 é considerada a principal caspase efetora e tem sido identificada como sendo ativada em resposta a agentes citotóxicos (KREPELA et al., 2001).

Com isso, a expressão da proteína pró-apoptótica Bax e das caspases 3 e 8 foi avaliada no presente estudo, a fim de verificar se a apoptose está envolvida no efeito citotóxico da CSS185. A partir dos resultados obtidos, foi observada uma diminuição da expressão proteica de Bax em ambas concentrações testadas, bem como da expressão de caspase 3 com clivagem de bandas; além de inibição da clivagem da caspase 8 na maior concentração testada (15  $\mu$ M). Isto sugere que o possível mecanismo de morte induzido pela chalcona-sulfonamida 185 pode estar associado ou não com a ativação de caspases, dependendo da concentração testada. No entanto, a morte celular por apoptose parece não ser a principal via de morte envolvida no efeito citotóxico da CSS185.

Estudos têm demonstrado que a necroptose pode ser estimulada quando células são tratadas com um inibidor de pan-caspases, o z-VAD, devido à inativação da caspase-8 que é impedida de clivar os dois reguladores-chave da necroptose RIP1 e RIP3 (OBERST et al., 2011). A resistência ao 5-fluorouracil, uma droga pró-apoptótica, é um desafio na quimioterapia adjuvante do câncer colorretal (SU et al., 2016). Metzsig e colaboradores (2015) relataram que o uso de inibidores de pancaspases podem sensibilizar células de câncer colorretal ao 5-FU desencadeando a necroptose. Com isso, a inibição da caspase-8, induzida muitas vezes por mutações, silenciamento ou fármacos, desencadeia a ativação da RIP3 com consequente indução da necroptose (HE et al., 2017).

Outros agentes indutores de dano ao DNA tais como TRAIL (do inglês, *TNF-related apoptosis-inducing ligand*), induzem necroptose em células tumorais por meio da supressão de caspases e ativação de RIP1/RIP3 (WU et al., 2013). Muitos inibidores de quinases, incluindo staurosporina e sorafenib, também induzem necroptose dependente de RIP1/MLKL (DUNAI et al., 2012, SCHMIDT et al., 2015). Em adição, o silenciamento de RIP3, em algumas linhagens, causa quimioresistência ao 5-FU, cisplatina, camptotecina e etoposídeo em células de câncer de cólon e mama (FULDA, 2014).

Com isso, por meio de um ensaio preliminar, foi avaliada neste estudo a expressão de proteínas específicas envolvidas no processo de necroptose, RIP e MLKL, em células SW-620 tratadas com CSS185. A partir dos resultados obtidos, foi observada uma diminuição da expressão de RIP e MLKL em ambas as concentrações testadas de CSS185, o que é esperado em um processo de morte celular por necroptose, tendo em vista que ambas as proteínas encontram-se fosforiladas quando o processo é ativado (WANG et al., 2017). Estes dados sugerem que a necroptose pode estar envolvida no efeito citotóxico da chalcona-sulfonamida 185, sendo um mecanismo de morte que pode ter papel positivo no tratamento do câncer.

Curiosamente, estudos recentes têm relatado que a expressão de RIP3 está silenciada em muitos tipos de câncer devido à metilação genética. Dentre os tipos de câncer colorretal que apresentam silenciamento de RIP3, destacam-se: HCT-116, Caco-2, RKO e DLD-1. No entanto, outras linhagens, tais como, SW-620, SW480 e HT-29 expressam MLKL, RIP1 e RIP3 (YANG, et al., 2017). Com isso, é possível sugerir que o mecanismo de morte induzido pela CSS185 em células SW-620 difere do processo de morte em células HCT-116; pois apesar das linhagens HCT-116 e SW-620 apresentarem mesma origem histológica, elas dispõem de algumas características distintas. Isto abre perspectivas para o estudo do mecanismo de ação deste composto frente a linhagem HCT-116.

A formação de metástases é um dos responsáveis pela morbidade e altas taxas de mortalidade de pacientes com câncer. Para que ocorra a metastatização, a expressão de genes envolvidos nos processos de migração, adesão e invasão, é requerida para que o tumor seja capaz de realizar interações apropriadas com o microambiente a fim de promover contínua sobrevivência dessas células metastáticas para que assim, estas possam migrar e proliferar em sítios distantes (HURST; WELCH, 2011). Com isso, a descoberta de novos compostos capazes de interferir em um destes processos é de suma importância para o desenvolvimento de novas drogas capazes de combater a formação de metástases.

Alguns trabalhos têm descrito um possível efeito inibitório das chalconas-sulfonamidas sobre a adesão, invasão e migração de células tumorais (LEE et al., 2010; EJAZ et al., 2017). Lee e colaboradores (2010), ao descreverem a indução de adesão e migração de células de câncer de colon devido a sialilação de integrina  $\beta 1$  induzida por radiação, observou que uma chalcona-sulfonamida foi capaz de inibir a sialilação de integrina  $\beta 1$  e a adesão e migração celular induzida por radiação.

Um trabalho publicado recentemente descreveu o efeito inibidor de ecto-5'-nucleotidase (e5'NT) e fosfatase alcalina intestinal de uma nova chalcona-sulfonamida sintética. Alguns nucleotídeos extracelulares, como fosfatase alcalina (FA) e ecto-5'-nucleotidase (e5'NT) se encontram super-expressos em alguns tipos de câncer, como no câncer de mama, cólon, tireoide, esôfago, bem como em melanoma, leucemia e câncer gástrico, resultando no aumento da produção de adenosina e consequente aumento da proliferação tumoral e da invasividade das células tumorais, favorecendo a angiogênese e interferindo na resposta do corpo ao tumor (EJAZ et al., 2017).

Estes dados despertaram interesse quanto à investigação do possível efeito inibitório da chalcona-sulfonamida 185 sobre a adesão, invasão e migração de células tumorais. Com isso, foi realizado um ensaio preliminar de migração celular em células B16F10 tratadas com CSS185. Este ensaio é um método econômico para o estudo da migração celular *in vitro*, que envolve a criação de uma “ferida” em uma monocamada de células com alto potencial migratório, seguido de captura de imagens durante a realização da “ferida” e em intervalos regulares durante a migração celular até o fechamento da ferida. A comparação das imagens determina a taxa de migração celular (LIANG; PARK; GUAN, 2007).

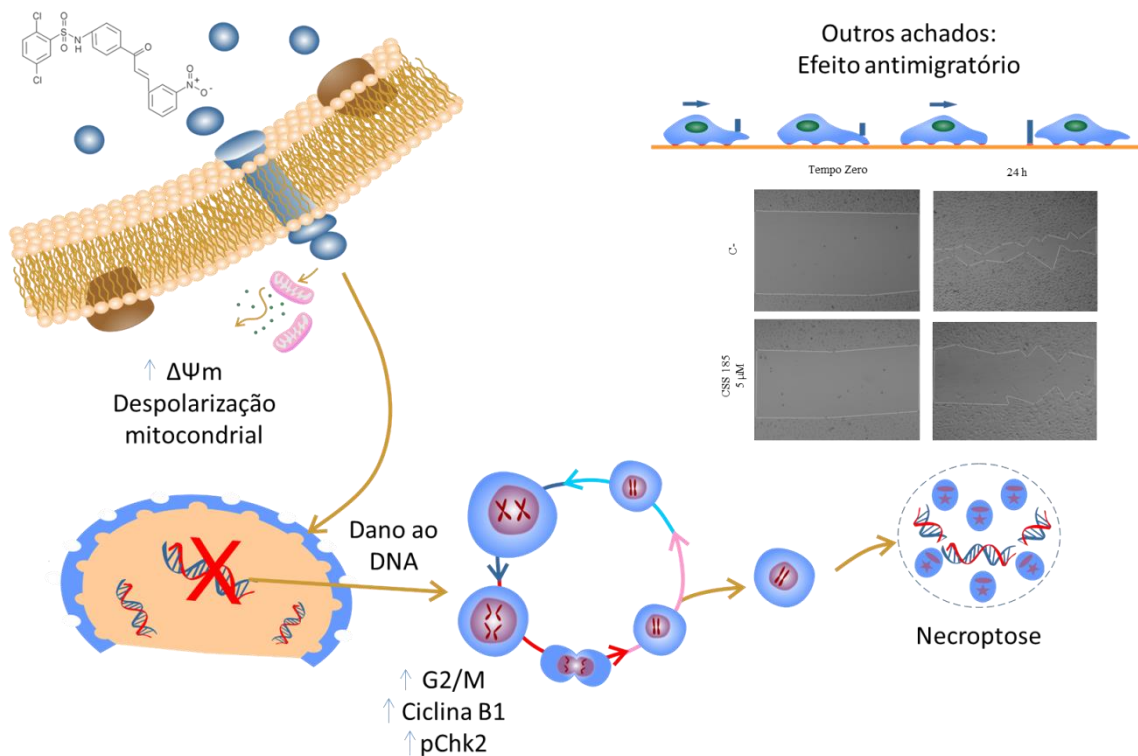
A partir deste ensaio foi possível observar que a chalcona-sulfonamida 185 foi capaz de inibir a migração de células B16F10 utilizando uma concentração não citotóxica, sugerindo que a molécula pode ser uma candidata à agente antimigratório, abrindo novas perspectivas quanto ao estudo do mecanismo de ação da chalcona-sulfonamida 185 e seu possível efeito sobre a migração celular. No entanto, faz-se necessário a realização de um estudo mais aprofundado do efeito da CSS185 sobre os diversos mecanismos bioquímicos envolvidos nos processos de migração, adesão e invasão, a fim de confirmar o papel deste composto na inibição da formação de metástase.

Por fim, a chalcona-sulfonamida 185 pode ser vista como potencial agente anticâncer tendo em vista suas habilidades em suprimir o crescimento celular por indução de parada de ciclo celular e morte celular por necroptose de células de câncer colorretal (SW-620), bem como, inibir a migração celular de células de melanoma metastático.

## 7. CONCLUSÃO

No presente estudo, três de quatro novas chalconas-sulfonamidas sintéticas com estrutura molecular semelhante apresentaram efeito antitumoral *in vitro* contra linhagens tumorais. A partir disso, foi possível identificar o potencial efeito antiproliferativo da chalcona-sulfonamida 185 (CSS185) seletivo para linhagens de câncer colorretal. A molécula induziu efeito citostático e citotóxico frente à linhagem SW-620 de maneira tempo e concentração dependente, interferindo na progressão do ciclo celular com aumento do número de células na fase G2/M, associado com indução de despolarização mitocondrial e dano ao DNA, com consequente morte celular por necroptose. Em adição, a CSS185 apresentou efeito antimigratório em concentrações não citotóxicas, abrindo perspectivas para um estudo mais aprofundado deste efeito (Figura 23).

**Figura 23. Mecanismo de ação proposto para chalcona-sulfonamida sintética 185 (CSS-185)**



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD KHALILI, A.; AHMAD, M.R. A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications. Tseng F-G, ed. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 8, p. 18149-18184, 2015.

AHMED, D.; EIDE, P.W.; EILERTSEN, I.A.; DANIELSEN, S.A.; EKNÆS, M.; HEKTOEN, M.; LIND, G.E.; LOTHE, R.A. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. **Oncogenesis**, v. 16, e71, 2013.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

ALEEM, E.; ARCECI, R.J. Targeting cell cycle regulators in hematologic malignancies. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 3, n. 16, 2015.

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.

AMADO, N.G.; PREDES, D.; MORENO, M.M.; CARVALHO, I.O.; MENDES, F.A.; ABREU, J.G. Flavonoids and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling: potential role in colorectal cancer therapies. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 12094–106, 2014.

AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017. Disponível em: <<https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-sideeffects/treatment-types.html>>. Acesso em: 20/04/2018.

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

ANDRICOPULO, A. D. et al. Structure-based drug design strategies in medicinal chemistry. **Curr. Top. Med. Chem.**, v.9, n.9, p.771-90, 2009.

- ARSLAN, T.; TÜRKOĞLU, E.A.; ŞENTÜRK, M.; SUPURAN, C.T. Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory properties of novel chalcone substituted benzenesulfonamides. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 26, n. 24, p. 5867-5870, 2016.
- BAHEKAR, S.P.; HANDE, S.V.; AGRAWAL, N.R.; CHANDAK, H.S.; BHOJ, P.S.; GOSWAMI, K.; REDDY, M.V.R. Sulfonamide chalcones: Synthesis and in vitro exploration for therapeutic potential against *Brugia malayi*. **Eur J Med Chem**, v. 124, p. 262-269, 2016.
- BAGLA, V.P. et al. Antimicrobial activity, toxicity and selectivity index of two bioflavonoids and a flavone isolated from *Podocarpus henkelii* (Podocarpaceae) leaves. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n 383, p. 1-6, 2014.
- BAUDINO, T.A. Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. **Curr Drug Discov Technol.**, v. 12, n. 1, p. 3-20, 2015.
- BELLANCE, N.; LESTIENNE, P.; ROSSIGNOL, R. Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis. **Front Biosci**, v. 14, p. 4015-4034, 2009.
- BERLINCK, R.G.S., et al. Chemical and pharmacological characterization of halitoxin From *Amphimedon viridis* (PORIFERA) from the southeastern brazilian coast. **Comp. Biochem. Physiol.** 115C, 155 – 163, 1996.
- BOECK, P.; BANDEIRA FALCÃO, C.A., LEAL, P.C., YUNES, R.A., FILHO, V.C., TORRES-SANTOS, E.C., ROSSI-BERGMANN, B. Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. **Bioorg Med Chem.**, v. 14, n. 5, p. 1538-45, 2006.
- BONAKDAR, P.S.A., et al. Synthesis and Anticancer Activity Assay of Novel Chalcone-Sulfonamide Derivatives. **Iran J Pharm Res.**, v. 16, n. 2, p. 565-568, 2017.
- BORTNER, C.D., CIDLOWSKI, J.A. Ion channels and apoptosis in cancer. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.**, v. 369, n. 1638, 2014.
- BOUYSSOU, J.M.C., MANIER, S., HUYNH, D., ISSA, S., ROCCARO, A.M., GHOBRIAL, I.M. Regulation of microRNAs in Cancer Metastasis. **Biochimica et biophysica acta.**, v. 1845, n. 2, p. 255-265, 2014.

BOYD, M.R.; PAULL, K.D. Some practical considerations and applications of the national cancer institute in vitro anticancer drug discovery screen. **Drug Development Research**, v. 34, n. 2, p. 91-109, 1995.

BROWN, M.F., LEIBOWITZ, B.J., CHEN, D., et al. Loss of caspase-3 sensitizes colon cancer cells to genotoxic stress via RIP1-dependent necrosis. **Cell Death Dis.**, v. 6, e1729, 2015.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica**. Editora AMGH. Porto Alegre. 12 ed. 2012.

CELIÀ-TERRASSA, T., KANG, Y. Distinctive properties of metastasis-initiating cells. **Genes & Development.**, v. 30, n. 8, p. 892-908, 2016.

CHEN, D., YU, J., ZHANG, L. Necroptosis: an alternative cell death program defending against cancer. **Biochim Biophys Acta**, v. 1865, p. 228–236. 2016.

CHEN, Y.H., WANG, W.H., WANG, Y.H., LIN, Z.Y., WEN, C.C., CHERN, C.Y. Evaluation of the Anti-Inflammatory Effect of Chalcone and Chalcone Analogues in a Zebrafish Model. **Molecules**, v.18, p. 2052-2060, 2013.

COLE, A.L., HOSSAIN, S., COLE, A.M., PHANSTIEL, O. Synthesis and bioevaluation of substituted chalcones, coumaranones and other flavonoids as anti-HIV agents. **Bioorg Med Chem.**, v. 24, n. 12, p.2768-76, 2016.

CROZIER, A., JAGANATH, I.B., CLIFFORD, M.N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Nat Prod Rep.**, v. 26, p. 1001–1043, 2009.

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.

CUSTODIO, J. M. F., MICHELINI, L.J, DE CASTRO, M.R.C., VAZ, W.F., NEVES, B.J., CRAVO, P.V.L., BARRETO, F.S., MORAES FILHO, M.O., PEREZ, C.N., NAPOLITANO, H.B. Structural insights into a novel anticancer sulfonamide chalcone. **NJC**, v. 5, p. 1-9, 2018.

DARZYNKIEWICZ, Z. et al. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. **Cytometry**, v. 13, n. 8, p. 795-808, 1992.



- DIMMOCK, J.R., ELIAS, D.W., BEAZELY, M.A., KANDEPU, N.M. Bioactivities of chalcones. **Curr Med Chem**, v. 6, p. 1125–1149, 1999.
- DOMÍNGUEZ, J.N., LEÓN, C., RODRIGUES, J., GAMBOA DE DOMÍNGUEZ, N., GUT, J., ROSENTHAL, P.J. Synthesis and antimalarial activity of sulfonamide chalcone derivatives. **Farmacol.**, v. 60, n. 4, p. 307-11. 2005
- DRUTOVIC, D., CHRIPKOVA, M., PILATOVA, M., et al. Benzylidenetetralones, cyclic chalcone analogues, induce cell cycle arrest and apoptosis in HCT116 colorectal cancer cells. **Tumour Biol.**, v. 35, n. 10, p. 9967-75. 2014.
- DUNAI, Z.A., IMRE, G., BARNA, G., et al. Staurosporine induces necroptotic cell death under caspase-compromised conditions in U937 cells. **PLoS One**, v. 7, e41945, 2012.
- EJAZ, S.A., SAEED, A., SIDDIQUE, M.N., NISA, Z.U., KHAN, S., LECKA, J., SÉVIGNY, J., IQBAL, J. Synthesis, characterization and biological evaluation of novel chalcone sulfonamide hybrids as potent intestinal alkaline phosphatase inhibitors. **Bioorg Chem**, v. 70, p. 229-236, 2017.
- FERLINI, C., SCAMBIA, G. Assay for apoptosis using the mitochondrial probes, Rhodamine123 and 10-N-nonyl acridine orange. **Nat Protoc.**, v. 2, n.12, p. 3111-4, 2007.
- FONSECA, B.F., PREDES, D., CERQUEIRA, D.M., et al. Derricin and derricidin inhibit Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and suppress colon cancer cell growth in vitro. **PLoS One**, v. 10, n. 3:e0120919, 2015
- FOSTER, I. Cancer: a cell cycle defect. **Radiography**, v.14, n. 2, p. 144-149, 2008.
- FOUAD, Y.A., AANEI, C. Revisiting the hallmarks of cancer. **Am J Cancer Res.**, v. 7, n. 5, p. 1016-1036. 2017
- FULDA, S. Therapeutic exploitation of necroptosis for cancer therapy. **Semin Cell Dev Biol**; v. 35, p. 51–56, 2014.
- GALLUZZI, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2018. **Cell Death and Differentiation**, v. 25, p. 486-541, 2017.

GANGULY, K.K., PAL, S., MOULIK, S., CHATTERJEE, A. Integrins and metastasis. *Cell Adhesion & Migration*., v. 7, n. 3, p. 251-261, 2013.

GHORAB, M.M., RAGAB, F.A., HEIBA, H.I., EL-GAZZAR, M.G., ZAHRAN, S.S. Synthesis, anticancer and radiosensitizing evaluation of some novel sulfonamide derivatives. *Eur J Med Chem.*, v. 92, n. 682-92, 2015.

GLOBOCAM. **New Global Cancer Data: GLOBOCAN 2018**. Disponível em: < <https://www.uicc.org/new-global-cancer-data-globocan-2018> >. Acesso em 26/12/2018

GREEN, D.R., LLAMBI, F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, v. 7, n. 12, 2015.

GURR, E. Synthetic dyes in biology, medicine and chemistry. **Academic Press. London & New York**, 1971.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, v.144, p. 646-674, 2011.

HE, G.W., GÜNTHER, C., THONN, V., et al. Regression of apoptosis-resistant colorectal tumors by induction of necroptosis in mice. *J Exp Med.*, v. 214, n. 6, p. 1655-1662, 2017.

HERENCIA, F., FERRÁNDIZ, M.L., UBEDA, A., GUILLÉN, I., DOMINGUEZ, J.N., CHARRIS, J.E., LOBO, G.M., ALCARAZ, M.J. Novel anti-inflammatory chalcone derivatives inhibit the induction of nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in mouse peritoneal macrophages. *FEBS Lett.*, v. 453, n.1-2, p.129-34. 1999.

HSIEH, H.K., TSAO, L.T., WANG, J.P., LIN, C.N. Synthesis and anti-inflammatory effect of chalcones. *J Pharm Pharmacol.*, v. 52, n. 2, p. 163-71, 2000.

HURST, D.R., WELCH, D.R. Metastasis Suppressor Genes: At the Interface Between the Environment and Tumor Cell Growth. *International review of cell and molecular biology*, v. 286, p. 107-180, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2018/2019**: Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: < <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/>>. Acesso em: 10/05/2018.

JANG, M.S., LEE, S.J., KANG, N.S., et al. Cooperative phosphorylation of FADD by Aur-A and Plk1 in response to taxol triggers both apoptotic and necrotic cell death. **Cancer Res.**, v. 71, p. 7207–7215, 2011.

JEONG, J. B. et al. Arctigenin induces cell cycle arrest by blocking the phosphorylation of Rb via the modulation of cell cycle regulatory proteins in human gastric cancer cells. **International Immunopharmacology**, v. 11, p. 1573-1577, 2011.

KANG, J.E., CHO, J.K., CURTIS-LONG, M.J., et al. Inhibitory evaluation of sulfonamide chalcones on beta-secretase and acylcholinesterase. **Molecules**, v.18, n. 1, p. 140-53, 2012.

KARTHIKEYAN, C., MOORTHY, N.S., RAMASAMY, S., VANAM, U., MANIVANNAN, E., KARUNAGARAN, D., TRIVEDI, P. Advances in chalcones with anticancer activities. **Recent Pat Anticancer Drug Discov.**, v. 10, n. 1, p. 97-115, 2015.

KASIBHATLA, S., AMARANTE-MENDES, G.P., FINUCANE. D., BRUNNER, T., BOSSY-WETZEL, E., GREEN, D.R. Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB) Staining to Detect Apoptosis. **CSH Protoc.** 2006.

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

KATZUNG, B. G.; TREVOR, A. J. **Farmacologia Básica e Clínica**. 13 ed. Porto Alegre: ABDR, 2017.

KE, N., WANG, X., XU, X., ABASSI, Y.A. The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. **Methods Mol Biol.**, v. 740, p. 33-43, 2011.

KEEPERS, Y.P. et al. Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. **European Journal of Cancer and Clinical Oncology**, v. 27, Issue 7, p. 897-900, 1991.

KELLO, M., DRUTOVIC, D., PILATOVA, M.B., TISCHLEROVA, V., PERJESI, P., MOJZIS, J. Chalcone derivatives cause accumulation of colon cancer cells in the G2/M phase and induce apoptosis. **Life Sci**, v. 150, p. 32-8, 2016.

KEPP, O. et al. Cell death assays for drug discovery. **Nat Rev Drug Discov**, v. 10, n. 3, p. 221-237, 2011.

KIM, Y.J., KANG, K.S., CHOI, K.C., KO, H. Cardamonin induces autophagy and an antiproliferative effect through JNK activation in human colorectal carcinoma HCT116 cells. **Bioorg Med Chem Lett.**, v. 25, n. 12, p. 2559-64, 2015.

KLAASSEN, C. D.; WATKINS III, J. B. **Fundamentos em toxicologia de Casarett e Doull.** 2 ed. Mcgraw-Hill Brasil, 2012.

KREPELA, E. Cysteine proteinases in tumor cell growth and apoptosis. **Neoplasma**, v. 48, p. 332-49, 2001.

KSIĄŻKIEWICZ, M., MARKIEWICZ, A., ZACZEK, A.J. Epithelial-mesenchymal transition: a hallmark in metastasis formation linking circulating tumor cells and cancer stem cells. **Pathobiology**, v. 79, n. 4, p. 195-208, 2012.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins e Contran. Patologia: bases patológicas da doença.** 9 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016

LEE, D., KOOK, S.H., JI, H., LEE, S.A., CHOI, K.C., LEE, K.Y., LEE, J.C. N-acetyl cysteine inhibits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated reduction in the mineralization of MC3T3-E1 cells by down-regulating Nrf2/HO-1 pathway. **BMB Rep.**, v. 48, n. 11, p. 636-41, 2015.

LEE, J.M., LEE, M.S., KOH, D., LEE, Y.H., LIM, Y., SHIN, S.Y. A new synthetic 2'-hydroxy-2,4,6-trimethoxy-5',6'-naphthochalcone induces G<sub>2</sub>/M cell cycle arrest and apoptosis by disrupting the microtubular network of human colon cancer cells. **Cancer Lett.**, v. 354, n. 2, p. 348-54, 2014.

LEE, M., LEE, H.J., SEO, W.D., PARK, K.H., LEE, Y.S. Sialylation of integrin beta1 is involved in radiation-induced adhesion and migration in human colon cancer cells. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.**, v. 76, n. 5, p. 1528-36, 2010.

LEÓN-GONZÁLEZ, A.J., ACERO, N., MUÑOZ-MINGARRO, D., NAVARRO, I., MARTÍN-CORDERO, C. Chalcones as Promising Lead Compounds on Cancer Therapy. **Curr Med Chem.**, v. 22, n. 30, p. 3407-25, 2015.

- LIANG, C.C., PARK, A.Y., GUAN, J.L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nat Protoc.**, v. 2, n. 2, p. 329-33, 2007.
- LOVELL, D. P.; THOMAS, G.; DUBOW, R. Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* comet studies. **Teratog Carcinog Mutagen**, v. 19, n. 2, p. 109-119, 1999.
- MARZBAN, H., et al. Cellular commitment in the developing cerebellum. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, p. 1-26, 2015.
- METZIG, M.O., FUCHS, D., TAGSCHERER, K., GRÖNE, H., SCHIRMACHER, P., ROTH, W. Inhibition of caspases primes colon cancer cells for 5-fluorouracil-induced TNF- $\alpha$ -dependent necroptosis driven by RIP1 kinase and NF- $\kappa$ B. **Oncogene** 2015.
- MIHIGO, S.O., MAMMO, W., BEZABIH, M., ANDRAE-MAROBELA, K., ABEGAZ, B.M. Total synthesis, antiprotozoal and cytotoxicity activities of rhuschalcone VI and analogs. **Bioorg Med Chem.**, v. 18, n. 7, p. 2464-73, 2010.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v.65, n.1-2, p.55-63, 1983.
- NORELJALEEL, A.E.M., et al. Synthesis and Bioactivity of Reduced Chalcones Containing Sulfonamide Side Chains. **J Nat Prod**, v. 81, n. 1, p. 41-48, 2018.
- OBERST, A., DILLON, C.P., WEINLICH, R., et al. Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis. **Nature**, v. 471, p. 363–367, 2011.
- OLIVE, P. L. Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. **Radiation Research**, v. 117, n. 1, p. 79-92, 1989.
- OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 123, n. 1, p. 291-298, 1984.
- OTTO, T.; SICINSKI, P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, p. 93–115, 2017.

OUYANG, L. et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Prolif**, v. 45, n. 6, p. 487-498, 2012.

PAPAZISIS, K.T., GEROMICHALOS, G.D., DIMITRIADIS, K.A., KORTSARIS, A.H. Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. **J Immunol Methods**, v. 208, n. 2, p. 151-8, 1997.

PARRALES, A., IWAKUMA, T. Targeting Oncogenic Mutant p53 for Cancer Therapy. **Front Oncol.**, v. 5, n. 288, 2015.

PASPARAKIS, M., VANDENABEELE, P. Necroptosis and its role in inflammation. **Nature**, v. 517, n. 7534, p. 311-20, 2015.

PASQUIER, E. et al. Antiangiogenic activity of paclitaxel is associated with its cytostatic effect, mediated by the initiation but not completion of a mitochondrial apoptotic signaling pathway. **Mol Cancer Ther**, v. 3, n. 10, p. 1301-1310, 2004.

PEERZADA M.N., et al. Synthesis, characterization and biological evaluation of tertiary sulfonamide derivatives of pyridyl-indole based heteroaryl chalcone as potential carbonic anhydrase IX inhibitors and anticancer agents. **Eur J Med Chem**. v. 155, p. 13-23, 2018.

PERES, C. M.; CURI, R. **Como Cultivar Células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

PERICLEOUS, M., MANDAIR, D., CAPLIN, M.E. Diet and supplements and their impact on colorectal cancer. **J Gastrointest Oncol.**, v. 4, p. 409–423, 2013.

QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nature Medicine**, v. 19, n. 11, p. 1423-1437, 2013.

RIXE, O.; FOJO, T. Is cell death a critical end point for anticancer therapies or is cytostasis sufficient? **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 24, p. 7280-7, 2007.

RODRIGUEZ, L.G., WU, X., GUAN, J.L. Wound-healing assay. **Methods Mol Biol**, v. 294, p. 23-9, 2005.

SAFDAR, M.H., HASAN, H., AFZAL, S., HUSSAIN, Z. Exploring Promising Immunomodulatory Potential of Natural and Synthetic 1,3-Diphenyl-2 propen-1-one Analogs: A Review of Mechanistic Insight. **Mini Rev Med Chem.**, 2017.

SCHMIDT, S.V., SEIBERT, S., WALCH-RUCKHEIM, B., et al. RIPK3 expression in cervical cancer cells is required for PolyIC induced necroptosis, IL-1 $\alpha$  release, and efficient paracrine dendritic cell activation. **Oncotarget**, v. 6, p. 8635–8647, 2015.

SEO, W.D., KIM, J.H., KANG, J.E., RYU, H.W., CURTIS-LONG, M.J., LEE, H.S., YANG, M.S., PARK, K.H. Sulfonamide chalcone as a new class of alpha-glucosidase inhibitors. **Bioorg Med Chem Lett.**, v. 15, n. 24, p. 5514-6, 2005.

SHAPIRO, H. M. **Practical Flow Cytometry**. New York : Ed Wiley-Liss, 1995.

SHERR, C.J.; BARTEK, J. Cell cycle – Targeted Cancer Therapies. **Annual Review of Cancer Biology**, v. 1, p. 41-57, 2017.

SHOEMAKER, R.H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. **Nat Rev Cancer.**, v. 6, n. 10, p. 813-23, 2006.

SILVA, C.R., BORGES, F.F., BERNARDES, A., PEREZ, C.N., SILVA, D.D.E.M., CHEN-CHEN, L. Genotoxic, Cytotoxic, Antigenotoxic, and Anticytotoxic Effects of Sulfonamide Chalcone Using the Ames Test and the Mouse Bone Marrow Micronucleus Test. **PLoS One**, v.10, n. 9, e0137063, 2015.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res**, v. 175, n. 1, p. 184-91, 1988.

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

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B.; **Química Orgânica**; 9. ed. Rio de Janeiro: LTC, v. 2, 2009.

SU, Z., YANG, Z., XIE, L., DEWITT, J. P., CHEN, Y. Cancer therapy in the necroptosis era. **Cell Death and Differentiation**, 23(5), 748–756, 2016.

SUN, S.Y. N-acetylcysteine, reactive oxygen species and beyond. **Cancer Biol Ther.**, v. 9, n. 2, p. 109-10, 2010.

TARIQ, K.; GHAS, K. Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. **Cancer Biol Med**, v. 13, n. 1, p. 120-135, 2016.

TENEV, T., BIANCHI, K., DARDING, M., et al. The ripoptosome, a signaling platform that assembles in response to genotoxic stress and loss of IAPs. *Mol Cell*, v. 43, p. 432–448, 2011.

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.

VAN TONDER, A., JOUBERT, A.M., CROMARTY, A.D. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res Notes.*, v. 8, n. 47, 2015.

VASCONCELOS, A., CAMPOS, V.F., NEDEL, F., et al. Cytotoxic and apoptotic effects of chalcone derivatives of 2-acetyl thiophene on human colon adenocarcinoma cells. *Cell Biochem Funct.*, v. 31, n. 4, p. 289-97, 2013.

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

VIJAYAKUMARAN, R., TAN, K.H., MIRANDA, P.J., HAUPT, S., HAUPT, Y. Regulation of Mutant p53 Protein Expression. *Front Oncol.*, v. 5, p. 284, 2015.

VOGEL, A. I.; **Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry**; New York: John Wiley & Sons, 5 ed, p.1017, 1989.

WANG, T., JIN, Y., YANG, W., et al. Necroptosis in cancer: An angel or a demon? *Tumour Biol*, v. 39, n. 6, 2017.

WEINBERG, R.A. **The Biology of Cancer**. 2<sup>nd</sup> Edition. Garland Science, 2013.

WEISSENSTEIN, U. et al. Interaction of standardized mistletoe (*Viscum album*) extracts with chemotherapeutic drugs regarding cytostatic and cytotoxic effects *in vitro*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 14, n. 6, 2014.

WHO. World Health Organization, 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>> Acesso em: 15/04/2018.



WON, S.J., LIU, C.T., TSAO, L.T., WENG, J.R., KO, H.H., WANG, J.P., LIN, C.N. Synthetic chalcones as potential anti-inflammatory and cancer chemopreventive agents. **Eur J Med Chem.**, v. 40, n. 1, p. 103-12, 2005.

WU, J., HUANG, Z., REN, J., et al. MLKL knockout mice demonstrate the indispensable role of MLKL in necroptosis. **Cell Res.**, v. 23, p. 994–1006, 2013.

YANG, C., LI, J., YU, L., ZHANG, Z., XU, F., JIANG, L., ZHOU, X., HE, S. Regulation of RIP3 by the transcription factor Sp1 and the epigenetic regulator UHRF1 modulates cancer cell necroptosis. **Cell Death Dis.**, v. 8, n. 10 :e3084, 2017.

YUE, P.Y., LEUNG, E.P., MAK, N.K., WONG, R.N. A simplified method for quantifying cell migration/wound healing in 96-well plates. **J Biomol Screen.**, v.15, n.4, p. 427-33, 2010.

ZUCO, V. et al. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. **Cancer Lett**, v. 175, p. 17-25, 2002.

## ANEXO A – EQUIPAMENTOS

- ✓ Agitador de placa, MLW Modelo Thys 2®
- ✓ Agitador de placa shaker PSU□ - 2T plus
- ✓ Agitador de tubo, Donner AD 8850□.
- ✓ Banho-maria, DELLTA Modelo 105Di®
- ✓ Bomba à vácuo, EXIMPUMP®
- ✓ Citoentrífuga, CT-2000 CIENTEC®
- ✓ Centrífuga refrigerada, SORVALL® Biofuge fresco
- ✓ Centrífuga de placas, Eppendorf Modelo Centrifuge 5810R
- ✓ Citômetro de fluxo, Guava EasyCyte®
- ✓ Contador automático de células sanguíneas, Coulter Counter T-530®
- ✓ Deonizador de água Milli-Q, Milipore®
- ✓ Espectrofotômetro de placa DTX-880, Beckman Coulter®
- ✓ Fluxo laminar, VECO®
- ✓ Incubadora de células, (CO2 Water-Jacket Incubator) NUAIRE TS Autoflow®
- ✓ High Throughput Screening (HTS)/Laboratory Automation Workstation, Biomek 3000, Beckman Coulter®
- ✓ Microondas, Panasonic®
- ✓ Microscópio óptico, Metrimpex Hungary/PZO-Labimex Modelo Studar lab®
- ✓ Microscópio óptico de inversão, ZEISS, AXIOVERT 40C
- ✓ Mini Protean® tetra cell, Biorad
- ✓ Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell, Biorad
- ✓ pHmetro, Micronal® B474
- ✓ Pipetas automáticas, Gilson®
- ✓ PowerPac™ HC High-Current Power Supply, Biorad®
- ✓ Shaker, BIOMIXER – TS 2000A
- ✓ Sistema de Fotodocumentação, ImageQuant 300 Imager GE Healthcare®
- ✓ Sonicador, unique – ultra cleaner 1600A

## ANEXO B – SOLUÇÕES PREPARADAS E REAGENTES

### Cultura de células

- ✓ PBS (Phosphate Buffer Solution; pH 7,2):

NaCl.....0,15M

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....10 mM

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>..... 2 mM

- ✓ Azul de tripan 10%:

Azul de tripan (Vetec®)..... 10 mg

PBS (q.s.p.).....100 mL

- ✓ Solução de MTT:

MTT (Sigma®):.....20 mg

PBS (q.s.p.)..... 100 mL

- ✓ Solução salina para hemólise:

Cloreto de sódio 0,85% (Labsynth®).....8,5 g

Cloreto de Cálcio- 10 mM (Reagen®).....1,11g

Água destilada (q.s.p)..... 1 L

- ✓ SRB 0,4%

- ✓ Meio de cultura RPMI 1640 (Gibco®)

- ✓ Meio de cultura DMEM (Gibco®)

- ✓ Soro Fetal Bovino (SFB) (GIBCO®)

- ✓ Tripsina-EDTA 0,5% (Cultilab®)

- ✓ Dimetilsulfóxido (Dinâmica®)

- ✓ Fitohemaglutinina

- ✓ Histopaque

## Estudos de Citometria de Fluxo

### ✓ Solução de PI-Ciclo:

Iodeto de propídeo (Sigma®).....50 mg/mL em PBS

Citrato de sódio.....0,2%

Triton X-100.....0,1%

### ✓ Solução de Rodamina 123:

#### *Solução estoque*

Rodamina 123 (Sigma®)..... 1 mg/mL em EtOH

#### *Solução de uso*

“Solução estoque”.....1:1000 em PBS

## Ensaio do Cometa

### ✓ Preparo da Agarose Normal (NMP)

Agarose ..... 1.5 g

PBS (q.s.p.) ..... 100mL

### ✓ Preparo da agarose de baixo ponto de fusão

Agarose LMP ..... 0,75 g

PBS ..... 100mL

### ✓ Tampão de lise (pH 10,0):

#### *Solução de estoque*

NaCl 2,5 M ..... 146,1 g

TRIS 10mM ..... 1,2 g

EDTA 100 mM ..... 37,2 g

NaOH ..... Ajustar o pH

#### *Solução de uso*

Triton X-100 ..... 1 mL

DMSO ..... 10 mL

Completar com a solução de lise (estoque) para 100mL (cobrir o berço na cuba forrada de alumínio)

✓ Solução de eletroforese (pH 13,0)

Obs.: Deve ser feita no dia do uso

Solução de NaOH 10M ..... 30mL

Solução de EDTA ..... 5 mL Ajustar o pH

Água destilada gelada (q.s.p.).....1 L

✓ Solução de EDTA

EDTA ..... 14,89 g

H<sub>2</sub>O destilada ..... 200 mL Ajustar o pH para 10

Manter a temperatura ambiente

✓ Solução de NaOH

NaOH ..... 200 g

H<sub>2</sub>O ..... 500 mL

✓ Solução Tampão de Neutralização

TRIS 0,4 M ..... 48,5 g

Ajustar o pH para 7,5 (c/ HCl concentrado)

Completar para 1000 mL de água destilada

✓ Solução de coloração (ESTOQUE)

Brometo de Etídio ..... 10 mg

H<sub>2</sub>O destilada ..... 50 mL

## Western blot

- ✓ Tampão de corrida- TGS 10X (pH 8,3), BioRad:
  - Tris.....25 mM
  - Glicina .....192 mM
  - SDS.....0,1%
  
- ✓ Tampão de transferência- TG 10X (pH 8,3), BioRad:
  - Tris.....25 mM
  - Glicina .....192 mM
  - MeOH.....20%
  
- ✓ Tampão de Amostra 5X:
  - Tris-HCl (Tris plus One, pH 6,8).....0,5 M
  - Glicerol.....50%
  - $\beta$ -mercaptoetanol.....1%
  - Azul de bromofenol.....0,5%
  - SDS.....10%
  
- ✓ Componentes do kit para dosagem de proteínas DC *Protein Assay (Bio-Rad Laboratories)*
  - *Reagent A* .....Solução alcalina de tartarato de cobre
  - *Reagent B*.....Reagente de Folin
  - *Reagent S*.....Solução surfactante