



FACULDADE DE ENFERMAGEM NOVA ESPERANÇA  
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA

AMANDA EWENLLY ALBUQUERQUE NUNES

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO DERIVADO ACRIDÍNICO(E)-1'-  
{(4-FLÚORBENZILIDENO)-AMINO}-5'OXO-1,5'DIIDRO-10H-  
ESPIRO[ACRIDINA-9,2'-PIRROL]-4'CARBONITRILA (AMTAC-07)  
EM CÉLULAS NÃO TUMORAIS**

JOÃO PESSOA  
2022

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO  
DERIVADO ACRIDÍNICO(E)-1'-{(4-FLÚORBENZILIDENO)-AMINO}-  
5'OXO-1,5'DIIDRO-10H- ESPIRO[ACRIDINA-9,2'-PIRROL]-  
4'CARBONITRILA (AMTAC-07) EM CÉLULAS NÃO TUMORAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
(TCC) apresentado à Faculdade de  
Enfermagem Nova Esperança – FACENE –  
como exigência total para obtenção do  
título de Bacharel em Farmácia.

ORIENTADORA: Profa. Ana Paula Gomes  
Moura Farias

N923a

Nunes, Amanda Ewenlly Albuquerque

Avaliação da Citotoxicidade do derivado Acridínico (E)-1'-{(4-Flúorbenzilideno)-Amino}-5'oxo-1,5'diidro-10h- Espiro[Acridina-9,2'-Pirrol]-4'carbonitrila (Amtac-07) em células não tumorais / Amanda Ewenlly Albuquerque Nunes. – João Pessoa, 2022.  
38f.; il.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Gomes Moura Farias.  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) –  
Faculdade Nova Esperança - FACENE

1. Derivados Acridínicos. 2. Citotoxicidade. 3. Células Sadias. 4. Seletividade. I. Título

CDU: 615.1

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO  
DERIVADO ACRIDÍNICO(E)-1'-{(4-FLÚORBENZILIDENO)-AMINO}-  
5'OXO-1,5'DIIDRO-10H- ESPIRO[ACRIDINA-9,2'-PIRROL]-  
4'CARBONITRILA (AMTAC-07) EM CÉLULAS NÃO TUMORAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado pela aluna Amanda Ewenly Albuquerque Nunes, do Curso de Bacharelado em Farmácia, tendo obtido o conceito de \_\_\_\_\_, conforme a apreciação da Banca Examinadora.

Aprovado em: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2022.

**BANCA EXAMINADORA**

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Orientadora: Ana Paula Gomes Moura Farias

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Examinadora: Daiene Martins Beltrão

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Examinadora: Carolina Uchôa Guerra Barbosa de Lima

Aos meus avós, **Maria Salete** e **Vamberto**,  
por acreditarem que o estudo é um dos bens  
mais valiosos que podem  
deixar para seus netos. A minha mãe,  
**Valdineide**, por apoiar meus sonhos e a meu  
namorado, **Cayo César**, que me impulsionou  
a nunca desistir.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por todo discernimento derramado sobre minha cabeça durante esta caminhada, por todos os livramentos e milagres operados e, principalmente, por nunca desistir de mim.

Aos meus avós maternos **Maria Salete de Araújo** e **Vamberto Vidal Albuquerque**, por serem meus exemplos de dedicação e esforço máximo, empenhando-se na educação e criação dos filhos e netos. Por me ajudarem a ultrapassar todas as barreiras, com dignidade e força, para que eu alcançasse a cada dia meus objetivos mesmo diante às dificuldades.

À minha mãe **Valdineide de Araújo Albuquerque**, por nunca duvidar da minha capacidade até mesmo quando eu a questionava, por apoiar meus passos, por incentivar meus estudos e por me direcionar todas as suas orações perseverantes. Eu consegui, mãe!

Aos meus irmãos **Arthur Ewerton Albuquerque** e **Álvaro Juanes**, por me fazerem sorrir todas as vezes em que eu voltava para casa, isso me fazia sentir que sempre estive presente mesmo com a distância física.

Ao meu namorado **Cayo César**, por compreender a distância, por mostrar-se meu maior ombro amigo, por ouvir minhas lamúrias e segurar minhas lágrimas. Por dedicar-se a me impulsionar nos estudos quando eu desanimei, por me fazer relembrar o quanto era amada por ele e por minha família, por permanecer ao meu lado nos melhores e piores momentos desde que nos conhecemos e por me fazer perceber que a vida, mesmo que tenha um fim, pode ser vivida “para sempre” todos os dias.

Aos meus tios **Maria Verônica Albuquerque**, **Humberto Albuquerque** e **Marília dos Reis**, que foram cruciais no meu desenvolvimento acadêmico, compartilhando suas histórias e vivências, dando-me suporte de todas as formas para mostrar que eu conseguiria e por me fazerem feliz sempre que o desânimo batia e o desespero tomava conta. As minhas cobaias fiéis que nunca fugiram da raia, sou grata por tudo.

À minha sobrinha **Lorena** que trouxe tanta alegria para a minha vida que nem sei expressar em palavras. Você me traz paz. Obrigada por ser do jeitinho que você é. Titi ama você.

Ao meu primo **Lucas Pessoa** e sua esposa **Kaliane**, pelo apoio, torcida e pela ajuda psicológica durante os quatro anos de graduação, onde me proporcionaram gargalhadas deliciosas e até mesmo carregaram comigo o peso das minhas inúmeras mudanças.

Às minhas estimadas primas **Rafaella**, **Nicolle** e **Maria Clara**, que sempre foram mais do que isso e tornaram-se ainda mais do que irmãs inseparáveis. Sou grata por ter vocês em minha vida e por acompanhar seus desenvolvimentos pessoais. Sou feliz por me

reconhecerem como um espelho e espero poder incentivá-las, a cada dia mais, a alcançarem seus próprios objetivos e futuros brilhantes.

À minha amiga e fiel escuteira, **Gabriela Araújo**, por ter dividido comigo todos os momentos de alegria e tristeza, durante o dia, a tarde e na madrugada, para que chegássemos até aqui com êxito e juntas. Obrigada pelos conhecimentos compartilhados, por se fazer presente quando mais precisei. Obrigada pelos nossos cafés da tarde, pelos surtos diários e pelos dias e anos compartilhados juntos na FACENE e em nosso apartamento. Obrigada pelos conselhos, por me ouvir e por me acalmar. Você é especial! Obrigada pelo amor, pela lealdade e continuaremos assim, uma ajuda à outra e vamos vencendo.

À minha amiga de infância **Marta Elvira**, pelo constante incentivo, pelas risadas, pela amizade, pela paciência e por todo amor. Obrigada, por permanecer mesmo em meio a distância e a falta de tempo. Sou grata a Deus por sua vida e por me acompanhar durante todos esses anos. Cada vitória minha é uma vitória nossa.

À minha amiga **Andressa**, que me acompanhou durante toda graduação, me ouvindo, me ensinando, compartilhando momentos de alegria, de tristeza, de desespero, de vitórias e de superação me incentivando a sonhar cada vez mais e acreditando em cada um dos meus passos, ainda mais do que qualquer um já citado aqui. Devo a você muito mais do que companheirismo e carinho, você foi imprescindível desde o primeiro segundo em que chegou em minha vida.

Aos professores **Diego Igor, Denise Leite e Yargo** pela descontração nas aulas, pelas ajudas constantes, pelos conselhos, pela paciência, por serem seres iluminados e de grande admiração, pelas risadas e compartilhamentos diários de nossas lutas e memes.

À minha orientadora **Ana Paula Gomes Moura Farias**, pela paciência, por ser uma orientadora perseverante, agradeço pelos desafios desta fase, por nos ensinar a olhar com outros olhos tudo o que fazemos e por não desistir de cada um de nós, mesmo quando estamos desesperados e somos teimosos.

Aos membros da Banca Examinadora, **Daiene Martins Beltrão e Carolina Uchôa Guerra Barbosa de Lima** por aceitarem avaliar e contribuir com este trabalho. Tenho certeza de que as sugestões aqui inseridas serão muito valiosas.

Aos funcionários da Instituição pela alegria contagiante de todas as manhãs, tardes de noites pelos serviços prestados.

À Faculdade Nova Esperança, instituição maior, pelo desenvolvimento na minha carreira profissional.

À Universidade Federal da Paraíba em especial a equipe do Laboratório de Oncofarmacologia e na reta final o valioso apoio da pós doutoranda Sâmia Duarte.

E a todo que contribuíram para a realização desse sonho, de maneira direta ou indireta. A gratidão de meu coração sempre será explanada a vocês.

*“O importante não é o quão rápido eu vou chegar lá ou o que está me esperando do outro lado, mas sim a escalada”*

*Miley Ray Cyrus*

## RESUMO

Câncer refere-se ao crescimento desordenado de células, que são potencialmente invasoras de tecidos, estejam eles adjacentes ou distantes. A divisão celular é veloz, tende à agressividade e descontrole e determina o surgimento de tumores, que podem espalhar-se por diversas regiões do corpo e trazer sérios danos ao funcionamento de órgãos e sistemas. Estima-se que o Brasil terá 625 mil novos casos de câncer a cada ano do triênio 2020-2022, sendo a obesidade um dos principais fatores de risco para o surgimento de 11 dos 19 tipos mais frequentemente encontrados na população. Atualmente, os tratamentos disponíveis incluem procedimentos cirúrgicos, quimioterapia, radioterapia ou transplante de medula óssea, e, em muitos casos, indica-se a combinação de modalidades de tratamento. Diversos efeitos colaterais podem surgir decorrentes do tratamento que vão desde eventos agudos até os mais graves. A alta incidência de câncer em seres humanos, os efeitos deletérios da doença, a taxa de mortalidade elevada e a agressividade dos tratamentos existentes justificam a realização de estudos que busquem testar substâncias seletivas para células tumorais. A família das acridínicas apresenta propriedades farmacológicas que possuem atividade antitumoral, antiviral, antiparasitária, antimicrobiana, fungicida e anti-inflamatória. Neste estudo, buscou-se verificar se a atividade antitumoral dos compostos espiroacridínicos, especificamente o AMTAC-7, ocorre de forma seletiva para células tumorais. Tratou-se de uma pesquisa experimental, realizada no Laboratório de Oncofarmacologia (OncoFar/UFPB), com observação a partir de experimentos controlados, com alterações de variáveis e instrumentos de coleta de dados submetidos a testes *in vitro* que asseguraram a sua eficácia, além de análise estatística de modelagem dos resultados. A viabilidade das células não tumorais (PBMCs) - mononucleares do sangue periférico- foi reduzida após o tratamento com o composto acridínico AMTAC-07 ( $CI_{50}$ :  $7,05 \pm 1,09 \mu M$ ) em relação ao grupo controle (100% de viabilidade) e o índice de seletividade (IS) foi determinado a partir dos valores de  $CI_{50}$  da célula não tumoral (PBMC) e das linhagens tumorais (HL-60, MOLT-4 e HCT-116). Considerando os valores dos índices calculados para o AMTAC-07, não houve seletividade ( $IS < 2$ ) para a célula tumoral HL-60 ( $IS$ : 1,42), MOLT-4 ( $IS$ : 0,75) e HCT-116 ( $IS$ : 0,80). Todavia, a droga padrão doxorrubicina apresentou alta citotoxicidade em células não tumorais, conforme observado pelo baixo valor de  $CI_{50}$  em PBMC ( $0,05 \pm 0,002 \mu M$ ). Além disso, o índice de seletividade para linhagem tumoral HCT-116 foi consideravelmente mais baixo ( $IS$ : 0,01) que da AMATAC-07 ( $IS$ : 0,80). A citotoxicidade foi demonstrada em células não tumorais, *in vitro*. Porém, possuiu seletividade para células tumorais de HCT-116, maior do que a droga padrão doxorrubicina, já utilizada em tratamentos clínicos.

**Palavras-chave:** Derivados Acridínicos; Citotoxicidade; Células Sadias; Seletividade.

## ABSTRACT

Cancer refers to the disordered growth of cells, which are potentially invasive of tissue, whether adjacent or distant. Cell division is fast, tends to aggressiveness and uncontrolled, and determines the appearance of tumors, which can spread to different regions of the body and cause serious damage to the functioning of organs and systems. It is estimated that Brazil will have 625,000 new cases of cancer each year from 2020 to 2020, with obesity being one of the main risk factors for the emergence of 11 of the 19 types most frequently found in the population. Currently, available treatments include surgical procedures, chemotherapy, radiation therapy or bone marrow transplantation, and in many cases, a combination of treatment modalities is indicated. Several side effects can arise from the treatment, ranging from acute events to the most serious. The high incidence of cancer in human beings, the harmful effects of the disease, the high mortality rate and the aggressiveness of existing treatments justify the performance of studies that seek to test selective substances for tumor cells. The acridine family has pharmacological properties that have antitumor, antiviral, antiparasitic, antimicrobial, fungicidal and anti-inflammatory activity. In this study, we seek to verify whether the antitumor activity of spiroacridinic compounds, specifically AMTAC-7, occurs selectively for tumor cells. This is experimental research, carried out at the Laboratório de Oncofarmacologia (OncoFar/UFPB), with observation from controlled experiments, with changes in variables and data collection instruments submitted to in vitro tests that ensured its effectiveness, in addition to statistical analysis of modeling the results. The viability of non-tumor cells (PBMCs) - peripheral blood mononuclear - was reduced after treatment with the acrydinic compound AMTAC-07 (CI<sub>50</sub>:  $7.05 \pm 1.09 \mu\text{M}$ ) in relation to the control group (100% viability) and the selectivity index (SI) was determined from the values of non-tumor cell CI<sub>50</sub> (PBMC) and tumor strains (HL-60, MOLT-4 and HCT-116). Considering the values of the indices calculated for AMTAC-07, there was no selectivity (IS < 2) for tumor cell HL-60 (IS: 1.42), MOLT-4 (IS: 0.75) and HCT-116 (IS: 0.80). However, the standard drug doxorubicin showed high cytotoxicity in non-tumor cells, as observed by the low CI<sub>50</sub> value in PBMC ( $0.05 \pm 0.002 \mu\text{M}$ ). In addition, the selectivity index for tumor lineage HCT-116 was considerably lower (IS: 0.01) than aMATAC-07 (IS: 0.80). Cytotoxicity has been demonstrated in non-tumor cells in vitro. However, it had selectivity for HCT-16 tumor cells, greater than the standard drug doxorubicin, already used in clinical treatments.

**Keywords:** Acridine Derivatives; Cytotoxicity; Healthy Cells; Selectivity.

## **LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1</b> – Reação de redução do MTT .....	11
<b>Figura 2</b> – Estrutura química do derivado acridínico AMTAC-07 .....	13
<b>Figura 3</b> – Efeito do tratamento com AMTAC-07.....	1

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ACS-AZ10** – N'-(2-chloro-6-methoxy-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimethylaminophenyl)-acrilohidrazida

**AMTAC-2** – 3-(acridin-9-yl)-2-ciano-N-(4-metoxi-benzilideno)-acrilohidrazida

**AMTAC-07** – (E)-1'-{(4-flúorbenzilideno)-amino}-5'-oxo-1,5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

**AMTAC-19** – (E)-1'-((4-bromo-benzilideno)amino)5'-oxo-1,5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila

**AMTAC-23** – 5'-oxo-1'-((4-(piperidina-1-il) benzilideno)amino)-1,5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-p

**SDS** – Dodecil Sulfato de Sódio

**DMEM** – Dulbecco's Modified Eagle's Medium

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**DNA** – Ácido desoxirribonucléico

**EUA** – Estados Unidos da América

**HCT-116** – Carcinoma de Cólon Humano

**HL-60** – Leucemia Promioclótica Humana

**INCA** – Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva

**IPeFarM** – Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos

**IS** – Índice de Seletividade

**LSVM** – Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas

**mAMSA** – Amsacrina

**MOLT-4** – Células T de leucemia

**MTT** – (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**OncoFar** – Laboratório de Oncofarmacologia

**PBS** – Solução Fosfato Tamponada

**PPgPNSB** – Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos

**SBC** – Sociedade Brasileira de Cancerologia

**SBF** – Soro Bovino Fetal

**UEPB** – Universidade Estadual da Paraíba

**UFAC** – Universidade Federal do Acre

**UFPB** – Universidade Federal da Paraíba

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2 FARMACOTERAPIA/ TOXICOLOGIA DO TRATAMENTO DO CÂNCER.....</b>	<b>18</b>
<b>2.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....</b>	<b>19</b>
<b>2.4 DERIVADOS ACRIDÍNICOS .....</b>	<b>21</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>24</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODO .....</b>	<b>25</b>
<b>4.1 MATERIAIS .....</b>	<b>25</b>
<b>4.1.1 Substância.....</b>	<b>25</b>
<b>4.1.2 Equipamentos.....</b>	<b>25</b>
<b>4.1.3 Substância Teste.....</b>	<b>25</b>
<b>4.1.4 Obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).....</b>	<b>25</b>
<b>4.2 MÉTODO .....</b>	<b>26</b>
<b>4.2.1 Tipo de Pesquisa.....</b>	<b>26</b>
<b>4.2.2 Local da Pesquisa .....</b>	<b>26</b>
<b>4.2.3 Avaliação da citotoxicidade em células não tumorais.....</b>	<b>26</b>
<b>4.2.4 Cálculo do Índice de seletividade.....</b>	<b>27</b>
<b>4.2.5 Análise de Dados .....</b>	<b>27</b>
<b>4.2.6 Aspectos Éticos.....</b>	<b>27</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>29</b>
<b>5.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS NÃO TUMORAIS .....</b>	<b>29</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>32</b>

**REFERÊNCIAS..... 33**

**ANEXOS..... 37**

## 1 INTRODUÇÃO

Câncer é um termo que abrange mais de 100 doenças malignas que são unificadas pelo princípio comum do crescimento desordenado de células, que são potencialmente invasoras de tecidos, estejam eles adjacentes ou distantes. A divisão celular é veloz, tende à agressividade e descontrole, e determina o surgimento de tumores, que podem espalhar-se por diversas regiões do corpo e trazer sérios danos ao funcionamento de órgãos e sistemas. Tumores malignos adquirem múltiplas características, que abrangem alterações morfológicas e fisiológicas das células (BATISTA, 2019; SBC, 2016).

Trata-se de um importante problema de saúde pública mundial e a segunda principal causa de morte nos Estados Unidos da América (EUA). Durante a pandemia da doença COVID-19, o diagnóstico e tratamento para o câncer foram dificultados, o acesso reduzido aos cuidados que resultou em atrasos no diagnóstico e tratamento, que desencadeou atrasos nos diagnósticos, aumento na detecção em estágios avançados e, conseqüentemente, aumento da mortalidade. No Brasil estima-se que cerca de 15 mil casos de câncer deixaram de ser diagnosticados por mês, desde o início da pandemia, em fevereiro de 2020. No entanto, levará vários anos até que se quantifiquem as conseqüências secundárias da pandemia (SIEGEL *et al.*, 2021; MARQUES *et al.*, 2021).

Culpar o acaso ou má sorte para o desenvolvimento da doença faz com que o indivíduo conclua que nada pode ser feito a respeito, porém hoje sabemos que os fatores de riscos para o desenvolvimento do câncer estão relacionados com desordens endócrinas e genéticas, história familiar e pessoal, hábitos de vida e influencia ambiental. A rápida e progressiva incidência do câncer alerta para o agravamento do problema, aumentando a necessidade de desenvolvimento de estudos e pesquisas, bem como de políticas públicas efetivas (COSTA *et al.*, 2021).

O câncer é um problema crescente, principalmente nos países em desenvolvimento. Compreender a etiologia do câncer contribui para que sejam traçadas estratégias de prevenção, detecção precoce e tratamento, uma vez a quantidade de pessoas doentes e os custos de tratamento são exacerbados até para os países mais ricos. Diversos tipos de câncer são associados ao tabagismo; cerca de 3,5% das mortes por câncer nos EUA são atribuídas ao alcoolismo; e aproximadamente 30% dos casos de câncer na América do Norte e Europa Ocidental são atribuídos à dieta, sobrepeso, obesidade e/ou sedentarismo. Enquanto na África Subsaariana, um terço dos casos de câncer

são atribuídos a agentes infecciosos (STEWART *et al.*, 2016).

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA, 2020), o Brasil terá 625 mil novos casos de câncer a cada ano do triênio 2020-2022, sendo a obesidade um dos principais fatores de risco para o surgimento de 11 dos 19 tipos mais frequentemente encontrados na população brasileira. Depois do câncer de pele não melanoma, os mais incidentes serão os de mama e próstata, seguidos por cólon e reto, pulmão e estômago. Quando estimados de acordo com o sexo, em homens, os tipos mais frequentes serão próstata (29,2%), cólon e reto (9,1%), pulmão (7,9%), estômago (5,9%) e cavidade oral (5%). Em mulheres, os mais incidentes serão os de mama (29,7%), cólon e reto (9,2%), colo do útero (7,4%), pulmão (5,6%) e tireoide (5,4%).

As pesquisas permitem avanços no tratamento contra o câncer, sendo responsáveis pela redução na mortalidade por doenças malignas hematopoiéticas e linfoides em crianças e adultos, e, mais recentemente, certos tipos de câncer de difícil tratamento, como é o caso do melanoma metastático. Esse investimento em pesquisas permite aprofundar o conhecimento e avançar nas opções de tratamento, favorecendo a aplicação justa e ampla das intervenções e acelerando o progresso contra o câncer (SIEGEL *et al.*, 2021).

Levando em consideração a complexidade da doença, os graves danos provocados ao organismo, o elevado custo dos tratamentos e a necessidade da existência de terapias cada vez mais precisas, é de notória relevância a realização de pesquisas científicas com a finalidade de desenvolver substâncias e compostos de maior eficácia terapêutica e menor toxicidade.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER

O termo tumor refere-se ao aumento de volume observado em uma parte qualquer do corpo. Quando o tumor surge devido ao aumento do número de células, está instalado um quadro de neoplasia, que pode ser benigno ou maligno. Neoplasias benignas se dão através de crescimento celular lento e organizado, apresentam limites bem definidos, não invadem tecidos vizinhos e não desenvolvem metástase. Ao contrário disto, nas neoplasias malignas há aumento celular em tamanho e quantidade, de forma rápida e desordenada, que formam tumores sem limites bem definidos, com potencial invasor de tecidos adjacentes e risco de desenvolver metástase (INCA, 2020).

O câncer é, portanto, uma neoplasia maligna, que resulta da exposição das células a quantidades suficientes de agentes carcinogênicos, isto é, agentes químicos, radioativos ou microbianos, que, quando associados a outros fatores, promovem mutações permanentes no DNA celular. O diagnóstico é dado através de métodos de pesquisa histológico/citológico, imuno-histoquímicas, molecular, citometria de fluxo, marcadores tumorais e por meio de exames imagiológicos (UFAC, 2018).

Quando a gênese do câncer ocorre em células epiteliais, os tumores são denominados ‘carcinomas’; os originários em epitélio glandular são os ‘adenocarcinomas’. Aqueles originários em ossos, cartilagens, músculos, gorduras, vasos sanguíneos e nervos são denominados ‘sarcomas’; os que atingem o sistema linfático, formando agregados sólidos nos gânglios são chamados de ‘linfomas’; e as ‘leucemias’ trata-se de tumores que surgem nos diversos tecidos que constituem o sangue (GAJULAPALLI *et al.*, 2016; BAROSA *et al.*, 2014; ONO *et al.*, 2009 apud BATISTA, 2019).

A incidência de câncer tem aumentado em todo o mundo, assim como a mortalidade relacionada à doença. De acordo com Hyndman (2016), isto provavelmente está relacionado com as mudanças no estilo de vida e do mundo em desenvolvimento. Pesquisas demonstram que a doença surge devido alterações genéticas, que fornecem à célula características divergentes dos mecanismos reguladores normais, que controlam crescimento e proliferação. Assim, as células afetadas possuem fatores que favorecem proliferação incessante, imortalidade, evasão do apoptose, supressão do crescimento, instabilidade do genoma, indução de angiogênese, inflamação, invasão e

metástase.

A vasta extensão territorial do Brasil abriga uma população bastante diversificada, com comportamentos, crenças e atitudes típicas de cada região. Este cenário cria um grande desafio para os gestores da saúde pública, aos quais cabe desenvolver estratégias para que se estabeleçam diretrizes em políticas públicas e planejamento de ações de prevenção e controle do câncer (INCA, 2018).

A elevada perspectiva de vida humana é acompanhada por um histórico de problemas com relação à saúde. A saúde global é assimétrica e mal ordenada entre as massas populacionais. Os informativos indicam que as mortalidades com relação as neoplasias, patologias cardiovasculares e transtornos por uso de substâncias são os maiores entraves à vitalidade humana. Dentre eles, estima-se que o câncer é o maior agente causador dos índices de mortalidade durante o século atual em todo o planeta, sendo assim, um entrave para o envelhecimento saudável (SEEHAWER *et al.*, 2018; BRAY *et al.*, 2018).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) relata números crescentes de casos de câncer. Estima-se ainda que ano de 2040, o câncer afetará a vida de 29,4 milhões de novos indivíduos (INCA, 2020). Almeja-se que as estimativas para o período 2020-2022 estimulem gestores, profissionais de saúde, pesquisadores, comunicadores e sociedade em geral a refletirem sobre a questão do câncer, para que sejam traçadas e estimuladas estratégias preventivas e os sistemas de saúde estejam cada vez mais bem equipados para enfrentar os desafios futuros.

## 2.2 FARMACOTERAPIA/ TOXICOLOGIA DO TRATAMENTO DO CÂNCER

Para o tratamento das neoplasias malignas diversas terapias podem ser prescritas. Dentre estes tratamentos, os mais conhecidos são os procedimentos cirúrgicos, terapia alvo, quimioterapia, imunoterapia e radioterapia, sendo a quimioterapia o método mais utilizado. Porém, muitas vezes essas terapias demonstram-se ineficazes para curar a doença, devido a incontáveis fatores que limitam a utilização, pois além dos graves efeitos colaterais, também há a possibilidade de as células desenvolverem resistência à terapia medicamentosa (PAJUELO-LOZANO *et al.*, 2018; WAKIUCHI *et al.*, 2019).

Os fármacos quimioterápicos convencionais são classificados de acordo com os seus mecanismos de ação. Os quimioterápicos citotóxicos podem ser divididos em classes: os agentes alquilantes, que provocam danos ao DNA (mostardas nitrogenadas, ciclofosfamida e cisplatina); os produtos naturais (alcaloides da vinca – vimblastina e vincristina) e diterpenos (taxol); além dos agentes antimetabólitos, que atuam bloqueando

a síntese do DNA (por exemplo, o metrotexato e o 5-fluorouracil), e os antibióticos, que atuam nas enzimas envolvidas na replicação do DNA, bloqueando a proliferação celular (por exemplo, doxorubicina, epirubicina e idarrubicina) (SOUSA, 2020; CHEN *et al.*, 2017; BATISTA, 2019).

Agentes quimioterápicos apresentam alta toxicidade, associada à sua baixa seletividade para as células tumorais. Os efeitos indesejáveis ocasionados pelos quimioterápicos relacionam-se ao fato da sua não-especificidade pelas células tumorais, já que os tecidos formados por células de rápida proliferação, como tecido hematopoiético, tecido germinativo, folículo piloso e tecido de revestimento gastrointestinal, apresentam semelhança às células neoplásicas em relação a alta atividade mitótica e ciclos celulares curtos (MOURA *et al.*, 2017).

Em função disso, os efeitos dos quimioterápicos não se restringem às células neoplásicas, atuando também sobre as células normais, promovendo assim, os principais efeitos colaterais como alopecia, mielossupressão e imunossupressão, alterações gastrointestinais (náuseas, vômitos, constipação intestinal, diarreia), além de outros efeitos, tais como cardiotoxicidade, hepatotoxicidade, toxicidade pulmonar, eurotoxicidade, disfunção reprodutiva, toxicidade vesical e renal, alterações metabólicas e toxicidade dermatológica que motivam a busca por novas estratégias de tratamento (MARTINS *et al.*, 2015).

Nesse contexto, a pesquisa e o desenvolvimento de novos medicamentos na área oncológica continua sendo necessária na perspectiva de superar os obstáculos relacionados à efetividade, toxicidade e resistência.

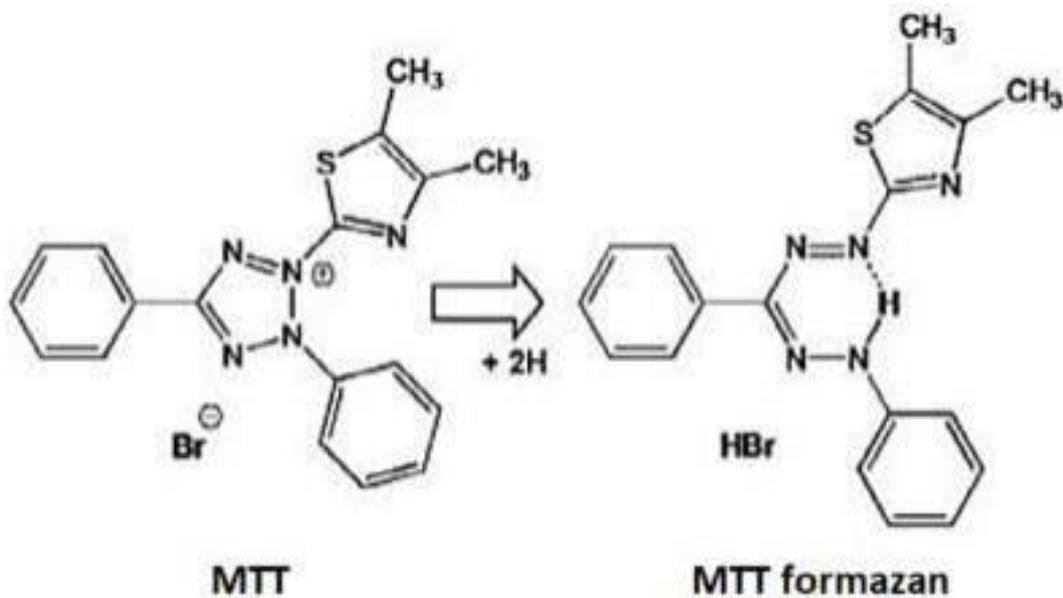
### 2.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

O ensaio de redução MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio ou “teste do MTT”, se trata de um método colorimétrico capaz de medir indiretamente a citotoxicidade, proliferação ou viabilidade celular. Este teste foi inicialmente proposto por Mosmann (1983), sendo considerado até os dias atuais um dos ensaios mais utilizado no mundo devido ao seu bom custo-benefício, para avaliação inicial da citotoxicidade de novas substâncias.

Caracteriza-se como um sal amarelo solúvel em água e sua carga residual positiva torna-o permeável às membranas celulares. No interior de células viáveis, o MTT é reduzido a cristais de formazan, que apresentam cor púrpura e são insolúveis em água (figura 1), após clivagem do anel tetrazólio mediada por enzimas como as desidrogenases

mitocondriais (GONÇALVES *et al.*, 2020).

**Figura 1** – Reação de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio)



**Fonte:** Mittal *et al.* (2017) apud Gonçalves *et al.* (2020).

O produto formado pode ser quantificado por espectrofotômetro, onde a intensidade colorimétrica será diretamente proporcional à quantidade de células viáveis (PASCUA-MAESTRO *et al.*, 2018). Assim, a alta intensidade da cor púrpura indica maior viabilidade celular, enquanto a diminuição da intensidade da cor púrpura significa o número reduzido de células viáveis e, portanto, a citotoxicidade da amostra teste (BAHUGUNA *et al.*, 2017). Os valores obtidos da leitura da densidade óptica das células submetidas ao tratamento com a amostra teste são comparados com os valores de densidade óptica das células controle não tratadas e os resultados são apresentados como porcentagem de sobrevivência celular (HAYON *et al.*, 2003).

Os ensaios *in vitro* envolvem a utilização de células humanas mantidas em cultivo, sob condições ambientais e nutricionais controladas que permitem seu crescimento fora de um tecido/órgão do organismo (KITAEVA *et al.*, 2020). As células empregadas nestes

ensaios são provenientes principalmente de culturas primárias ou de linhagens celulares, sendo a escolha dependente do objetivo e natureza dos experimentos planejados. As células resultantes da cultura primária que apresentarem uma maior capacidade de proliferação e adaptação às novas condições do meio originam as linhagens celulares. Estas culturas ainda preservam algumas características dos tecidos originais e exibem um potencial de replicação indefinido, possibilitando a formação de bancos de células a partir de sua criopreservação, o que permite seu uso por longos períodos em comparação às culturas primárias (HYNDS; VLADIMIROU; JANES, 2018).

## 2.4 DERIVADOS ACRIDÍNICOS

As acridinas incluem-se em uma gama de moléculas tricíclicas com várias atividades biológicas como anti-inflamatória, antifúngica, antimicrobiana, antiviral, antiparasitária e anticancerígena (GENSICKA-KOWALEWSKA *et al.*, 2017; KUKOWSKA, 2017). As acridinas são formadas por dois anéis de benzeno, fundidos a um anel de pirina no centro. Assim, são consideradas moléculas promissoras para o tratamento do câncer, pois sua atividade biológica baseia-se na inibição de enzimas topoisomerases. Algumas acridinas, como a Amsacrina, já são empregadas no tratamento quimioterápico de leucemias e linfomas, no entanto, efeitos colaterais, desenvolvimento de resistência e baixa biodisponibilidade fazem com que a substância tenha atividade terapêutica limitada (SZAFRAN *et al.*, 2018).

Esses fatores encorajaram os químicos a modificar estruturalmente a acridina e produzir diferentes derivados que exibiram atividade antitumoral significante (CICHOREK *et al.*, 2018). Como a 5'-oxo-1'-((4-(piperidina-1-il) benzilideno)amino)-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-p (AMTAC-23), induziu o menor percentual de inibição do crescimento em células tumorais PC-3; enquanto a (E)-1'-((4-bromo-benzilideno)amino)5'-oxo-1'5'-dihidro10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-19) foi capaz de inibir o crescimento de células de carcinoma colorretal (HCT-116). Dados preliminares demonstraram que a substância 3-(acridin-9-il)-2-ciano-N-(4-metoxi-benzilideno) - acrilohidrazida (AMTAC-02) apresentou potente atividade antitumoral *in vivo* em um modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich (GOUVEIA *et al.*, 2018; ALMEIDA *et al.*, 2016).

Considerando todos os aspectos relacionados à riqueza química e potencial biológico de derivados acridínicos, a equipe de pesquisa do Laboratório de OncoFarmacologia (Oncofar), do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB/Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal da Paraíba – UFPB), iniciou o estudo de diferentes compostos dessa classe em relação a sua toxicidade e atividade antitumoral, favorecendo estudos com esse derivado em parceria com o oncofar e outras Instituição de Ensino Superior.

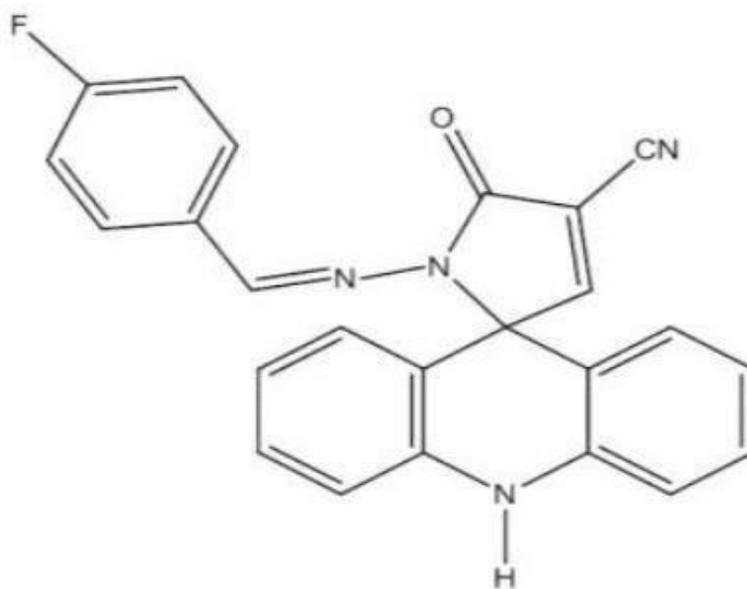
Dados preliminares mostram que o AMTAC-02 apresentou potente atividade

antitumoral *in vivo* em modelo de Carcinoma Ascítico de Ehrlich (ABRANTES, 2016; LIMA *et al.*, 2014), assim como o N'-(2-chloro-6-methoxy-acridin-9-yl)-2-cloro-3-(4-dimethylaminophenyl)-acrilohidrazida (ACS-AZ10) que apresentou baixa toxicidade e atividade antitumoral *in vivo* que envolvia parada do ciclo celular e efeito antiangiogênico (MANGUEIRA *et al.*, 2017).

O experimento realizado por Sousa (2020) concluiu que os compostos acridínicos testados apresentaram citotoxicidade em diferentes linhagens de células tumorais e não tumorais, sendo o AMTAC-19, o que induziu o mais potente efeito antitumoral *in vitro* e demonstrou-se como o composto mais citotóxico, tendo mecanismo de ação relacionado a interferência no ciclo celular, indução de apoptose e efeito antioxidante. Todos estes achados reforçam que os derivados acridínicos trata-se de substâncias promissoras, que necessitam ser testadas cada vez mais profundamente para que se conheça o real potencial seletivo e benéfico para o tratamento do câncer.

De acordo com Batista (2019), novos derivados espiro-acridínicos apresentaram capacidade inibitória sobre a topoisomerase II $\alpha$  semelhantes ou até mais significativas ao padrão amsacrina (mAMSA), como é o caso do (E)-1'-{(4-flúorbenzilideno)-amino}-5'oxo-1,5'-diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-07). A figura 2 demonstra a estrutura química deste composto.

**Figura 2** – Estrutura química do derivado acridínico AMTAC-07



De acordo com o estudo realizado por Batista (2019), a AMTAC-07 apresentou atividade antitumoral *in vitro* nas linhagens de células T de leucemia (MOLT-4), leucemia promioloctíca humana (HL-60) e carcinoma de cólon humano (HCT-116), demonstrando baixa toxicidade aguda, quando administrada por via intraperitoneal em camundongos. A AMTAC-07 também apresentou baixa genotoxicidade *in vivo*, com atividade antitumoral *in vivo*, em um modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich, associada a ação antiangiogênica e imunomoduladora,

Porém a promissora molécula, AMTAC-07, não possui estudos de citotoxicidade em células humanas sadias, portanto com a perspectiva de continuar os estudos com derivados acridínicos, e considerando a escassez de informações sobre o novo composto sintetizado o presente trabalho se propôs a contribuir com o conhecimento toxicológico e seletividade dessa molécula.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a citotoxicidade do derivado acridínico (e)-1'-{(4-flúorbenzilideno)-amino}-5'oxo-1,5'diidro-10h-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'carbonitrila (AMTAC-07) em células saudáveis.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a citotoxicidade do AMTAC-07 em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).
- Determinar o índice de seletividade do AMTAC-07 para as células tumorais.

## 4 MATERIAIS E MÉTODO

### 4.1 MATERIAIS

#### 4.1.1 Substância

Foram utilizados soro bovino fetal (SBF - GIBCO®); Meio de cultura DMEM e RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®); Solução fosfato tamponada (PBS); Dodecil sulfato de sódio (SDS -Sigma-Aldrich®); Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo (DMSO - Sigma-Aldrich®); Tripsina (GIBCO®); MTT (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

#### 4.1.2 Equipamentos

Foram utilizados a centrífuga (HETTICH- Zentrifugen- Rotina 380 R); Microscópio invertido (Olympus); Fluxo Laminar (PACHANE 300 ®, Classe IIB2); Leitor de placa (BioTek Instruments, Sinergy HT).

#### 4.1.3 Substância Teste

O composto espiro-acridínico AMTAC-7 foi fornecido pelo professor Dr. Ricardo Olimpio de Moura, pertencente ao Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM), da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) e sintetizado de acordo com a metodologia descrita por Gouveia e colaboradores (2018). Para a realização dos ensaios *in vitro*, o AMTAC-7 foi previamente solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) (SigmaAldrich, St. Louis, MO, EUA) puro e estéril, posteriormente diluído no meio de cultura específico em cada caso, não ultrapassando a concentração final de 0,4% de DMSO.

#### 4.1.4 Obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)

Para os ensaios de avaliação da citotoxicidade, foi utilizado células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) e isoladas a partir de amostras de sangue humano, cedidas por doadores voluntários saudáveis.

Para obtenção destas células, alíquotas de 20 mL de sangue humano contendo o anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) foram homogeneizadas com 20 mL de PBS (tampão fosfato salino), em tubos estéreis. Posteriormente, a mistura obtida foi adicionada em tubos contendo o Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), uma solução estéril específica utilizada na separação do sangue por gradientes de densidade, que permite o isolamento das células mononucleares. As amostras foram submetidas à centrifugação (400 x g, 20°C, 30 minutos). Em seguida, o plasma foi descartado, o anel contendo as células mononucleares foi cuidadosamente retirado com o auxílio de uma pipeta

de *pasteur* estéril, transferido para um novo tubo do tipo falcon, realizando-se duas centrifugações consecutivas (400 x g, 20°C, por 10 minutos) para lavagem das células com PBS (5-10 mL). Posteriormente, o sobrenadane foi desprezado e o precipitado foi homogeneizado com meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Thermo Fisher, Rochester, NY). A viabilidade foi igual ou superior a 90%. Para isto, as células foram estimuladas com 2% de fitohemaglutinina (eBioscience, Thermo, Fisher, Rochester, NY), por 24 horas antes do tratamento com as amostras teste e da realização do ensaio do MTT.

## 4.2 MÉTODO

### 4.2.1 Tipo de Pesquisa

Trata-se de uma pesquisa experimental em laboratório, com observação a partir de experimentos controlados, com alterações de variáveis e instrumentos de coleta de dados submetidos a testes que asseguraram a sua eficácia, além de análise estatística de resultados. Avaliação da citotoxicidade em células não tumorais.

### 4.2.2 Local da Pesquisa

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de Oncofarmacologia (OncoFar), situado no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

### 4.2.3 Avaliação da citotoxicidade em células não tumorais

A avaliação da citotoxicidade do AMTAC-07 foi realizada por meio do ensaio de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), o qual é um método colorimétrico que mede indiretamente a citotoxicidade, proliferação ou viabilidade celular. O MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido em cristais de formazan de cor púrpura, insolúveis em água, após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais e outras enzimas lisossomais presentes em células metabolicamente ativas. Uma vez solubilizado, o produto formado (formazan) pode ser quantificado espectrofotometricamente e sua intensidade colorimétrica é diretamente proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983).

As células (100 µL) foram distribuídas em placas de 96 poços na concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL. A amostra teste (AMTAC-07) foi dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e incubada (100 µL) em diferentes

concentrações (1,56 – 100  $\mu\text{M}$ ), por 72 horas, em estufa a 5% de  $\text{CO}_2$ , a 37 °C. Em todos estes ensaios o veículo não ultrapassou a concentração final de 0,5%. Como controle positivo foi utilizado o DMSO na concentração de 20%. Além disso, a doxorubicina (DXR, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi utilizada como droga padrão, e sua citotoxicidade foi avaliada frente à PBMC, em concentrações variando entre 0,31 e 20  $\mu\text{M}$ , por 72 horas. Prosseguindo os períodos de incubação, as placas foram centrifugadas (500 x g, 5 minutos, 25°C), o sobrenadante parcialmente removido (110  $\mu\text{L}$ ) e a solução de MTT (10  $\mu\text{L}$ ) foi adicionada (5 mg/mL em PBS) (SigmaAldrich, St. Louis, MO, EUA). As placas foram incubadas com o MTT por 3 horas, em seguida foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% e, os cristais de formazan produzidos foram dissolvidos em um agitador de placas, *overnight*. A absorbância foi mensurada em um espectrofotômetro (leitor de microplacas BioTekInstruments, Sinergy HT, Winooski, VT, EUA), no comprimento de onda de 570 nm. A  $\text{CI}_{50}$  (concentração que produz 50% de inibição no crescimento celular) foi determinada a partir dos dados obtidos de três experimentos independentes, em quadruplicata, utilizando o Software GraphPad Prism 7.0 (Graphpad Software Inc, San Diego, CA, USA).

#### 4.2.4 Cálculo do Índice de seletividade

A partir dos valores de  $\text{CI}_{50}$  foi calculado o índice de seletividade (IS), um índice que permite inferir se o composto é mais seletivo para as células tumorais em comparação às não tumorais, sendo considerado promissor quando o valor for igual ou superior a 2 (DE OLIVEIRA et al., 2015; PILON et al., 2020). O índice de seletividade foi estimado e obtido a partir da razão entre a  $\text{CI}_{50}$  da célula não tumoral pela  $\text{CI}_{50}$  da célula tumoral (DE LIMA SERAFIM et al., 2018; PILON et al., 2020).

#### 4.2.5 Análise de Dados

Para a determinação da  $\text{CI}_{50}$  e seus respectivos intervalos de confiança (95%), foi realizada a regressão não-linear. Os dados foram analisados a partir da média  $\pm$  e.p.m (erro padrão da média) de três experimentos independentes, em quadruplicata. As diferenças estatísticas entre os grupos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA one-way), seguido pelo pós-teste de Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

#### 4.2.6 Aspectos Éticos

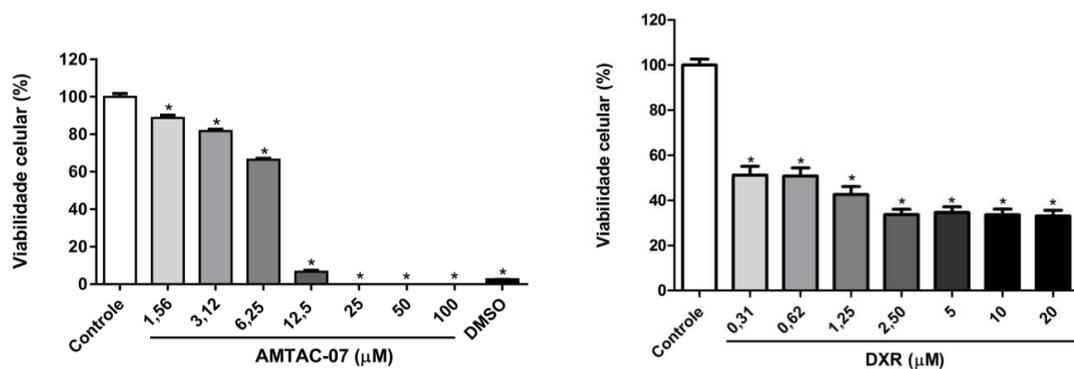
Para a realização do ensaio de citotoxicidade em células normais humanas, as células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs) foram isoladas a partir de amostras de sangue humano, cedidas por doadores voluntários sadios. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde, CAAE: 22986519.0.0000.5188, parecer nº 3.935.975.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS NÃO TUMORAIS

A citotoxicidade do derivado acridínico AMTAC-07 e da droga padrão doxorrubicina (DXR) foi avaliada por meio de diferentes concentrações em células PBMC (Figura 3), obtendo-se os valores de  $CI_{50}$  e índices de seletividade expressos na Tabela 1.

**Figura 3** - Efeito do tratamento (72 horas) com AMTAC-07\*\* (1,56-100  $\mu$ M) e doxorrubicina (DXR\*\*\*) (0,31-20  $\mu$ M) na viabilidade de PBMC.



Fonte: NUNES, 2022.

**Legenda:** Dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.) de três experimentos independentes em quadruplicata, analisados por ANOVA seguido por Tukey. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle.

\*\* AMTAC-07: (E)-1'-{(4-flúorbenzilideno)-amino}-5'oxo-1,5'diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'carbonitrila \*\*\* DXR: Doxorrubicina.

**Tabela 1** - Determinação da  $CI_{50}$  ( $\mu$ M) e do índice de seletividade (IS) para o AMTAC-07\*\* e doxorrubicina (DXR\*\*\*), após tratamento (72 horas) em células PBMC. Os valores de  $CI_{50}$  em células tumorais são apresentados para determinação do IS.

Células	$CI_{50}$ ( $\mu$ M)		IS	
	AMTAC-07	DXR	AMTAC-07	DXR
HL-60	4,95	NT	1,42	ND
MOLT-4	9,34	NT	0,75	ND
HCT-116	8,80	2,57 $\pm$ 0,001	0,80	0,01
PBMC	7,05 $\pm$ 1,09	0,05 $\pm$ 0,002	-	-

**Fonte:** NUNES, 2022.

**Legenda:** Dados foram obtidos a partir de três experimentos independentes realizados em quadruplicata, a partir do ensaio do MTT e, apresentados em valores de  $CI_{50}$  ( $\mu M$ ). Os valores de  $CI_{50}$  em células tumorais foram obtidos a partir de estudos prévios (BATISTA, 2019; DUARTE, 2021). NT: Não testado. ND: Não Determinado.  $CI_{50}$ : Concentração que produz 50% de inibição no crescimento celular. IS: Índice de seletividade ( $CI_{50}$  da célula não tumoral (PBMC)/  $CI_{50}$  da célula tumoral (HL-60, MOLT-4 e HCT-116).

\*\* AMTAC-07: (E)-1'-{(4-flúorbenzilideno)-amino}-5'oxo-1,5'diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'carbonitrila \*\*\* DXR: Doxorrubicina.

A viabilidade das PBMCs foi reduzida após o tratamento com o composto acridínico AMTAC-07 ( $CI_{50}$ :  $7,05 \pm 1,09 \mu M$ ) em relação ao grupo controle (100% de viabilidade) (Tabela 1).

O índice de seletividade (IS) foi determinado a partir dos valores de  $CI_{50}$  da célula não tumoral (PBMC) e das linhagens tumorais (HL-60, MOLT-4 e HCT-116). Considerando os valores dos índices calculados para o AMTAC-07, não houve seletividade ( $IS < 2$ ) para a célula tumoral HL-60 (IS: 1,42), MOLT-4 (IS: 0,75) e HCT-116 (IS: 0,80).

Todavia, a droga padrão doxorrubicina apresentou alta toxicidade em células não tumorais, conforme observado pelo baixo valor de  $CI_{50}$  em PBMC ( $0,05 \pm 0,002 \mu M$ ). Além disso, o índice de seletividade para linhagem tumoral HCT-116 foi consideravelmente baixo (IS: 0,01) (Tabela 1).

Contudo, este resultado não constitui empecilhos ou limitações para a continuação de estudos com esse composto, pois é notório que a grande maioria dos quimioterápicos induz efeitos tóxicos em células não tumorais (FERNANDO; JONES, 2015; SMITH; PREWETT, 2017), incluindo a própria doxorrubicina, utilizada na clínica para o tratamento de vários tipos de câncer (HEVENER *et al.*, 2018; PUGAZHENDHI *et al.*, 2018). Além disso, estudos conduzidos pelo grupo de pesquisa do OncoFar com outros derivados espiro-acridínicos mostraram a potencialidade destas moléculas, que apresentaram atividade antitumoral e baixa toxicidade *in vivo* (SILVA *et al.*, 2019; BATISTA, 2019).

A acridina e seus derivados são usados para fins comerciais há muitos anos e têm atraído a atenção de pesquisadores devido as variedades de atividades. (GENSICKA-KOWALEWSKA; CHOLEWIŃSKI; DZIERBICKA, 2017; DE ALMEIDA *et al.*, 2017). Levando em conta todos os aspectos da riqueza química e potencial biológico dos derivados acrínicos, bem como a escassez de informações sobre o AMTAC -07, o presente trabalho visou contribuir para o fornecimento de dados de citotoxicidade dele.

Uma vez que no Brasil o INCA apontou que a previsão para o triênio 2020-2022 de aproximadamente 41 mil novos casos anuais para cânceres de cólon e reto, como mais incidentes, além de 10.810 novos casos de Leucemias (INCA, 2020). Nesta

perspectiva, é fundamental a descoberta de novos fármacos direcionados para seu tratamento (AHMED, 2020; XIE; CHEN; FANG, 2020). Como descrito nos estudos de Batista (2019) a AMTAC-07 exibiu atividade antiproliferativa nas linhagens de células de leucemia promioloctíca humana (HL-60) e carcinoma de cólon humano (HCT-116). Ainda, estudos anteriores (DUARTE *et al.*, 2021) os resultados *in vitro* do derivado espiroacridínico AMTAC-06, que teve sua maior atividade em carcinoma colorretal (HCT-116).

## **6 CONCLUSÃO**

De acordo com os estudos realizados com AMTAC-07 pode-se concluir que:

- A citotoxicidade foi demonstrada em células não tumorais, in vitro;
- Possui seletividade para células tumorais HCT-116, superior à droga padrão doxorrubicina;
- Dispõe de efeito antitumoral, com maior atividade na linhagem de carcinoma colorretal humano.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, S. M. et al. New spiro-acridines: DNA interaction, antiproliferative activity and inhibition of human DNA topoisomerases. *International journal of biological macromolecules*, v. 92, p. 467-475, 2016

AHMED, M. Colon Cancer: A Clinician's Perspective in 2019. *Gastroenterology Research*, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2020.

BAHUGUNA, A.; KHAN, I.; BAJPAI, V.K.; KANG, S.C. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, v. 12, n. 2, 2017.

BAROSA, J. et al. Head and neck sarcoma: analisys of 29 cases. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*, v. 131, n. 2, p. 83-6, 2014.

BATISTA, Tatianne Mota. Toxicidade e atividade antitumoral do derivado acridínico (E)-1'-{(4-flúorbenzilideno)-amino}-5'oxo-1, 5'diidro-10H-espiro [acridina9, 2'-pirrol]-4' carbonitrila (AMTAC-07). *Tese de Mestrado – UFPB*, 2019.

BRAY, Freddie et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

CICHOREK, M. et al. Novel therapeutic compound acridine–retrotuftsina action on biological forms of melanoma and neuroblastoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, p. 1-15, 2018.

COSTA, Karén Kelyany Duarte et al. Aspectos epidemiológicos da mortalidade por câncer de mama na Paraíba, no período de 2013 a 2018. *Saúde Coletiva: avanços e desafios para a integralidade do cuidado*, 2021.

DE LIMA SERAFIM, V. et al. New thiophene–acridine compounds: Synthesis, antileishmanial activity, DNA binding, chemometric, and molecular docking studies. *Chemical Biology and Drug Design*, v. 91, n. 6, p. 1141–1155, 2018.

DE OLIVEIRA, P. F. et al. Cytotoxicity screening of essential oils in cancer cell lines. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 25, n. 2, p. 183–188, 2015.

DUARTE, S. S. et al. Apoptotic and antioxidant effects in HCT-116 colorectal carcinoma cells by a spiro-acridine compound, AMTAC-06. *Pharmacological Reports*, v. 74, n. 3, p. 545-554, 2022.

FERNANDO, J.; JONES, R. The principles of cancer treatment by chemotherapy. *Surgery (United Kingdom)*, v. 33, n. 3, p. 131–135, 2015

GAJEK, A. et al. Chemical modification of melphalan as a key to improving treatment of haematological malignancies. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2020.

GAJULAPALLI, Vijaya Narahsihma Reddy et al. Oestrogen receptor negativity in breast cancer: a cause or consequence?. *Bioscience reports*, v. 36, n. 6, p. e00432, 2016.

GENSICKA-KOWALEWSKA, M. et al. **Synthesis and Biological Evaluation of Acridine/Acridone Analogs as Potential Anticancer Agents. Medicinal Chemistry (Sharjah (United Arab Emirates)), 2018.**

GOUVEIA, R. G. et al. **Synthesis, DNA and protein interactions and human topoisomerase inhibition of novel Spiro-acridine derivatives. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2018**

GROLL, Andrea von. **Lipídios catiônicos anfífilos como neutralizadores da carga elétrica do DNA para transfecção in vitro de células eucarióticas. Dissertação de Mestrado – UFRGS, 2003.**

HAMOT, G. et al. Method validation for automated isolation of viable peripheral blood mononuclear cells. **Biopreservation and Biobanking**, v. 13, n. 3, p. 152–163, 2015.

HAYON, T.; DVILANSKY, A.; SHPILBERG, O.; NATHAN, I. Appraisal of the MTT-based assay as a useful tool for predicting drug chemosensitivity in leukemia. *Leukemia & lymphoma*, v. 44, n. 11, p. 1957-1962, 2003.

HEVENER, K. E. et al. Recent developments in topoisomerase-targeted cancer chemotherapy. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 8, n. 6, p. 844–861, 2018.

HICKLIN, D. J.; ELLIS, L. M. Role of the vascular endothelial growth factor

HIGDON, L. E. et al. Virtual Global Transplant Laboratory Standard Operating Procedures for Blood Collection, PBMC Isolation, and Storage. **Transplantation Direct**, v. 2, n. 9, p. e101, 2016.

HYNDMAN, Iain Joseph. The contribution of both Nature and Nature to Carcinogenesis and progression in solid tumours. **Cancer Microenvironment**, v. 9, n. 1, p. 63-69, 2016.

HYNDS, R. E.; VLADIMIROU, E.; JANES, S. M. The secret lives of cancer cell lines. *DMM Disease Models and Mechanisms*, v. 11, n. 11, p. 1–5, 2018.

LISBOA, T. et al. Toxicity and Antitumor Activity of a Thiophene-Acridine Hybrid. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 1, 2019.

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, N. L.; TAVÁREZ, S.; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, Z. I. *In vitro* toxicity assessment of zinc and nickel ferrite nanoparticles in human erythrocytes and peripheral blood mononuclear cell. **Toxicology in Vitro**, v. 57, n. January, p. 54–61, 2019.

MARQUES, Nelson Pereira et al. Cancer diagnosis in Brazil in the COVID-19 era. **Seminars in Oncology**. WB Saunders, 2021.

Ministério da Saúde. Brasil terá 625 mil novos casos de câncer a cada ano do triênio 2020-2022. **INCA – Instituto Nacional do Câncer**, 2020. Disponível em:

<<https://www.inca.gov.br/noticias/brasil-tera-625-mil-novos-casos-de-cancer-cada-ano-do-trienio-2020-2022>>. Acesso em: 20 out. 2021.

Ministério da Saúde. Estimativa 2020. **INCA – Instituto Nacional do Câncer**, 2018. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/estimativa/introducao>>. Acesso em: 22 out.

2021.

MOURA, Ana Paula Gomes. Toxicidade e potencial antitumoral de um derivado sintético 2-aminotiofeno. **Tese de Doutorado – UFPB**, 2017.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, p. 55–63, 1983

ONO, A. et al. Primary malignant lymphoma of the gallbladder: a case report and literature review. **The British journal of radiology**, v. 82, n. 973, p. e15-e19, 2009.

PASCUA-MAESTRO, R.; CORRALIZA-GOMEZ, M., DIEZ-HERMANO, S., PEREZ-

SEGURADO, C., GANFORNINA, M. D.; SANCHEZ, D. The MTT formazan assay: Complementary technical approaches and in vivo validation in *Drosophila* larvae. *Acta histochemica*, v. 120, n. 3, p. 179-186, 2018

PILON, A. et al. A new family of iron(II)-cyclopentadienyl compounds shows strong activity against colorectal and triple negative breast cancer cells. **Molecules**, v. 25, n. 7, 2020

PUGAZHENDHI, A. et al. Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems. **Life Sciences**, v. 200, n. October 2017, p. 26–30, 2018.

SEEHAWER, Marco et al. Necroptosis microenvironment directs lineage commitment in liver cancer. **Nature**, v. 562, n. 7725, p. 69-75, 2018.

SIEGEL, Rebecca L. et al. Cancer statistics, 2021. **CA: a cancer journal for clinicians**, v.71, n. 1, p. 7-33, 2021.

SILVA, Gleiciele Alice Vieira. Estabelecimento de linhagem de células-tronco de pluripotência induzida (iPSC) de pacientes com perda auditiva hereditária. **Dissertação de Mestrado – USP**, 2021.

SILVEIRA, A. L. Compound A398 , a Novel Podophyllotoxin Analogue : Cytotoxicity and Induction of Apoptosis in Human Leukemia Cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. 1–9, 2014.

Sociedade Brasileira de Cancerologia. Sobre o Câncer: Conheça as categorias de Câncer. **SBC**, 2016. Disponível em: <<https://sbcancer.org.br/conheca-as-categorias-de-cancer>>. Acesso em: 03 nov. 2021.

SOUSA, Valgrécia Matias de. Potencial antitumoral e toxicidade do (E)-1'-((4-bromo-benzilideno)amino)5'-oxo-1'5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila (AMTAC-19), um novo derivado espiro-acridínico. **Dissertação de Mestrado – UFPB**, 2020.

STEWART, Bernard W. et al. Cancer prevention as part of precision medicine: ‘plenty to be done’. **Carcinogenesis**, v. 37, n. 1, p. 2-9, 2016.

SZAFRAN, M. J. et al. Amsacrine derivatives selectively inhibit mycobacterial topoisomerase I (TopA), impair *M. smegmatis* growth and disturb chromosome replication. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, 2018

Universidade Federal do Acre. Neoplasia. **Laboratório de Patologia Geral da UFAC**, 2018. Disponível em: <<https://www2.ufac.br/geralpat/neoplasia>>. Acesso em: 24 out. 2021.

YUAN, B. et al. Effects of active bufadienolide compounds on human cancer cells and CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in mitogen-activated human peripheral blood mononuclear cells. *Oncology Reports*, v. 36, n. 3, p. 1377–1384, 2016.

WAKIUCHI, Julia et al. Reconstruindo a subjetividade a partir da experiência do câncer e seu tratamento. *Revista Brasileira de Enfermagem*, v. 72, p. 125-133, 2019

## ANEXOS

**Anexo A** – Parecer da Comissão de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde (para ensaios com PBMCs)

UFPB - CENTRO DE CIÊNCIAS  
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DA PARAÍBA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ESTUDO DA TOXICIDADE DE PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) DE VOLUNTÁRIOS SADIOS

**Pesquisador:** MARIANNA VIEIRA SOBRAL CASTELLO BRANCO

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 22986519.0.0000.5188

**Instituição Proponente:** Centro De Ciências da Saúde

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DA NOTIFICAÇÃO

**Tipo de Notificação:** Envio de Relatório Parcial

**Detalhe:**

**Justificativa:** O relatório é referente aos dados do trabalho "Toxicidade e potencial antitumoral do

**Data do Envio:** 05/03/2020

**Situação da Notificação:** Parecer Consubstanciado Emitido

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.935.975

**Apresentação da Notificação:**

Bem apresentada

**Objetivo da Notificação:**

Bem definido

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Realizada

**Comentários e Considerações sobre a Notificação:**

Está dentro das normas exigidas

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Apresentados corretamente pois a sede do estudo também recebeu os resultados parciais aqui

**Endereço:** UNIVERSITARIO S/N

**Bairro:** CASTELO BRANCO

**CEP:** 58.051-900

**UF:** PB

**Município:** JOAO PESSOA

**Telefone:** (83)3216-7791

**Fax:** (83)3216-7791

**E-mail:** comitedeetica@ccs.ufpb.br