



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

LUÍSE ARAÚJO DE ALBUQUERQUE SIMÕES

**EFEITO CITOTÓXICO DO COMPOSTO FISTULARIN 3 EM CÉLULAS DE
LEUCEMIA MONOCÍTICA AGUDA**

JOÃO PESSOA - PARAÍBA

2017

LUÍSE ARAÚJO DE ALBUQUERQUE SIMÕES

**EFEITO CITOTÓXICO DO COMPOSTO FISTULARIN 3 EM CÉLULAS DE
LEUCEMIA MONOCÍTICA AGUDA**

Trabalho de Conclusão de Curso de apresentado ao Departamento de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba - UFPB, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador:

Prof^o. Dr. Demetrius Antonio Machado de Araújo

Co-orientadora:

Prof^a Ma. Bruna Braga Dantas

JOÃO PESSOA - PARAÍBA

2017

**Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação**

S593e Simões, Luise Araújo de Albuquerque.
Efeito citotóxico do composto Fistularin 3 em células
de leucemia monocítica aguda / Luise Araújo de
Albuquerque Simões. - João Pessoa, 2017.
67 f. : il.

Orientação: Araújo, Demetrius Antonio Machado de.
Coorientação: Dantas, Bruna Braga.
Monografia (Graduação) - UFPB/CBIOTEC.

1. Câncer - Leucemia monocita. 2. Autofagia. 3.
Citotoxicidade. I. Araújo, Demetrius Antonio Machado
de. II. Dantas, Bruna Braga. III. Título.

UFPB/BC

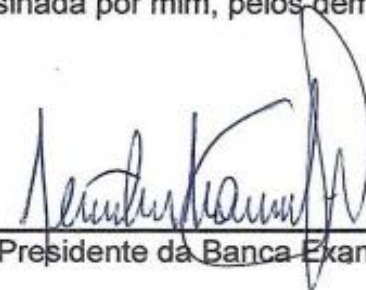


UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA (UFPB)
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA (CBiotec)
CAMPUS I – JOÃO PESSOA/PB
Coordenação do Curso de Bacharelado em
Biotecnologia



ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

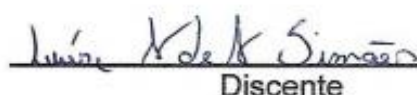
Aos vinte e três do mês de novembro de 2017, às 16:00 h, em sessão pública no auditório do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) deste Campus Universitário, na presença da Banca Examinadora presidida pelo Professor Demetrius Antônio Machado de Araújo e composta pelos avaliadores 1. Prof. Dr. Enéas Ricardo de Moraes Gomes (CBIOTEC/UFPB); 2. Profa. Dra. Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente (CBIOTEC/UFPB), a discente Luise Araújo de Albuquerque Simões, matrícula 11324219, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **Efeito citotóxico do composto Fistularin 3 em células de leucemia monocítica aguda**, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Graduação em Biotecnologia. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela aprovado do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente ao discente e demais presentes e eu, Demetrius Antônio Machado de Araújo, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais avaliadores e pela discente.




Presidente da Banca Examinadora



Avaliador 1



Discente



Avaliador 2

João Pessoa/PB, 23 de novembro de 2017.

Dedico este trabalho aos meus pais e aos meus irmãos, que sempre estiveram comigo e me deram todo apoio possível para que eu pudesse completar mais essa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Clara Magna Araújo de Albuquerque Simões e Luís Carlos de Sousa Simões por terem me dado a oportunidade de entrar em uma universidade e tornarem possível que eu conseguisse terminar minha graduação. Além de todo o amor e carinho que me foi dado, mesmo nos momentos mais difíceis. Vocês sempre acreditaram em mim e qualquer mérito que eu possa vir a ter, dedico ele primeiramente a vocês. Obrigada por serem meu maior exemplo.

Aos meus irmãos, Ismael Araújo de Albuquerque Simões e Gabriel Araújo de Albuquerque Simões, por serem os melhores irmãos do mundo, por me apoiarem e por estarem sempre ao meu lado, além de todas as vezes que precisaram me esperar na universidade ou mudarem a rota de vocês para se adequarem aos meus horários.

A Raimundo Gonçalves Ribeiro Neto, por todo apoio, carinho, companheirismo e paciência durante toda a graduação. Obrigada por todas as vezes que me aguentou reclamar quando algo dava errado.

Aos meus amigos que sempre me ajudaram, principalmente nos momentos de estresse, auxiliando de forma direta e indireta com este trabalho. Em especial aos meus companheiros de curso: Luanna Pinheiro, Jéssica Schirato, Rafael Xavier e Gilanna Falcão.

A todo corpo docente do Centro de Biotecnologia, por todo os ensinamentos. Todos podem ser considerados fundamentais para minha formação profissional.

A todos os integrantes do Laboratório de Biotecnologia Molecular e Celular, pela companhia, pelos ensinamentos e pela amizade. Em especial a Bruna Braga Dantas, por todos os dias de experimentos, por todas as dúvidas tiradas, por todos os protocolos ensinados, por todas discussões científicas, e por ter se tornado não só uma companheira de laboratório, mas uma grande amiga. A Manoel Oliveira e a Lucas Lima, por terem se tornado meus companheiros de laboratório e amigos de todas as horas, muito obrigadas por todos os momentos em que vocês me ajudaram. E ao professor Enéas Ricardo de Moraes Gomes, por todo apoio, auxílio e discussões científicas que influenciaram bastante em minha formação como biotecnologista, além de ter aceitado participar de minha banca, obrigada.

Também gostaria de agradecer a professora Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente, por ter aceitado tão prontamente participar da banca, mesmo estando extremamente ocupada. A senhora sempre vai ter um papel extremamente importante em minha formação como biotecnologista, aliás, a senhora foi a minha primeira professora, da primeira aula do curso, e de uma matéria tão querida, quanto foi PCM.

Ao meu orientador, o profº Dr. Demétrius Antônio Machado de Araújo, por ter me aceitado como aluna de iniciação científica desde o meu primeiro ano de graduação, sendo assim uma das maiores influências em minha formação como profissional. Muito obrigada por todas as oportunidades, por todo o auxílio e conhecimento passado, o senhor sempre será uma peça fundamental em minha formação científica.

Por fim, agradeço a CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro e ao Centro de Biotecnologia pela estrutura física que tornou possível a realização deste trabalho.

“Research is to see what everybody else has seen, and to think what nobody else has thought.”

Albert Szent-Györgyi

RESUMO

Segundo a OMS 2017, o câncer é uma das maiores causas de mortes por doença no mundo, sendo responsável por 8,8 milhões de mortes por ano. Nesse contexto, vem-se conduzindo pesquisas com novos compostos, em especial de origem marinha, devido ao seu elevado potencial farmacológico, para suprir a necessidade de tratamentos mais eficazes contra essa doença. Assim, o presente trabalho teve como objetivo a avaliação do efeito citotóxico do composto de origem marinha Fistularin 3 (FIS 3) em células de leucemia monocítica aguda (THP-1), células de leucemia mieloide crônica (K562), adenocarcinoma mamário (MDA-MB-231) e em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC). Além da determinação, em THP-1, de suas características de morte celular. Para isso, foram realizados os experimentos de redução do MTT, de avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo, de visualização da fragmentação do DNA em gel de agarose, e experimentos de microscopia de fluorescência, para avaliar a influência do composto na despolarização mitocondrial, na presença de espécies reativas de oxigênio (EROs), na geração de organelas vesiculares ácidas (AVOs) e sua capacidade de indução a apoptose. Foi possível observar que o composto foi seletivo para células cancerígenas, de forma que apresentou apenas CI_{50} de $135,20 \pm 3,24 \mu\text{M}$ em 72 horas em HUVEC. Em células THP-1 e K562, apresentou CI_{50} nos períodos de 24, 48 e 72 horas, abaixo de $100 \mu\text{M}$. Na linhagem MDA-MB-231 obteve-se apenas CI_{50} em 72 horas. Em THP-1, a FIS 3 causou aumento da porcentagem do DNA na fase SubG1 e parada no ciclo celular na fase G1, em 24 horas. O composto também induziu o aumento da fragmentação do DNA a partir de 48 horas, e no mesmo período levou a $20,24 \pm 11,32\%$ de despolarização da mitocôndria, 1,8 vezes a mais do que foi visualizado no controle, sem ter apresentado alterações na intensidade de fluorescência. A FIS 3 causou $1,67 \pm 3,32\%$ de EROs, $78,94 \pm 3,80\%$ de células positivas para AVOs e o aumento da fluorescência em relação ao controle, indicando autofagia, além de ter apresentado baixa porcentagem de apoptose precoce e tardia, em relação ao controle. Assim, pode-se concluir que a FIS 3 apresentou efeitos anticancerígenos promissores, tendo efeito citotóxico seletivo, e citotoxicidade mediada pela autofagia em THP-1. Desta forma essa substância possui potencial para continuação dos estudos e elucidação dos seus efeitos citotóxicos em outras linhagens neoplásicas.

Palavras Chave: Câncer, autofagia, citotoxicidade.

ABSTRACT

According to the WHO 2017, cancer is one of the biggest causes of death by disease in the world, accounting for 8.8 million deaths per year. In this context, has been conducted research with new compounds, especially of marine origin, due to its high pharmacological potential, to supply the need for more effective treatments against this disease. The aim of this study was to evaluate the cytotoxic effect of the marine compound, Fistularin 3 (FIS 3) in acute monocytic leukemia (THP-1), chronic myeloid leukemia (K562), mammary adenocarcinoma (MDA-MB-231) and non-cancerous human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). In addition to the determination, in THP-1, of its cell death characteristics. For this, the MTT reduction experiments were performed, followed by cell cycle evaluation by flow cytometry, visualization of DNA fragmentation in agarose gel, and also fluorescence microscopy experiments to evaluate the influence of the compound on the mitochondrial depolarization, on the presence of EROS, on the generation of AVOs and its ability to induce. It was possible to observe that the compound was selective for cancer cells, so that it presented only IC_{50} of $135.20 \pm 3.24 \mu\text{M}$ in 72 hours in HUVEC. In THP-1 and K562 cells, it showed IC_{50} in the 24, 48 and 72 hours periods, below $100 \mu\text{M}$. In MDA-MB-231 cells, IC_{50} was only obtained in 72 hours. In THP-1, FIS 3 caused an increase in the percentage of DNA in the SubG1 phase and caused a halt in the G1 cell cycle, in 24 hours. It was possible to observe that the compound induces increased DNA fragmentation on agarose gel from 48 hours, and that in the same period it induced $20.24 \pm 11.32\%$ of mitochondrial depolarization, 1,8 more times than was visualized in the control, without showing changes in the fluorescence intensity. FIS 3 caused $1.67 \pm 3.32\%$ of ROs, $78.94 \pm 3.80\%$ of positive cells for the presence of AVOs and the increase of the fluorescence in relation to the control, indicating autophagy, in addition to presenting a low percentage of early and late apoptosis. Thus, it can be concluded that FIS 3 showed promising anticancer effects, with selective cytotoxic effect and that its cytotoxicity is mainly mediated by autophagy, in THP-1 cells. Thus, this substance has the potential for further studies and elucidation of its cytotoxic effects in other neoplastic lines.

Keywords: Cancer, autophagy, cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por gênero, exceto pele não melanoma.	22
Figura 2. Características essenciais para progressão do câncer.	23
Figura 3. Composto alcalóide de origem marinha, derivado da bromotirosina, Fistularin 3.	30
Figura 4. Fotomicrografia das linhagens A. HUVEC; B. MDA-MB-231; C. THP-1 e D. K562, em microscópio óptico invertido com aumento de 400x.	32
Figura 5. Histograma representativo do efeito do composto Fistularin 3 na distribuição do DNA no ciclo celular em células THP-1, em que M1 representa a fase SubG1, M2 representa G1, M3 é equivalente a fase S e M4 a fase G2/M.	39
Figura 6. Avaliação da fragmentação do DNA causada pelo composto Fistularin 3 em células THP-1, por eletroforese.	43
Figura 7. Imagem de microscopia de fluorescência representativa dos dois experimentos em duplicata realizados com o objetivo de avaliar a despolarização mitocondrial.	44
Figura 8. Avaliação da porcentagem % de células que apresentaram potencial de membrana mitocondrial polarizado e despolarizado.	45
Figura 9. Avaliação da intensidade de fluorescência TRMR emitida por células THP-1 nos três diferentes grupos avaliados.	46
Figura 10. Imagem de microscopia de fluorescência representativa dos dois experimentos em duplicata realizados com o objetivo de avaliar a presença de EROs.	47
Figura 11. Avaliação da porcentagem % de células que se apresentaram positivas para a presença de EROS.	47
Figura 12. Imagem de microscopia de fluorescência representativa dos dois experimentos em duplicata realizados com o objetivo de avaliar a presença de AVOs como indicativo de autofagia.	48

Figura 13. Avaliação da porcentagem % de células que apresentaram presença ou não de organelas vesiculares ácidas.	49
Figura 14. Avaliação da intensidade de fluorescência LA emitida por células THP-1 nos três diferentes grupos avaliados.....	50
Figura 15. Imagem de microscopia de fluorescência representativa dos dois experimentos em duplicata realizados com o objetivo de avaliar indução do composto Fistularin 3 a apoptose tardia e precoce em células THP-1.....	51
Figura 16. Avaliação da porcentagem % de células marcada para apoptose precoce e apoptose tardia.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização do efeito citotóxico do composto Fistularin 3 (FIS3) e do Etoposídeo (ETO) nos períodos de 24, 48 e 72 horas, sobre as linhagens HUVEC, MDA-MB-231, THP-1 e K562.	41
Tabela 2. Efeito do composto Fistularin 3 em diferentes concentrações na distribuição do DNA no ciclo celular da linhagem leucêmica THP-1.	42

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Linhagens celulares utilizadas para os ensaios de avaliação de citotoxicidade in vitro.	32
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Difosfato de adenosina.
AIF	Fator de indução a apoptose.
ANOVA	Análise de variância.
Apaf-1	Fator 1 de proteases apoptótica.
ATG	Genes de autofagia.
ATP	Trifosfato de adenosina.
AVOs	Organelas vesiculares ácidas.
Bcl-2	Proteína Célula B de linfoma 2.
CDKs	Quinases dependentes de ciclinas.
Cl ₅₀	Concentração inibitória média capaz de promover 50% do efeito máximo.
DISC	Complexo de sinalização indutor de morte.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DP	Desvio padrão.
EROs	Espécies reativas de oxigênio.
HCl	Ácido clorídrico.
H ₂ -DCFH-DA	Sonda molecular 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetato.
HUVEC	Não cancerígenas endoteliais de veia umbilical.
INCA	Instituto Nacional do Câncer.
IP	Iodeto de propídeo.
K562	Leucemia mieloide crônica.

LA	Laranja de acridina.
MDA-MB-231	Adenocarcinoma mamário.
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium].
OMS	Organização mundial de saúde.
PARP 1	Poli(ADP-ribose) polimerase 1.
PBS	Tampão fosfato.
pRb	Proteína do retinoblastoma.
RIP1	Receptor de quinase 1.
RIP3	Receptor de quinase 3.
RPMI	Roswell Park Memorial Institute.
SBF	Soro bovino fetal.
SDS	Dodecil sulfato de sódio.
TNF	Fator de necrose tumoral.
TRMR	Tetrametilrodamina.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
3.1 Aspectos biológicos do câncer	22
3.2 Tipos de morte celular	25
3.2.1 Apoptose	25
3.2.2 Autofagia	27
3.2.3 Necroptose ou necrose programada	28
3.3 Ação de compostos naturais de origem marinha	29
4 METODOLOGIA	31
4.1 Modelos Biológicos experimentais	31
4.1.1. Cultivo celular	31
4.2 Métodos Experimentais	33
4.2.1 Composto estudado	33
4.2.2 Ensaio colorimétrico de inferência da citotoxicidade por meio da redução do MTT	33
4.2.3 Análise do conteúdo de DNA e sua distribuição nas fases do ciclo celular por meio de citometria de fluxo	34
4.2.4 Avaliação da fragmentação do DNA por eletroforese em gel de agarose	35
4.2.5 Microscopia de Fluorescência	35
4.2.5.1 Avaliação do potencial da membrana mitocondrial	36
4.2.5.2 Avaliação da produção das espécies reativas de oxigênio (EROS) ...	36
4.2.5.3 Avaliação da presença de organelas vesiculares ácidas (AVOs) como indicador da autofagia	37
4.2.5.4 Avaliação da apoptose por meio da externalização da fosfatidilserina e necrose por marcação com iodeto de propídeo (IP)	37
4.3 Análises estatísticas	38
4.3.1 Ensaio de redução do MTT	38
4.3.2 Análise dos dados de citometria de fluxo	38
4.3.3 Análises de microscopia de fluorescência	39
5 RESULTADOS	40

5.1 Avaliação do efeito citotóxico do composto Fistularin 3	40
5.2 Avaliação do tipo de morte celular causada pelo composto Fistularin 3 em células de leucemia monocítica aguda (THP-1)	41
5.2.1 Determinação das alterações sofridas no ciclo celular de células THP-1 pelo composto Fistularin 3.....	41
5.2.2 Análise do dano ao DNA causado pelo composto Fistularin 3 em diferentes períodos de tempo nas células THP-1	42
5.2.3 Determinação dos efeitos do composto Fistularin 3 no potencial da membrana mitocondrial de célula THP1	43
5.2.4 Determinação da influência da substância Fistularin 3 na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células THP-1	46
5.2.5 Determinação da indução de autofagia pelo composto Fistularin 3 em células THP-1.....	48
5.2.6 Determinação da indução do composto Fistularin 3 na externalização de fosfatidilserina	50
6 DISCUSSÃO	53
7 CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS.....	62

1 INTRODUÇÃO

O câncer, segundo o documento *World cancer report 2014* da International Agency for Research on Cancer (IARC), da Organização Mundial de Saúde (OMS), é uma das maiores causas de mortes por doença no mundo, afetando todas as populações e países, principalmente os de baixa e média renda, onde estão concentrados cerca de 70% desses casos. Estima-se, ainda, que essa doença seja responsável por 8,8 milhões de mortes anualmente, além de ter sido responsável por 14 milhões de novos casos em 2012 (MILLER et al., 2016).

No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), ocorrerão cerca de 600 mil novos casos dessa doença até o final do ano de 2017, em que serão mais incidentes para homens os cânceres de próstata (28,6%) e pulmão (7,8%), e para mulheres o de mama (28,1%) e intestino (8,6%). A leucemia também possui elevadas taxas de incidência no Brasil, estando entre os 15 tipos de neoplasias mais frequentes no país. Sendo relatada para homens que possuem menos de 40 anos de idade e para crianças e adolescentes do sexo feminino, como a causa mais comum de morte por câncer (REPSOLD et al., 2017).

As causas do desenvolvimento dessa doença são variadas, podendo estar relacionadas à fatores externos, como os fatores ambientais e comportamentais, ou ainda à fatores internos, relacionados à pré-disposição genética. Essa doença pode também, ser causada por mutações genéticas geradas por contaminação viral e bacteriana, além de estar diretamente ligada a disfunções genéticas em genes codificadores de proteínas, como as proteínas anti-apoptóticas, os fatores de crescimento, fatores de transcrição, além de supressores de tumor (MILLIMOUNO et al., 2017).

Nesse contexto, torna-se claro a importância e a necessidade de tratamentos que sejam eficazes no combate ao câncer, de forma a diminuir suas taxas de mortalidade e incidência.

Normalmente as principais formas de tratamento dessa doença são a cirurgia, realizada para tumores sólidos, a radioterapia, a terapia alvo, e a quimioterapia, ou ainda formas combinadas desses tratamentos. Porém, mesmo com essas diversas

opções de formas de tratamento, a eficácia dos mesmos ainda é limitada, tanto pela toxicidade sistêmica causada por diversos fármacos utilizados atualmente, como pelos altos custos do tratamento e pela resistência intrínseca e adquirida desenvolvida pelo câncer (CHINEMBIRI et al., 2014; MCGRANAHAN e SWANTON, 2017).

Mesmo em casos em que são utilizadas tecnologias mais recentes e eficazes no tratamento desta doença, como a imunoterapia, a utilização de microrganismos para a entrega de agentes terapêuticos no ambiente tumoral, além da utilização de biomarcadores que possuem a capacidade de identificar qual a melhor e mais eficaz droga a ser utilizada em determinado paciente que possui determinado tipo de câncer, ainda se pode observar limitações de sua eficácia e de seu uso (MINN e WHERRY, 2016; TURAJLIC et al., 2017; ZHENG et al., 2017).

Assim, a resistência aos quimioterápicos demonstra-se uma grande barreira para os tratamentos utilizados atualmente. Ela pode, ainda, ser dividida em dois subgrupos; a resistência intrínseca que indica que antes de receber a quimioterapia, a neoplasia já possuía fatores mediadores de resistência em suas células, fazendo assim com que o tratamento torne-se ineficaz. E a resistência adquirida, que pode ser desenvolvida durante o tratamento do câncer, que primariamente demonstrava-se sensível, porém pode ter sofrido mutações que levaram a respostas adaptativas, como o aumento da expressão do alvo terapêutico e a ativação de vias de sinalização compensatórias alternativas (HOLOHAN et al., 2013; MINN e WHERRY, 2016).

Os variados efeitos adversos causados pela quimioterapia também são uma barreira no tratamento desta doença, devido à necessidade de utilização não somente do quimioterápico, que normalmente já possui uma alta toxicidade sistêmica, mas de outros medicamentos que possam ajudar no tratamento desses efeitos adversos. Desta forma, causando o aumento da toxicidade do tratamento como um todo (CHINEMBIRI et al., 2014).

Atualmente, com a finalidade de diminuir as limitações citadas anteriormente, vem crescendo o número de pesquisas com produtos e substâncias naturais bioativas que possam substituir os compostos que são utilizados atualmente na clínica, sendo assim alternativas mais eficazes e seletivas no combate ao câncer. Esses compostos podem ser extraídos de diversas fontes, como as de origem terrestre, como as plantas,

vegetais e microrganismos, além das de origem marinha, como esponjas, algas e microrganismos aquáticos (HOLOHAN et al., 2013; CHINEMBIRI et al., 2014).

Nos últimos tempos, o estudo e interesse por produtos de origem marinha vem crescendo, devido ao seu elevado potencial como fonte de compostos bioativos. As esponjas marinhas do filo Porifera vem sendo um dos principais alvos desses estudos, devido aos seus eficientes mecanismos intrínsecos de defesa contra vírus, bactérias e organismos eucarióticos, sendo assim fonte de diversos metabólitos bioativos que podem ser utilizados no combate de vários tipos de doenças. Dentre esses compostos, podem ser citados as Fistularinas, que são compostos derivados da bromotirosina isolados de esponjas marinhas da família *Aplysinidae*. Esses compostos já possuem diversos efeitos relatados na literatura, como de atividade antiviral, antibacteriana e até mesmo antineoplásica (MIJARES et al., 2013; GÓMEZ-ARCHILA et al., 2014; NICACIO et al., 2017).

Entre essas substâncias, pode ser citado o composto alcaloide Fistularin 3, que foi utilizado no presente estudo. Esse composto natural é um derivado de metabólitos secundários produzido por esponjas marinhas *Aplysina fistularis*, porém pode ser encontrado em outras esponjas da família *Aplysinidae*. Essa substância possui alguns dos seus efeitos relatados na literatura, como sua capacidade de inibir a replicação *in vitro* do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), seu efeito antibiótico, e seu efeito citotóxico e pró-apoptótico em células cancerígenas (MIJARES et al., 2013; GOMEZ-ARCHILA et al., 2014; KAUR et al., 2014; PUYANA et al., 2015).

Assim, o estudo citotóxico e do mecanismo de ação desse composto em células neoplásicas e não neoplásicas, torna-se extremamente pertinente, devido ao potencial farmacológico que este composto vem demonstrando nas últimas décadas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito citotóxico do composto de origem natural Fistularin 3 em células cancerígenas e não cancerígenas. E determinar suas características de morte celular em células de leucemia monocítica aguda (THP-1).

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a atividade citotóxica do composto Fistularin 3 em linhagens de THP-1, de leucemia mieloide crônica (K562), em células epiteliais de adenocarcinoma mamário humano (MDA-MB-231) e em células não cancerígenas endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC);
- Determinar o efeito do composto na distribuição do DNA nas fases do ciclo celular em células THP-1;
- Avaliar os danos ao DNA causados pela substância teste na linhagem THP-1;
- Avaliar os efeitos do composto Fistularin 3 sobre o potencial da membrana mitocondrial;
- Avaliar as alterações nos níveis de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) após o período de tratamento com o composto;
- Analisar a presença de organelas vesiculares ácidas (AVOs) induzida pelo composto em células THP-1;
- Avaliar a capacidade da substância Fistularin 3 induzir a apoptose precoce e tardia na linhagem THP-1.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Epidemiologia do câncer


Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer é uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, sendo caracterizado como um dos principais problemas de saúde pública da atualidade. Essa doença foi responsável por cerca de 14 milhões de novos casos em 2012, e 8,8 milhões de mortes em 2015. São ainda, estimados cerca de 20 milhões de novos casos para 2025 (FERLAY, 2013; GBD, 2015; INCA, 2016).

Essa doença afeta todas as regiões do mundo, porém possui diferenças em suas incidências locais, regionais e nacionais, principalmente quando são considerados os diversos tipos de cânceres existentes. É possível observar, também, que 70 % dos casos dessa doença estão concentrados em países de baixa e média renda, localizados principalmente no continente Asiático, Africano e nas Américas do Sul e Central, onde 25% desses casos são causados por infecções, como pelo *Helicobacter pylori*, pelo vírus do papiloma humano (HPV) e hepatite (IARC, 2014; PLUMMER et al., 2016).

Outros fatores relacionados com o um terço do desenvolvimento e mortalidade dessas neoplasias, são fatores comportamentais e dietéticos, como a obesidade, o baixo consumo de frutas e vegetais, além da falta de exercício físico, uso de tabaco e consumo de álcool.

É possível observar que essa doença é mais incidente em homens (53% do total de casos) e causa mais mortes (57%) em relação as mulheres, sendo os tipos de cânceres mais comuns e que possuem maior taxa de mortalidade para esse gênero, os cânceres de pulmão (16,7%), o de próstata (15,0%), colorretal (10,0%) e de estômago (8,5%). Em mulheres, os cânceres que apresentam maiores taxas de incidência e mortalidade, são os de mama (25,2%), de colorretal (9,2%), pulmão (8,7%) e de colo de útero (7,9%). No Brasil é possível observar a distribuição da incidência na **Figura 1** (IARC, 2014; INCA, 2016).

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por gênero, exceto pele não melanoma.

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

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA, 2016.

3.2 Aspectos biológicos do câncer

No desenvolvimento celular normal, as células possuem um controle eficaz na regulação do seu crescimento, proliferação e morte celular, porém com o comprometimento dessa homeostase, essas células podem sofrer o acúmulo progressivo de danos, mutações e alterações em seu material genético, o que pode transformá-las em células cancerígenas (HANAHAN e WEINBERG, 2011; CHAMMAS, 2013).

Nesse contexto também é possível visualizar que no metabolismo celular de células neoplásicas, ocorrem falhas sucessivas nos mecanismos de reparo ao DNA intrínsecos das células, de forma que pode ocorrer a super-expressão de proto-oncogenes e a inativação de genes responsáveis pela codificação de proteínas supressoras de tumor, como a proteína p53, que em condições normais possui funções de repressão à sinais proliferativos, de sensibilização as células para a apoptose e autofagia, além de promover maior estabilidade genômica (HALNAUT et al., 2013; ENGELAND, 2017).

Normalmente, no ciclo celular, as células possuem diversos pontos de checagem, que são extremamente importantes para que processos como o de divisão celular ocorram da forma correta. Diversas proteínas regulatórias participam diretamente na regulação do ciclo celular, sendo assim seus genes codificadores, são

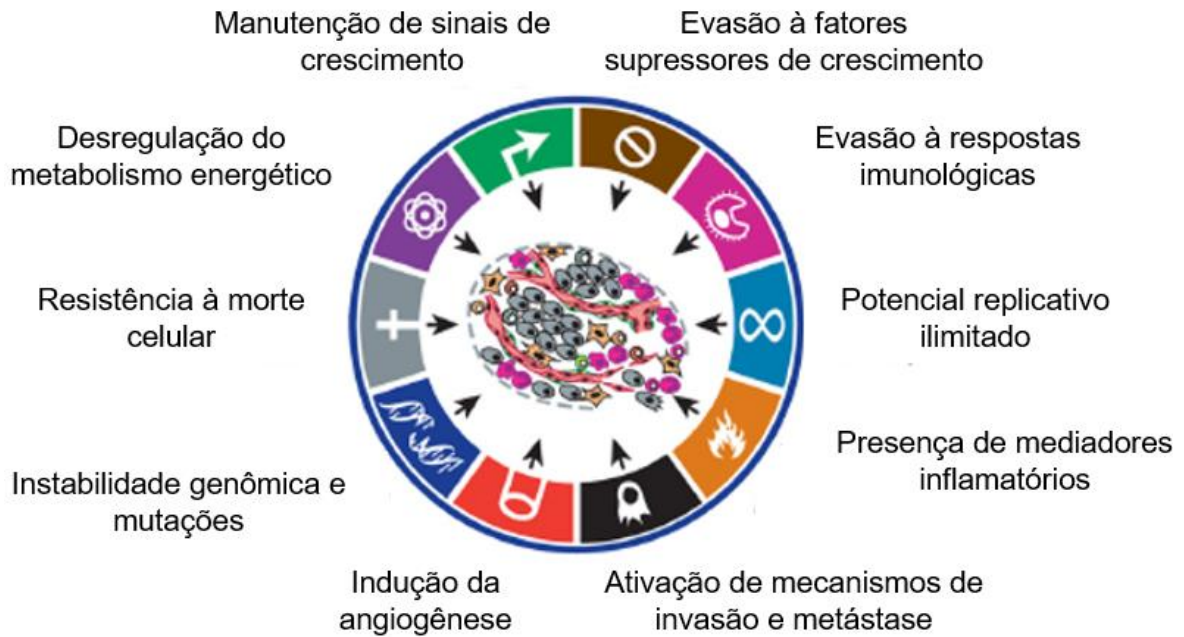
os principais alvos de mutações e inativações durante o câncer (BERTOLI et al., 2013; HONG et al., 2014).

A proteína supressora de tumor pRb, por exemplo, é um potente inibidor da transcrição nas fases G1-S, fazendo com que haja parada do ciclo celular em resposta a estresses genotóxicos. Assim, mutações ou inativações em genes codificadores dessa proteína, podem fazer com que haja a desregulação na checagem dessa transição do ciclo celular (G1-S), permitindo que células avancem para a fase S de forma irrestrita, sendo essa uma das características de células neoplásicas (BERTOLI et al, 2013; ESCRIBANO-DIAZ et al., 2013; HONG et al., 2014).

Sendo assim, pode-se perceber que a desregulação e falhas nos pontos de checagem do ciclo celular também são um fator crucial para o desenvolvimento do câncer, já que não há a ação de mecanismos inibitórios dos fatores de crescimento celular como as ciclinas e quinases dependentes de ciclinas (CDKs), de forma que o ciclo celular não é interrompido e o DNA não é reparado, levando a divisão celular de células com instabilidade genômica e assim perpetuando danos e mutações genéticas (KAPLON et al., 2015; WIMAN e ZHIVOTOVSKY, 2017).

As células neoplásicas possuem diversos mecanismos e características que permitem sua sobrevivência e o aumento da complexidade de seu tratamento, entre esses mecanismos podem ser observados a sustentação de sinais de proliferação, seu potencial replicativo ilimitado, indução à angiogênese, instabilidade genômica, resistência à morte celular, a evasão a fatores supressores de crescimento e a respostas imunológicas, além de sua capacidade de invasão à locais secundários e metástase e outros (**Figura 3**) (HANAHAN e WEINBERG, 2011; SU et al., 2015).

Figura 2. Características essenciais para progressão do câncer.



Fonte: Adaptado de HANAHAN e WEINBERG, 2011.

A metástase é um dos principais pontos na progressão do câncer, indicando um estágio mais avançado da doença, esse processo é caracterizado pela saída do câncer do seu microambiente tumoral primário para outros locais do organismo, onde pode colonizar outros tecidos além do seu de origem (DANTAS et al., 2015; POSTOW et al., 2015; SU et al., 2015).

Como se pode perceber, os danos, alterações e mutações ao DNA são fatores essenciais para geração de células neoplásicas, que expressem as características acima. Porém, o dano ao DNA também é considerado um alvo terapêutico para o tratamento do câncer por meio da quimioterapia e da radioterapia, já que essas células tornam-se mais vulneráveis a esses tratamentos devido a suas falhas nos mecanismos de reparo a esses danos (BOUWMAN e JONKERS, 2012; LORD e ASHWORTH, 2012).

No tratamento das neoplasias com medicamentos que possuem ação citotóxica de geração de danos ao material genético das células, é possível visualizar a parada do ciclo celular em determinadas fases do mesmo, demonstrando que houve danos ao material genético, podendo esses serem reversíveis ou não. Também pode ser observado seu efeito de fragmentação do DNA devido ao acúmulo do mesmo na fase

SubG1 do ciclo celular, demonstrando que os danos causados por tal tratamento são irreversíveis (REYES-REYES et al., 2012; LIU et al., 2016; ZHANG et al, 2016).

Um dos alvos terapêuticos mais buscados atualmente, são danos ao material genético das células que estabilizem e ativem a p53, já que essa proteína pode atuar como um fator de supressão tumoral (CASTROGIOVANNI et al., 2015; ENGELAND, 2017).

A leucemia, ao contrário de outros tipos de câncer, não possui um microambiente tumoral, devido a sua origem ser a partir da formação anormal de células pluripotentes durante o processo de hematopoese. Essas células podem se diferenciar em células mieloides e linfoides anormais, de modo que poderão dar origem a diferentes tipos de neoplasias, como a leucemia monocítica aguda, a leucemia linfoblástica aguda, a leucemia linfoblástica crônica e a leucemia mieloide crônica (NCI, 2013; ROSE-INMAN e KUEHL, 2014; ZHANG et al., 2016).

O tratamento dessa neoplasia, normalmente requisita do uso de mais de um fármaco quimioterápico, de forma que seu tratamento torna-se extremamente tóxico ao paciente, além de deixa-lo mais imunologicamente deprimido. Assim, o estudo de fármacos mais seletivos para os diferentes tipos e subtipos dessa neoplasia torna-se extremamente importante (ROSE-INMAN e KUEHL, 2014; REPSOLD et al., 2017).

3.2 Tipos de morte celular

3.2.1 Apoptose

A apoptose é um tipo de morte celular programada caracterizada por diversos fatores, como por exemplo a desorganização da membrana plasmática, o encolhimento celular pela diminuição de seu volume, a condensação da cromatina, fragmentação nuclear e do DNA, além da externalização da fosfatidilserina. A ativação das caspases 3 e 6 caracterizam a mediação da expressão dessas características (ZHANG et al, 2016; MILLIMOUNO et al, 2017).

Esse tipo de morte celular possui duas vias de sinalização, a via intrínseca e a via extrínseca. A via intrínseca apoptótica pode ser ativada por diversos estímulos intracelulares, como o estresse oxidativo, a inativação de fatores de crescimento e pelos danos ao DNA. Esses estímulos levam a liberação do citocromo c por meio da

ação de uma série de proteínas da família Bcl-2 que controlam essa liberação por meio da regulação da permeabilização da membrana mitocondrial, mediada pela ativação de Bax de forma que neste processo apoptótico, ocorre a despolarização mitocondrial e geração de estresse oxidativo pela diminuição da fosforilação oxidativa causada pela perda do potencial transmembrânico mitocondrial (ESCRIBANO-DIAZ et al., 2013; SU et al., 2015).

Há também a formação de um complexo chamado de apoptossomo, que é formado a partir da liberação do citocromo c da mitocôndria, fazendo com que ele se ligue a porção C-terminal da proteína Apaf-1 (fator ativador de proteases apoptótica) que irá, então, ser ativada e promover a ativação das procaspases-9, esta irá clivar e ativar as caspases efetoras (ZHANG et al., 2016; MILLIMOUNO et al., 2017).

Já na via extrínseca, é observada a iniciação da apoptose por meio da interação de ligantes de morte aos seus respectivos receptores na superfície da membrana plasmática. Normalmente esses receptores que possuem um domínio de morte intracelular, são da superfamília do TNF (fator de necrose tumoral). A interação entre o ligante ao seu receptor, resulta na formação do complexo sinalizador indutor de morte DISC (*death-inducing signaling complex*). A formação desse complexo pode promover a ativação das caspases 10 e 8, em que a última, em alguns tipos de célula, pode iniciar diretamente a apoptose através da ativação das caspases efetoras 3, 6 e 7. Em outros tipos de célula a mitocôndria é despolarizada, por meio por meio da clivagem de do membro da família Bcl-2, Bid em tBid, ativando assim, a via intrínseca (RUSSO et al., 2010; ESCRIBANO-DIAZ et al., 2013; SU et al., 2015; ZHANG et al., 2016; MILLIMOUNO et al, 2017).

A desregulação da apoptose pode gerar diversos tipos de doenças, incluindo o câncer. Assim, adquirida a característica de evasão a morte celular programada, a neoplasia passa a adquirir outras características, como a de metástase, cujo seu sucesso está na habilidade das células cancerígenas evitarem a morte celular programada. A resistência adquirida de uma célula neoplásica a determinado quimioterápico também pode ocorrer devido a essa desregulação (ROOS et al., 2016; MILLIMOUNO et al., 2017).

3.2.2 Autofagia

A autofagia é um processo evolucionário de conservação catabólica, em que ocorre a degradação de proteínas e organelas celulares por meio do englobamento das mesmas por autofagossomos de dupla membrana que se associam ao lisossomo, formando as AVOs. Dessa forma pode ser considerado um processo de degradação e renovação celular. Assim, pode-se perceber que esse processo é essencial para a manutenção da homeostase interna, para renovação dos componentes citoplasmáticos e é um ponto crítico na regulação do crescimento celular, sendo considerado um mecanismo de sobrevivência das células, que pode ser dividido em nucleação, alongamento, e a formação de autofagossomo e autolisossomo (KAPLON et al., 2015; ROOS et al., 2016).

Porém em determinadas circunstâncias de estresse celular, ocorre o excesso de autofagia, gerando um processo de morte celular. Esse mecanismo é controlado por uma série de genes conservados, chamados de genes relacionados a autofagia (ATGs), como o gene BECN1, que possui funções supressoras de tumor, sendo um dos principais genes mutados no desenvolvimento do câncer. Pode ser visualizado, também, a superexpressão de vias que regulam a autofagia negativamente, como a via PI3K/Akt/mTOR. Defeitos nesse processo podem levar a acumulação de proteínas chaperonas, que aumentam o número de proteínas não enoveladas, que normalmente seriam eliminadas pelo processo autofágico. Esse mecanismo pode ser influenciado e ativado pelo aumento de EROs, hipóxia, estímulo de fármacos, pela privação de nutrientes e estresses no retículo endoplasmático via transdução de sinais complexos (ZHI e ZHONG, 2015; REPSOLD et al., 2017).

Assim, é possível visualizar diferentes formas funcionais da autofagia, entre elas sua forma citoprotetora, em que a autofagia pode atuar como mecanismo de resistência ao tratamento do câncer. Em sua forma citotóxica, sendo sua indução a morte celular pode ser independente de apoptose ou não, enquanto como autofagia citostática atua como inibidora do crescimento celular de forma independente da apoptose (WANG et al., 2017).

Nesse contexto, pode-se perceber que esse processo é fundamental para o bom funcionamento do organismo como um todo, de forma que alterações no

maquinário autofágico podem levar a condições patológicas, como envelhecimento e câncer. É ainda possível observar que esse processo pode ser utilizado como alvo terapêutico contra as neoplasias, de diferentes formas (SU et al., 2015).

3.2.3 Necroptose ou necrose programada

Esse tipo de morte celular, que antes pensava-se ser um processo apenas acidental e não regulado de morte celular, pode ser induzido e regulado assim como os tipos de morte celular descritos anteriormente. Esse mecanismo é independente de caspases, podendo ser ativado por meio de receptores da família TNF, receptores de linfócitos T, receptores de interferon ou toll like, além de por meio do metabolismo celular, estresses genotóxicos e por meio de diversos quimioterápicos (CHAN, 2013; DEMPSEY, 2013; PATIL et al., 2015).

Nesse processo pode-se visualizar a formação de “necrossomo” por meio da interação proteína receptor quinase 1 e 3 (RIP1/3), sendo essa uma das principais características desse tipo de morte. Também durante esse processo, pode-se observar a geração de EROs, que resulta em uma peroxidação lipídica e o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial (LU et al., 2014; LEPRÊTE et al., 2015).

Esse aumento na permeabilidade desta membrana gera diversas consequências para a progressão do mecanismo da necroptose, como a diminuição dos níveis citosólicos de ATP devido redução do transporte do mesmo da mitocôndria para o citosol, além do alto consumo de ATP pela poli(ADP-ribose) polimerase 1 (PARP1) que se encontra superativada nesse mecanismo de morte celular, além da liberação do fator de indução a apoptose (AIF), de forma que esse fator entra no núcleo celular e se liga ao DNA (SU et al., 2015, 2016).

Há também o aumento da permeabilização da membrana lisossomal nesse tipo de morte, resultando na liberação de hidrolases citotóxicas no citosol. Esse conjunto de fatores levam a consequente fissão da mitocôndria e execução da necroptose (LU et al., 2014; LEPRÊTE et al., 2015; SU et al., 2015; SULLIVAN et al., 2016; NAJAFOV et al., 2017).

Esse processo também pode ser relacionado a formação e progressão de doenças como o câncer. Variações no gene codificador da RIP3, por exemplo, pode

levar ao aumento do risco de desenvolvimento de linfomas não Hodgkin. Porém, assim como os tipos de morte relatados anteriormente, essa via também pode ser o alvo de agentes terapêuticos (SU et al., 2015, 2016).

3.3 Ação de compostos naturais de origem marinha

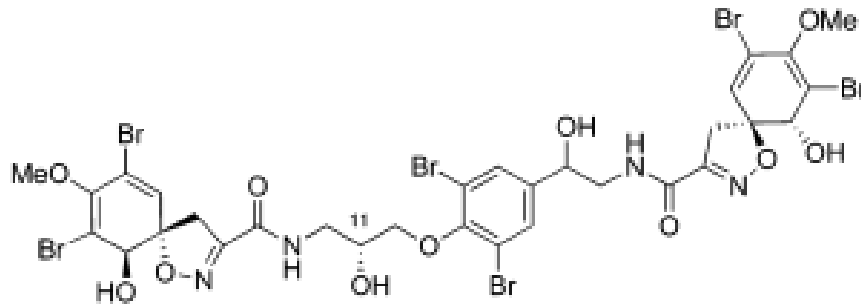
Nos últimos 30 anos, tem-se aumentado o número de pesquisas com compostos de origem marinha, devido ao seu potencial efeito farmacológico e o aumento da tecnologia, que permitiu com que esse campo fosse melhor explorado. As esponjas marinhas são um dos principais organismos de origem marinha estudados atualmente, devido aos seus eficazes mecanismos de defesa contra patógenos (CHINEMBIRI et al., 2014; MILLIMOUNO et al., 2014).

Os metabólitos derivados da bromotirosina em esponjas da ordem Verongida, são uma classe multifacetada de compostos bioativos que possuem um importante papel na defesa desses organismos, de forma que nos últimos anos o potencial farmacológico dessas substâncias vem sendo explorado e demonstrado diversos efeitos bioativos (GÓMEZ-ARCHILA et al., 2011; PALKAR et al., 2015; DAI et al., 2016; MUDIT e SAYED, 2016).

Substâncias alcaloides derivadas desses metabólitos possuem um diversificado espectro de atividades metabólicas, sendo encontrados principalmente em esponjas das famílias *Aplysinidae*, *Aplysinellidae*, e *Pseudoceratinidae*. Entre os efeitos relatados desses compostos, pode ser citada a atividade antineoplásica a células de adenocarcinoma cervical humano (HeLa), células de adenocarcinoma de próstata humano (PC3), células de câncer de mama e em células acísticas de tumor de Ehrlich, entre outras (GÓMEZ-ARCHILA et al., 2011; GALEANO et al., 2011; NIEMANN et al., 2014).

Sendo assim, o maior estudo e avaliação do efeito desses compostos se torna uma alternativa para o desenvolvimento de novos fármacos que se demonstrem mais eficazes e seletivos no combate ao câncer. Entre esses compostos, podemos citar a substância Fistularin 3 (**Figura 3**).

Figura 3. Composto alcalóide de origem marinha, derivado da bromotirosina, Fistularin 3.



Fonte: ROGERS et al., 2005.

Esse composto foi primeiramente isolado da esponja *Aplysina fulva* em 1979, e já possui alguns efeitos relatados na literatura que demonstram seu potencial farmacológico, como sua atividade antibacteriana, antimicótica, e atividade citotóxica em células de carcinoma mamário humano (célula MCF-7), e em células U937 e Jurkat, utilizadas como modelos para neoplasias sanguíneas (GALEANO et al., 2011; BLUNT et al., 2013; MAYER et al., 2013; MIJARES et al., 2013; PALKAR et al., 2015; FLOREAN et al., 2016; NICACIO et al., 2017). Desta forma, essa substância foi utilizada para realização deste estudo, com a finalidade de avaliar sua citotoxicidade em células cancerígenas e não cancerígenas e identificar seus mecanismos de morte celular em células de leucemia monocítica aguda (THP-1).

4 METODOLOGIA

4.1 Modelos Biológicos experimentais

4.1.1. Cultivo celular

Foram utilizadas, para o presente estudo, células cancerígenas e não cancerígenas (**Quadro 1**). As linhagens foram obtidas através do Instituto Nacional do Câncer (INCA) no Rio de Janeiro, ou por meio de colaboradores. Os cultivos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular, no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba.

As células foram mantidas em incubadora (modelo HF212, Ultrafase) com 5% de CO₂ a 37°C, e foram cultivadas em frascos de cultivo celular contendo meio RPMI 1640, no caso das células HUVEC, K562 e THP1, e meio DMEM, linhagem MDA-MB-231, suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e antibióticos (penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL).

O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas. As células aderentes requisitaram do uso da solução de tripsina/EDTA, com a finalidade de soltá-las do frasco de cultivo ao atingirem confluência de 80%. Após passado esse período, essa solução era bloqueada com o meio de cultivo, e então as células eram centrifugadas (centrífuga HERMLE Labortechnik GmbH) a 500 g por 5 minutos. As linhagens não aderentes foram passadas diretamente para tubos de 15 mL e centrifugadas.

O crescimento celular foi acompanhado por meio da utilização de microscópio óptico invertido (Medilux) e a viabilidade celular inferida por meio da contagem de células em câmara de Neubauer, utilizando o reagente Azul de Tripán (4%, SIGMA). Esse reagente consegue penetrar apenas células com a membrana danificada, deixando-as com uma coloração azulada, de forma que as mesmas podem ser identificadas e contadas como inviáveis. Desta forma, quando a amostra possuía 90% de células viáveis, os experimentos eram realizados (STROBER, 2015).

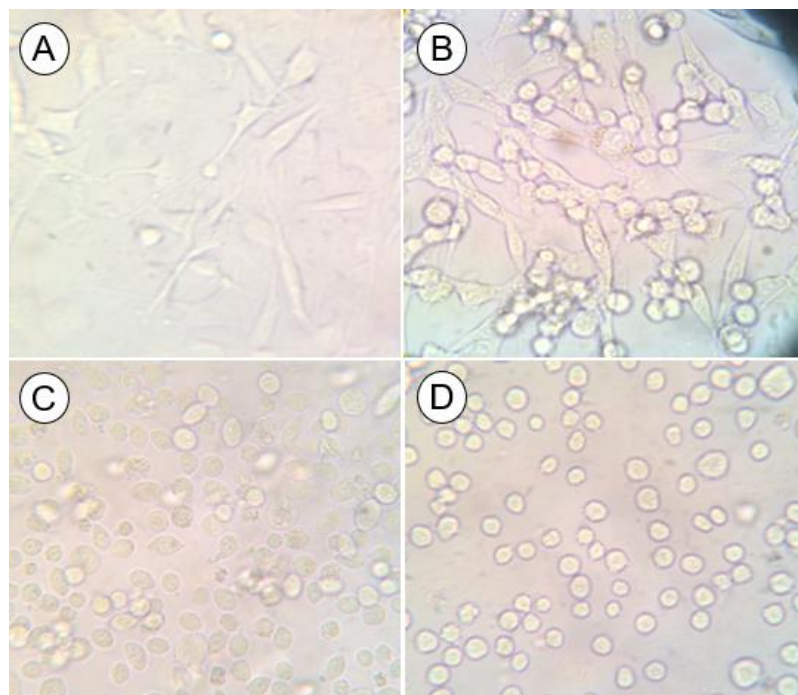
Foi utilizado o seguinte cálculo de contagem de viabilidade celular:

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

Quadro 1. Linhagens celulares utilizadas para os ensaios de avaliação de citotoxicidade *in vitro*.

Linhagem	Histologia	Origem	Tipo de Cultura
HUVEC	Não cancerígena. Célula endotelial de veia de cordão umbilical humano	Humana	Aderente
MDA-MB-231	Cancerígena. Células epiteliais de adenocarcinoma mamário humano	Humana	Aderente
THP-1	Cancerígena. Células de leucemia monocítica aguda	Humana	Não-aderente/em suspensão
K562	Cancerígena. Células de leucemia mieloide crônica	Humana	Não-aderente/em suspensão

Figura 4. Fotomicrografia das linhagens A. HUVEC; B. MDA-MB-231; C. THP-1 e D. K562, em microscópio óptico invertido com aumento de 400x.



4.2 Métodos Experimentais

4.2.1 Composto estudado

O composto utilizado é um produto natural derivado de metabólitos secundários que podem ser encontrados na espécie de esponja marinha *Aplysina fulva*. Assim, a substância Fistularin 3 foi extraída, purificada e cedida pela professora Dra. Barbara Viviane de Oliveira Santos, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Para realização dos ensaios, a substância foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) puro e estéril, com concentração inferior a 1,6% para o preparo da solução estoque a uma concentração de 50mM. A partir da solução estoque, foram realizadas diluições seriadas em meio RPMI para obtenção das concentrações finais utilizadas para cada experimento.

4.2.2 Ensaio colorimétrico de inferência da citotoxicidade por meio da redução do MTT

Essa técnica consiste na inferência da citotoxicidade do composto estudado na viabilidade celular, por meio da redução do MTT, composto hidrossolúvel de coloração amarela, em cristais de formazan, composto não solúvel em água de coloração púrpura, por células viáveis devido ao metabolismo intracelular indireto feito pelo subproduto, NADH e NADPH, de enzimas mitocondriais e lisossomais. Assim, considera-se a intensidade de absorbância lida pelo ELISA diretamente proporcional a quantidade de células viáveis em cada poço após o tratamento com a substância em estudo (MOSMANN, 1983; RISS et al., 2013).

Protocolo experimental:

As linhagens K562 e THP-1 foram plaqueadas em uma densidade de 5×10^5 células/mL, enquanto as linhagens aderentes foram a 3×10^5 células/mL, 24 horas antes da incubação com a substância, para que as células pudessem aderir ao poço, em placas de 96 poços, contendo 200 μ L por poço. As linhagens foram incubadas com as concentrações de 200, 100, 50 e 25 μ M da substância por 24, 48 e 72 horas em estufa a condições reguladas de temperatura de 37°C e 5% de CO₂. Após esse

período os poços foram lavados com solução salina (PBS) e então foi adicionado 10 μL de MTT (amresco, 5mg/1mL de PBS) (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium]) por 3 horas e meia. Passado esse intervalo, foi adicionado 100 μL da solução de SDS/HCl (10 g de SDS, Amresco, 100 mL de HCl 0,01N, Fisher). As placas foram então deixadas “overnight” em agitador de placas, protegidas da luz, tendo, por fim, sua intensidade de absorbância mensurada por espectrofotometria do tipo ELISA (leitor ELISA Elx800, Biotek Instruments) com o filtro de 570nm. Assim, após o “screening” do composto nas linhagens estudadas, foram realizadas análises estatísticas afim de se obter a CI_{50} do composto para cada linhagem estudada.

4.2.3 Análise do conteúdo de DNA e sua distribuição nas fases do ciclo celular por meio de citometria de fluxo

A fluorescência gerada pelo IP no citômetro é diretamente proporcional a quantidade de DNA na célula, de forma que é possível determinar sua fase no ciclo celular. Isso acontece devido a capacidade do IP, que é um corante catiônico, entrar em células cuja membrana está rompida e de ligar-se ao DNA. Células que possuem o conteúdo de DNA duplicado (G2/M) tendem a emitir uma maior fluorescência, devido a maior captação de IP, enquanto as células hipodiploides (sub-G1) possuem um menor conteúdo de DNA, apresentando menor fluorescência (RICCARDI e NICOLETTI, 2006).

Protocolo experimental:

As células foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 pelo período de 24 horas, em densidade de 1×10^6 células/mL, tendo cada poço um total de 500 μL , com o composto Fistularin 3, considerando sua CI_{50} , $\text{CI}_{50}/2$ e $\text{CI}_{50}/4$ (80, 40 e 20 μM). Após o período de tratamento as células foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e centrifugadas por 500 g por 5 minutos em temperatura ambiente, sendo em seguida lavadas com PBS. Os “pellets” celulares foram ressuspensos em solução de lise da membrana contendo IP (0,1% de citrato de sódio, 0,1% de triton x-100 e Iodeto de propídeo 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 30 min a 4°C de temperatura. Posteriormente, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo modelo FACS Calibur (BD Biosciences), tendo o IP sido excitado pelo laser azul de 488 nm no filtro 585/42 (FL2).

4.2.4 Avaliação da fragmentação do DNA por eletroforese em gel de agarose

Essa técnica consiste na visualização da fragmentação do DNA internucleossomal, devido a redução do seu tamanho a fragmentos menores, permitindo que esses fragmentos se difundam mais rapidamente no gel de agarose. A formação desses fragmentos de DNA está associada a ativação de endonucleases durante o processo de morte celular. Desta forma, essa técnica permite a visualização de danos ao DNA e maior entendimento sobre o tipo de morte causada pelo composto (WIDLAK e GARRARD, 2009; FAHEINA-MARTINS et al., 2012).

Protocolo experimental:

As células foram plaqueadas a 1×10^6 células/mL, tendo um total de 500 μ L por poço, e incubadas em placas de 24 poços a 37°C e 5% de CO₂, com a substância teste por diferentes períodos de tempo, 24, 48 e 72 horas, a concentração de 80 μ M. Após esses períodos, as células foram coletadas e passadas para microtubos de 1,5 mL, centrifugadas por 10 minutos a 500 g e então lavadas com PBS. O precipitado foi ressuscitado em tampão de lise (10mM EDTA, 50mM tris HCl e 0,5% SDS) por 15 minutos a 55°C. Foi adicionado então, às células lisadas, proteinase K (500 μ l/mL) por 1 hora a 55°C, sendo em seguida adicionado RNase (1 μ g/ μ l) a 55°C por 1 hora e meia. O DNA foi então extraído e purificado com 250 μ l de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (24:24:1) por 5 minutos e centrifugado a 5000 g por 5 minutos, a fase orgânica foi descartada e adicionou-se clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) à fase aquosa. Uma nova centrifugação foi realizada e o DNA foi precipitado com 0,1 volume de NaCl (2 M) e 2,5 volume de etanol absoluto por 12 horas, a -20°C. O precipitado foi centrifugado por 10 minutos a 5000 g e dissolvido em solução de tris (10 mM) e EDTA (1 mM). O DNA foi corado com o corante EZ-VISION e então foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1,5%, 70V por 1 hora e meia.

4.2.5 Microscopia de Fluorescência

A partir da utilização de microscópio de fluorescência (Zeiss Axiovision, sistema Zeiss AxioCam HSm de aquisição de imagens, da Carl Zeiss, Alemenha) foram realizados diferentes tipos de avaliações dos efeitos do composto Fistularin 3 em células THP-1 a 5×10^5 células/mL, em que se tinha um total de 200 μ L por poço, no

período de 48 horas e na concentração de 30 μM . Por fim, foram realizadas contagem de células e avaliação da intensidade de fluorescência (quando aplicável) pelo programa ZEN da Zeiss. Essa técnica consiste na visualização ou não da fluorescência gerada por sondas fluorescentes a partir da utilização de filtros correspondentes ao espectro gerado por cada sonda utilizada nos diferentes experimentos. Para todos os experimentos foi utilizada como droga controle o Etoposídeo, com sua concentração correspondente a CI_{50} no período avaliado.

4.2.5.1 Avaliação do potencial da membrana mitocondrial

A tetrametilrodamina, é um corante fluorescente catiônico, que é sequestrado para dentro da membrana quando seu potencial transmembrânico se apresenta inalterado. Desta forma, as células que estão com o potencial transmembrânico inalterado emitem fluorescência mais intensas do corante, enquanto células que apresentam alterações nesse potencial, apresentam menor intensidade de fluorescência, devido ao efluxo deste corante (MESQUITA, 2009).

Protocolo experimental:

As células foram plaqueadas e tratadas com o composto em estudo. Após o tempo de incubação com a substância, as células foram lavadas com PBS e marcadas com o fluoróforo Tetrametilrodamina (TMRM) (5mg de tetrametilrodamina, 200 μl DMSO, solução estoque) a 10 μM , diluída em meio aquecido, por 30 minutos a 37°C no escuro. Passados os 30 minutos, os poços foram lavados e ressuspensos com PBS. A fluorescência foi visualizada e analisada por meio da microscopia de fluorescência, utilizando filtro de 594 nm.

4.2.5.2 Avaliação da produção das espécies reativas de oxigênio (EROS)

A sonda $\text{H}_2\text{-DCFH-DA}$ (2',7' diclorohidrofluoresceína-diacetato) é um composto lipossolúvel, que penetra facilmente a célula e é hidrolisada enzimaticamente por esterases intracelulares, formando, então, o DCFH não fluorescente. Na presença de EROs, esse composto é rapidamente oxidado e convertido em DCF (2',7'-diclorofluoresceína), tornando-se fluorescente e insolúvel em meio lipídico, de forma que se mantém no ambiente intracelular, indicando se o composto em estudo promove alterações nos níveis de EROs (KALYANARAMAN et al. 2012).

Protocolo experimental:

As células foram semeadas em placas de 96 poços e foram incubadas com a substância teste. Passado o período de exposição a droga, as células foram lavadas com PBS e marcadas com 10 μ M H₂-DCFH-DA (2',7' diclorohidrofluoresceína-diacetato) por 30 minutos, no escuro a 37°C. As células foram, novamente, lavadas com PBS e a sua fluorescência foi medida e analisada por meio da microscopia de fluorescência, utilizando filtro de 480 nm.

4.2.5.3 Avaliação da presença de organelas vesiculares ácidas (AVOs) como indicador da autofagia

O composto laranja de acridina é um fluoróforo básico de coloração verde, que penetra facilmente a membrana celular devido as suas características lipofílicas. Esse corante, após penetrar a célula, pode ser facilmente protonado e retido em organelas vesiculares ácidas, passando a emitir fluorescência vermelha. Essa mudança na cor da fluorescência é dependente de concentração, de forma que essa técnica pode ser utilizada para inferir o volume de organelas vesiculares ácidas, que aumentam devido a indução autofágica (THOMÉ et al., 2016).

Protocolo experimental:

As células foram incubadas e após o período de exposição ao composto, as células foram lavadas com PBS, centrifugadas a 500 g por 5 minutos e o sobrenadante foi retirado. O pellet foi resuspenso em 100 μ l de solução de laranja de acridina (LA) (1 μ g/mL) diluída em PBS, por 30 minutos em temperatura ambiente e no escuro. Passados os 30 minutos, as células foram lavadas com PBS e levadas para serem analisadas por microscopia de fluorescência, nos filtros 480 nm e 540 nm.

4.2.5.4 Avaliação da apoptose por meio da externalização da fosfatidilserina e apoptose tardia por marcação com iodeto de propídeo (IP)

A anexina possui a propriedade biológica de ligação aos fosfolipídeos, como a fosfatidilserina, de forma que com externalização da mesma, facilmente a anexina se liga a ela. Esse composto está associado ao fluorocromo FITC, que é o responsável pela emissão da fluorescência quando ocorre a associação da anexina com a

fosfatidilserina. O IP, por outro lado, apenas emite fluorescência quando consegue penetrar a célula e se ligar ao seu material genético, porém, isto só é possível quando a membrana plasmática se encontra rompida, caracterizando o processo de necrose. Células que apresentam dupla marcação para anexina e IP, caracterizam o processo de apoptose tardia, em que a membrana plasmática já se encontra danificada (BRAUCHLE et al., 2013; YOO et al., 2013; PIETKIEWICZ et al., 2015).

Protocolo experimental:

As células foram incubadas em placas de 96 poços na concentração de 5×10^5 células/poço com o composto Fistularin 3, por 48 horas. Após esse período, as células foram lavadas com PBS, ressuspensas em tampão de ligação (100 μ l) e então marcadas com 1 μ l de Anexina V-Alexafluor kit (*Invitrogen*, USA) por 15 minutos no escuro, e então foi adicionado 1 μ l do IP. As células foram lavadas e levadas para análise em microscopia de fluorescência.

4.3 Análises estatísticas

4.3.1 Ensaio de redução do MTT

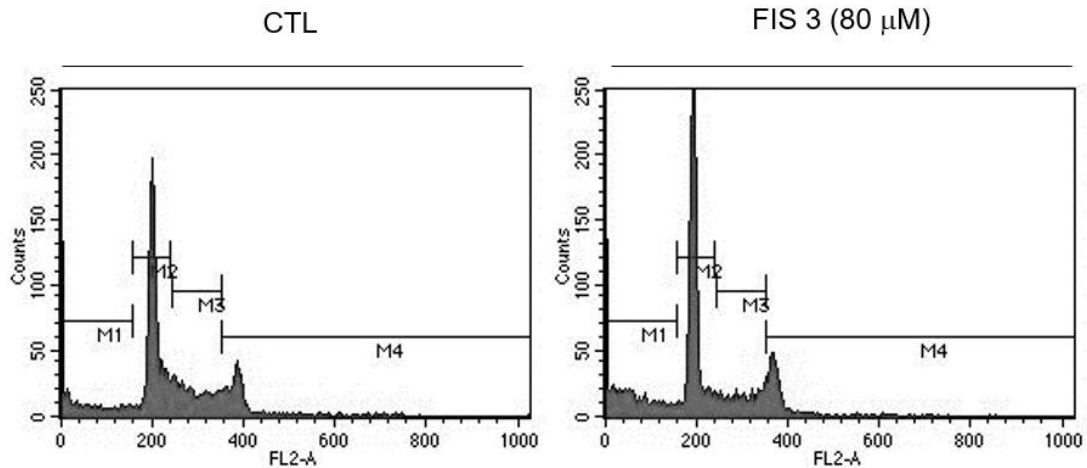
Foram realizadas análises estatísticas utilizando o software *GraphPad Prism* na versão 6.0 para obtenção dos resultados referentes a CI_{50} do composto Fistularin 3 nas diferentes linhagens cancerígenas e não cancerígenas, a partir de três experimentos independentes, em triplicata das diferentes concentrações testadas, utilizando curva de regressão não linear.

4.3.2 Análise dos dados de citometria de fluxo

Foram realizados dois experimentos de avaliação do ciclo celular, independentes e em duplicata, por citometria de fluxo utilizando o equipamento Citômetro FACS Calibur (BD Biosciences), onde no momento da leitura das amostras com auxílio do software *BD CellQuest Pro* 6.0 foram gerados dados de porcentagens referentes ao experimento. Esses dados foram analisados e comparados utilizando o software *GraphPad Prism* 6.0, sendo expressos como média \pm desvio padrão (DP) em seguida comparados por análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Newman-Keuls, em que para se obter diferença estatística foi necessário $p < 0.05$. Na

Figura 5 é possível observar a divisão das fases avaliadas no histograma obtido por meio da técnica de citometria de fluxo.

Figura 5. Histograma representativo do efeito do composto Fistularin 3 na distribuição do DNA no ciclo celular em células THP-1, em que M1 representa a fase SubG1, M2 representa G1, M3 é equivalente a fase S e M4 a fase G2/M.



CTL representa o controle e FIS 3 (80 μ M) o composto Fistularin 3 em sua maior concentração utilizada para esse experimento.

4.3.3 Análises de microscopia de fluorescência

Os dados obtidos pela microscopia de fluorescência de dois diferentes experimentos que foram realizados em duplicata, foram analisados por meio do software *GraphPad prism* 6.0, de forma que foram expressos em média \pm DP em porcentagem/idades arbitrárias (U.A.), analisados por ANOVA, com pós teste Bonferroni, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do efeito citotóxico do composto Fistularin 3

Para avaliar o potencial citotóxico da substância Fistularin 3, foram inicialmente realizados ensaio de MTT, em que as células foram incubadas em diferentes concentrações do composto, afim de se obter a CI_{50} (concentração inibitória de 50% do efeito máximo) em diferentes períodos de tempo.

Desta forma, foi possível observar que a substância apresentou um efeito dependente de tempo e concentração nas linhagens HUVEC, MDA-MB-231 e K562 nos três períodos de tempo estudados e dependência de tempo, em THP-1, até 48 horas de tratamento (**Tabela 1**).

A CI_{50} obtida por esse composto em células de leucemia K562 no período de 24 horas foi de $97,32 \pm 3,64 \mu\text{M}$, sendo de $81,35 \pm 3,23 \mu\text{M}$ em células THP1. Na célula MDA-MB-231 não foi possível se obter a CI_{50} do composto em 24 horas nas concentrações testadas, assim como na célula não cancerígena HUVEC. No período de 48 horas foi observado um decaimento da CI_{50} nas células cancerígenas K562 e THP-1, em que cada uma apresentou as seguintes CI_{50} ; $64,31 \pm 3,06 \mu\text{M}$ e $29,46 \pm 3,01 \mu\text{M}$, respectivamente. O efeito do composto foi visualizado apenas em 72 horas nas células HUVEC, apresentando CI_{50} de $135,20 \pm 3,24 \mu\text{M}$, enquanto nas células cancerígenas foi observada CI_{50} de $68,65 \pm 3,55 \mu\text{M}$ em MDA-MB-231, de $28,66 \pm 3,09 \mu\text{M}$ em K562 e de $36,94 \pm 3,17 \mu\text{M}$ em THP-1, neste mesmo período de tempo.

Tabela 1. Caracterização do efeito citotóxico do composto Fistularin 3 (FIS3) e do Etoposídeo (ETO) nos períodos de 24, 48 e 72 horas, sobre as linhagens HUVEC, MDA-MB-231, THP-1 e K562.

	FIS3			ETO		
	24H	48H	72H	24H	48H	72H
HUVEC	>200	>200	135,20± 3,24	>200	NT	28,76± 3,32
MDA-MB-231	>200	NT	68,65± 3,55	NT	NT	NT
THP-1	81,35± 3,23	29,46 ± 3,01	36,94 ± 3,17	58,76± 3,88	13,41± 4,29	<6,25
K562	97,32± 3,64	64,31 ± 3,06	28,66 ± 3,09	>200	34,24± 3,04	66,00± 3,54

Os dados foram expressos em μM , pela média dos valores de $\text{CI}_{50} \pm$ desvio padrão (DP) de três experimentos em triplicata e foram obtidos utilizando curva de regressão não-linear. NT corresponde aos não testados.

5.2 Avaliação do tipo de morte celular causada pelo composto Fistularin 3 em células de leucemia monocítica aguda (THP-1)

Como é possível observar, a linhagem leucêmica THP-1 foi a que se demonstrou mais sensível ao tratamento com o composto, desta forma, essa linhagem foi escolhida para a realização de diferentes experimentos que pudessem identificar o tipo de morte celular causado pela substância nessas células.

5.2.1 Alterações no ciclo celular de células THP-1 pelo composto Fistularin 3

Para identificar o efeito citotóxico do composto sobre no material genético das células, foi realizada a análise da progressão das células THP-1 nas fases do ciclo celular por meio da avaliação da fluorescência do IP, sendo esta diretamente proporcional a quantidade de DNA nas células, de forma que foi possível indicar,

indiretamente, a fase do ciclo celular em que as células se encontravam durante o tratamento de 24 horas em diferentes concentrações (20, 40 e 80 μM).

Assim, foi possível visualizar que com o aumento da concentração, e proximidade da CI_{50} do composto no período avaliado, há um aumento significativo da porcentagem de células que se encontram na fração hipodiploide (SubG1) do ciclo celular, saindo de $13,59 \pm 2,26\%$ no controle para $33,55 \pm 3,07\%$ na maior concentração testada. Foi observada também uma parada no ciclo celular, devido ao aumento da concentração de DNA na fase G1 de $35,20 \pm 3,42\%$ no controle para $58,19 \pm 11,35\%$ na maior concentração testada. Conseqüentemente, pôde ser observado a redução da concentração de células na fase G2/M de $12,36 \pm 1,75\%$ para $8,13 \pm 1,57\%$ (**Tabela 2**).

Tabela 2. Efeito do composto Fistularin 3 em diferentes concentrações na distribuição do DNA no ciclo celular da linhagem leucêmica THP-1.

Fases	Controle	20 μM	40 μM	80 μM
SubG1	13,59 \pm 2,26	16,30 \pm 2,86	27,67 \pm 7,62*	33,55 \pm 3,07**
G1	35,20 \pm 3,42	59,03 \pm 11,91*	57,00 \pm 7,51*	58,19 \pm 11,35*
S	28,14 \pm 11,03	15,14 \pm 2,57	17,15 \pm 6,61	18,84 \pm 7,49
G2/M	12,36 \pm 1,75	10,73 \pm 1,42	7,78 \pm 2,06*	8,13 \pm 1,57*

Os valores foram expressos em porcentagem (%) \pm DP de dois experimentos em duplicata com dados analisados por meio da análise de variância ANOVA seguido de pós-teste Newman-Keuls, onde *p < 0,05 e **p < 0.01.

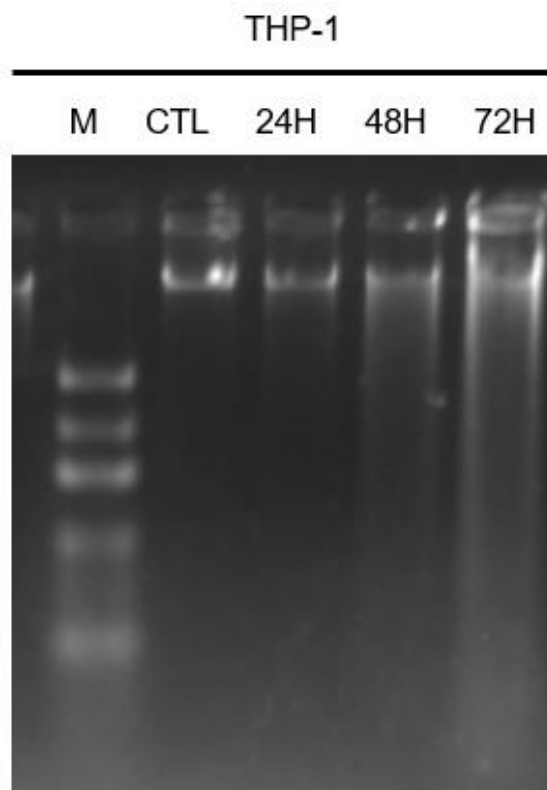
5.2.2 Análise do dano ao DNA causado pelo composto Fistularin 3 em diferentes períodos de tempo nas células THP-1

Após a visualização do aumento na porcentagem de DNA que se encontravam em Sub-G1, foi realizado o experimento de avaliação da fragmentação do DNA por eletroforese em gel de agarose. Esse experimento foi realizado com amostras em

diferentes períodos de incubação (24,48 e 72 horas) com o composto em estudo, utilizando a CI_{50} do composto do primeiro período tempo.

Com esse experimento, foi possível observar que a partir de 48 horas de tratamento, houve um aumento da fragmentação do DNA, sendo essa fragmentação mais visível no período de 72 horas de tratamento, indicando que os danos causados pela substância ao DNA de células THP-1 são tempo-dependentes (**Figura 6**).

Figura 6. Avaliação da fragmentação do DNA causada pelo composto Fistularin 3 em células THP-1, por eletroforese.



M representa o marcador, CTL o controle, 24H, 48H e 72H representam os períodos de tempo em que as células foram expostas a substância teste.

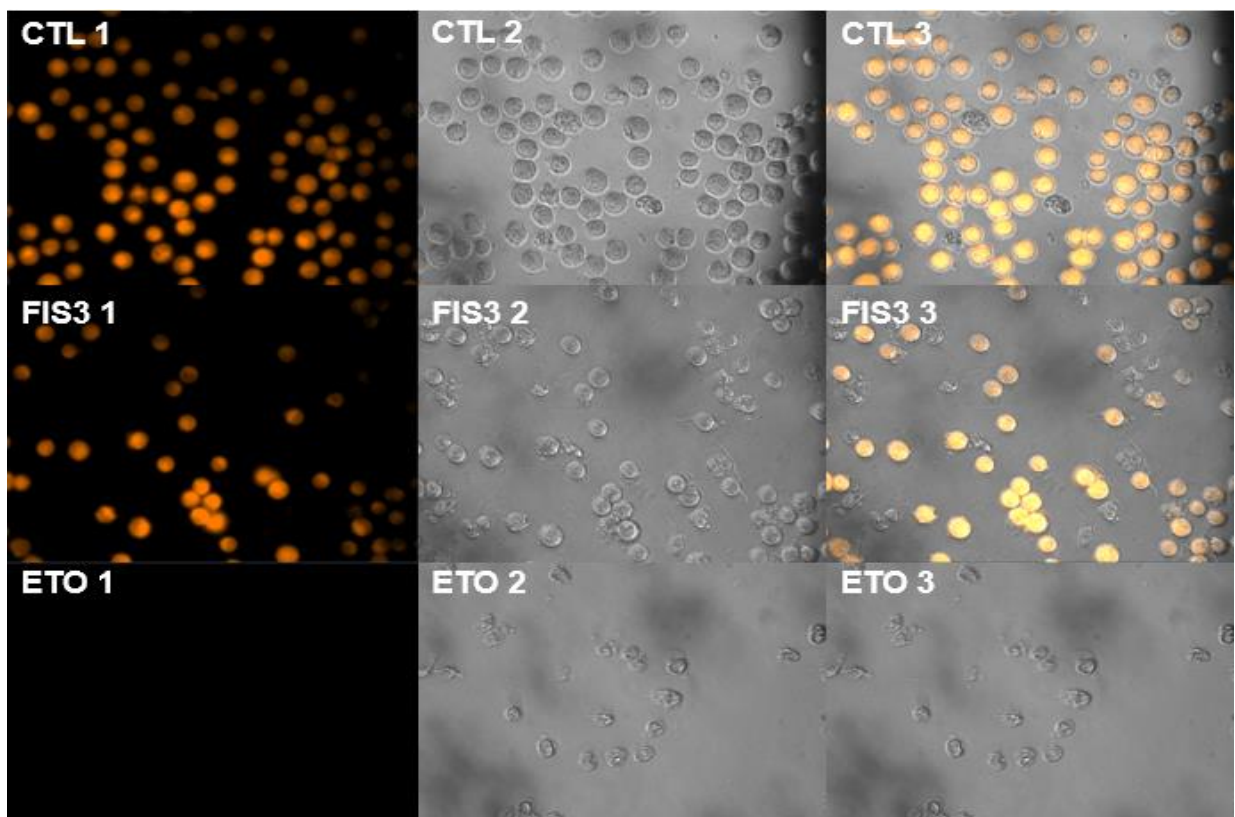
5.2.3 Determinação dos efeitos do composto Fistularin 3 no potencial da membrana mitocondrial de célula THP1

Com a finalidade de melhor entendimento do mecanismo de ação da substância estudada em células THP-1, foi avaliado se seu efeito citotóxico poderia estar relacionado com o evento bioquímico de perda do potencial da membrana mitocondrial. Devido a visualização de maior fragmentação do DNA a partir do período

de 48 horas, esse tempo de tratamento foi escolhido para realização dos experimentos de microscopia de fluorescência.

A representação dos dois experimentos realizados e da fluorescência emitida pelo composto em estudo, seu controle positivo e pelo controle sem tratamento podem ser visualizados na **Figura 7**.

Figura 7. Imagem de microscopia de fluorescência representativa dos dois experimentos em duplicata realizados com o objetivo de avaliar a despolarização mitocondrial.

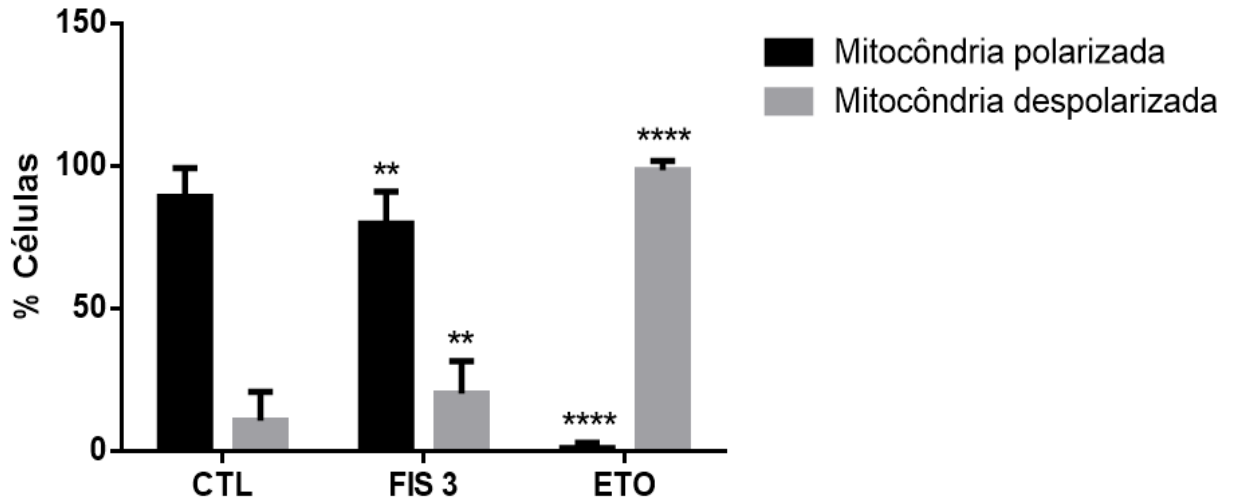


As imagens foram obtidas a partir do microscópio de fluorescência ZEISS, e as análises realizadas pelo programa acoplado ZEN. Na coluna 1 (CTL, FIS3, ETO) é observada a fluorescência em laranja, na segunda coluna, seguindo a mesma configuração, é observada a imagem das células sem fluorescência e na coluna 3, temos a sobreposição das duas imagens anteriores

Assim, com esse experimento, foi possível visualizar que no tratamento de 48 horas, o composto Fistularin 3 causa $20,24 \pm 11,32$ % de despolarização mitocondrial, 1,8 vezes a mais do que foi visualizado no controle, que foi $10,74 \pm 10,07$ %. O Etoposídeo foi utilizado como controle positivo, apresentando, assim, alta porcentagem de

despolarização mitocondrial, cerca de $98,53 \pm 3,26\%$, 9,1 vezes a mais do que foi visualizado no controle (**Figura 8**).

Figura 8. Avaliação da porcentagem % de células que apresentaram potencial de membrana mitocondrial polarizado e despolarizado.

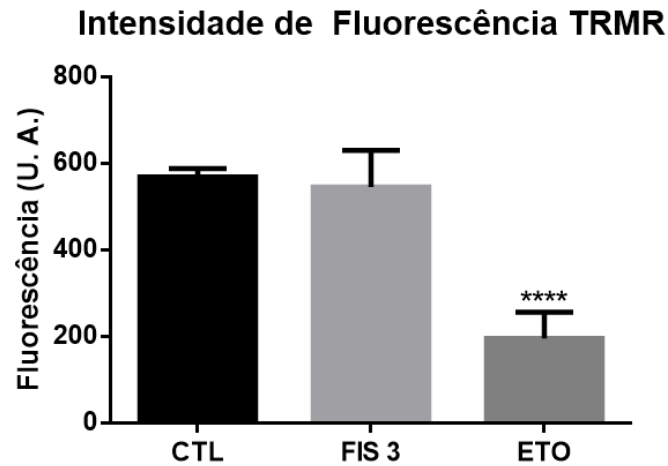


Os dados correspondem a média \pm DP em porcentagem de dois experimentos em duplicata, analisados por ANOVA, seguido de pós-teste Bonferroni, onde $**p < 0.01$ e C. CTL representa o controle, FIS 3 o composto Fistularin 3, e ETO o Etoposídeo, droga utilizada como controle positivo.

Outro parâmetro analisado foi a intensidade da fluorescência emitida pelas células que apresentaram a internalização do corante catiônico fluorescente TMRM. A fluorescência emitida por esse corante é inversamente proporcional à despolarização mitocondrial, de forma que a diminuição na intensidade de fluorescência, pode indicar o aumento da despolarização mitocondrial.

Desta forma, pôde ser visualizado que não há diferença estatística entre a intensidade emitida pelas células do controle, que foi de $596 \pm 87,30$ U.A. e a intensidade de fluorescência que foi emitida pelas células que foram tratadas com o composto Fistularin 3 de $545,7 \pm 84,43$ U.A., ao contrário do que pode ser visualizado no tratamento com o Etoposídeo, em que houve uma redução da intensidade de fluorescência da TRMR para $195,9 \pm 60,48$ (**Figura 9**).

Figura 9. Avaliação da intensidade de fluorescência TRMR emitida por células THP-1 nos três diferentes grupos avaliados.



Os dados correspondem a média \pm DP em unidades arbitrárias (U.A.) de dois experimentos em duplicata, analisados por ANOVA, seguido de pós-teste Bonferroni, onde **** $p < 0,0001$.

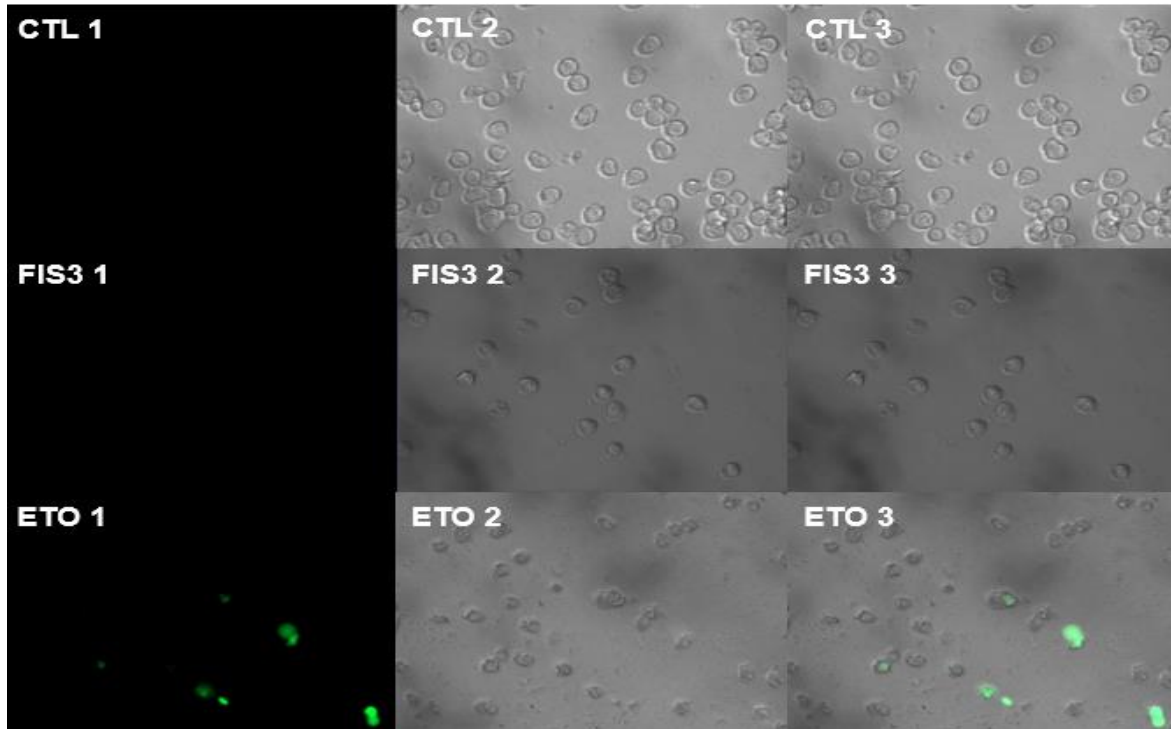
5.2.4 Determinação da influência da substância Fistularin 3 na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células THP-1

As EROs possuem um importante papel nas cascatas de sinalização intracelular que desencadeiam a iniciação de mecanismos de morte celular. Essas espécies podem causar alterações na homeostase do cálcio intracelular devido ao seu aumento, de forma que esses íons são liberados para o retículo endoplasmático e outros estoques, causando a permeabilização da membrana mitocondrial e ativando a via intrínseca de morte celular. A geração de EROS também pode ser uma consequência do processo apoptótico devido à despolarização da mitocôndria e consequente diminuição da fosforilação oxidativa, de forma a aumentar os níveis de EROs (SABHARWA e SCHUMACKER, 2014; MA et al., 2017).

Desta forma, na **Figura 10** é possível observar a imagem representativa dos dois experimentos realizados em duplicata da presença de EROS em células THP-1. Foi, então, avaliada a presença desses componentes nas células THP-1 tratadas com o composto Fistularin 3, afim de se avaliar as influências dessas espécies na citotoxicidade causada pelo composto. Foi observado que as EROs não possuem uma grande influência no efeito citotóxico do composto, de forma que foram encontradas

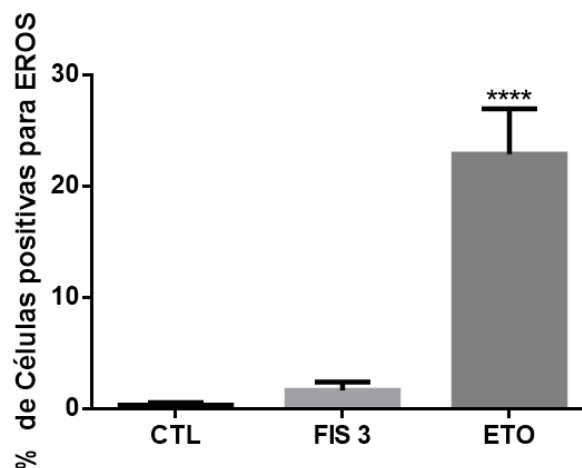
apenas $1,67 \pm 3,32$ % de células marcadas com o H₂-DCFH-DA, não apresentando diferença estatística em relação ao controle (**Figura 11**).

Figura 10. Imagem de microscopia de fluorescência representativa dos dois experimentos em duplicata realizados com o objetivo de avaliar a presença de EROs.



As imagens foram obtidas a partir do microscópio de fluorescência ZEISS, e as análises realizadas pelo programa acoplado ZEN. Na coluna 1 (CTL, FIS3, ETO) é observada a fluorescência em verde, demonstrando a presença ou não de EROs, na segunda coluna, seguindo a mesma configuração, é observada a imagem das células sem fluorescência e na coluna 3, temos a sobreposição das duas imagens anteriores.

Figura 11. Avaliação da porcentagem % de células que se apresentaram positivas para a presença de EROS.

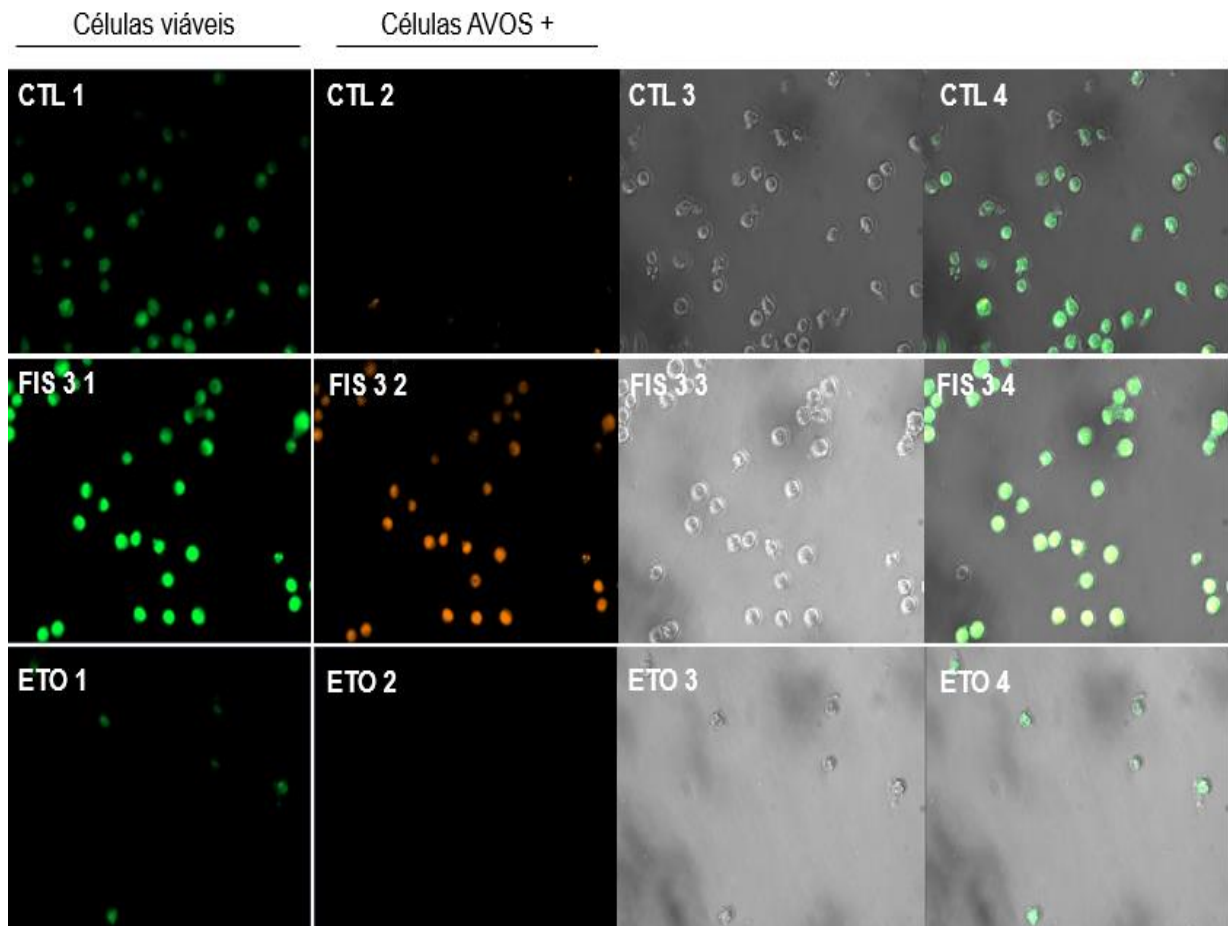


Os dados correspondem a média \pm DP em porcentagem de dois experimentos em duplicata, analisados por ANOVA, seguido de pós-teste Bonferroni, onde **** $p < 0,0001$.

5.2.5 Determinação da indução de autofagia pelo composto Fistularin 3 em células THP-1

Por meio da utilização do fluoróforo LA, foi avaliada a presença de organelas vesiculares ácidas, que são indicadores de autofagia, devido a sua formação durante esse processo, surgindo por meio da junção de autofagossomos com o lisossomo.

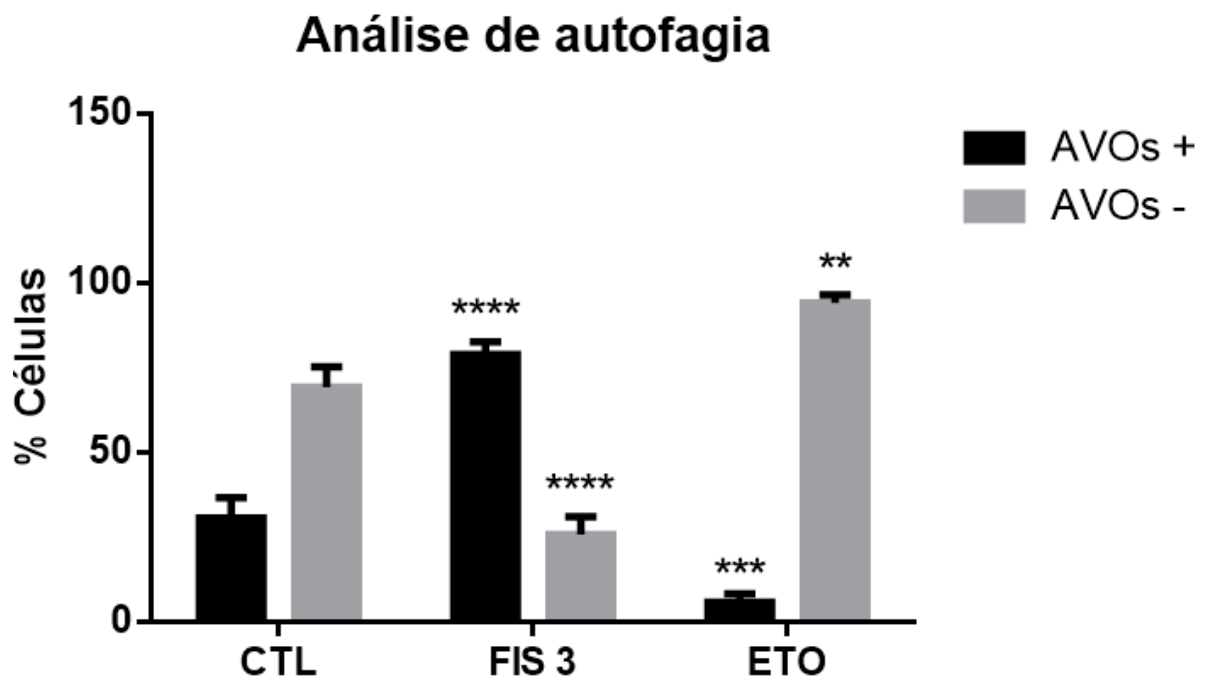
Figura 12. Imagem de microscopia de fluorescência representativa dos dois experimentos em duplicata realizados com o objetivo de avaliar a presença de AVOS como indicativo de autofagia.



As imagens foram obtidas a partir do microscópio de fluorescência ZEISS, e as análises realizadas pelo programa acoplado ZEN. Na coluna 1 (CTL, FIS3, ETO) é observada a fluorescência em verde, demonstrando a viabilidade das células, na segunda coluna, seguindo a mesma configuração, é observada, em laranja a fluorescência do fluoróforo LA, na terceira coluna pode-se observar a imagem das células sem fluorescência e na coluna 4, temos a sobreposição das três imagens anteriores.

Com esta técnica pôde ser observado que o composto Fistularin 3 induz a autofagia em células THP-1, tendo $78,94 \pm 3,80$ % de células positivas para a presença de AVOs e $25,81 \pm 5,25$ % de células negativas, apresentando 48,22 % a mais de células em autofagia em relação ao controle, que apresentou $30,72 \pm 6,00$ % células positivas, e $69,27 \pm 6,05$ % negativas. O Etoposídeo apresentou $94,16 \pm 2,43$ % de células negativas para a presença de AVOs e $5,83 \pm 2,43$ % de células positivas (Figura 13).

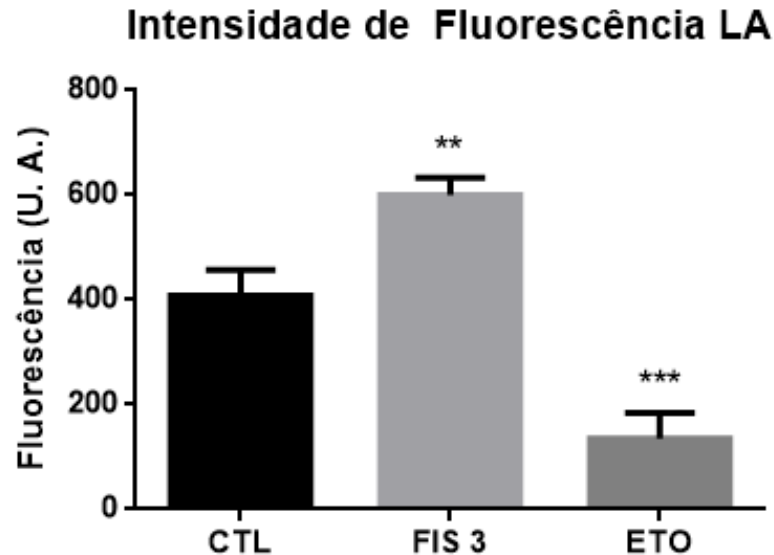
Figura 13. Avaliação da porcentagem % de células que apresentaram presença ou não de organelas vesiculares ácidas.



Os dados correspondem a média \pm DP em porcentagem de dois experimentos em duplicata, analisados por ANOVA, seguido de pós-teste Bonferroni, onde ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

Também foi avaliada a intensidade da fluorescência do fluoróforo LA, devido ao aumento de sua fluorescência estar associado ao aumento de AVOs na célula, sendo assim, um maior indicativo de autofagia. O composto Fistularin 3 apresentou intensidade de fluorescência de $600,6 \pm 32,17$ U.A. enquanto o controle apresentou $408,6 \pm 48,14$ U.A. e o Etoposídeo uma intensidade de apenas $135,7 \pm 48,83$ U.A. (Figura 14).

Figura 14. Avaliação da intensidade de fluorescência LA emitida por células THP-1 nos três diferentes grupos avaliados



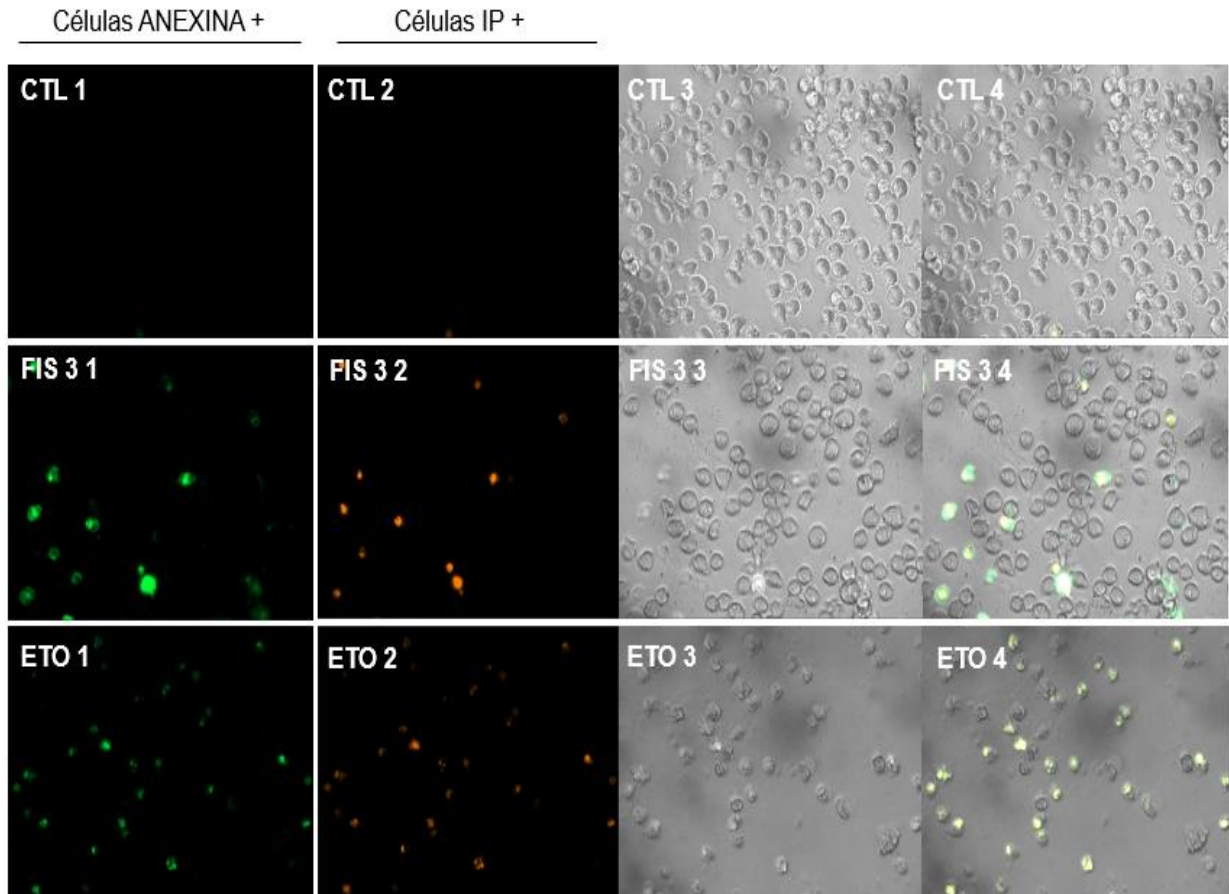
Os dados correspondem a média \pm DP em unidades arbitrárias (U.A.) de dois experimentos em duplicata, analisados por ANOVA, seguido de pós-teste Bonferroni, onde ** $p < 0.01$ e *** $p < 0,001$.

5.2.6 Determinação da indução do composto Fistularin 3 na externalização de fosfatidilserina

Essa técnica permite a identificação de células viáveis, células em processo de apoptose precoce, marcadas apenas com anexina V, ou apoptose tardia, células marcadas com IP e anexina V, e de células em processo de necrose, marcadas apenas com IP. A anexina V se acopla a fosfatidilserina quando esta se encontra externalizada, sendo um indicativo de apoptose, e o IP apenas consegue se internalizar na célula, quando esta possui a membrana plasmática danificada.

Na **Figura 15** podemos observar a imagem representativa dos dois experimentos em duplicata, realizados com a finalidade de avaliar a capacidade de indução à apoptose pelo composto em estudo.

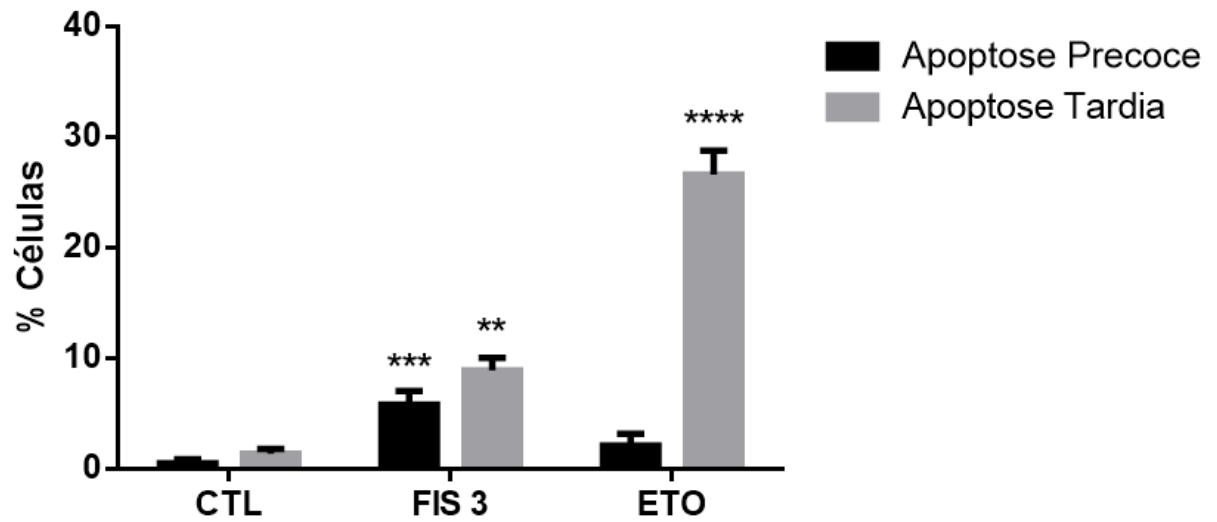
Figura 15. Imagem de microscopia de fluorescência representativa dos dois experimentos em duplicata realizados com o objetivo de avaliar indução do composto Fistularin 3 a apoptose tardia e precoce em células THP-1.



As imagens foram obtidas a partir do microscópio de fluorescência ZEISS, e as análises realizadas pelo programa acoplado ZEN. Na coluna 1 (CTL, FIS3, ETO) é observada a fluorescência em verde, demonstrando as células marcadas com anexina V, na segunda coluna, seguindo a mesma configuração, é observada, em laranja as células marcadas com IP, na terceira coluna pode-se observar a imagem das células sem fluorescência e na coluna 4, temos a sobreposição das três imagens anteriores.

Assim, foi possível visualizar que o composto Fistularin 3 induziu a apoptose precoce $5,83 \pm 1,22$ % e a apoptose tardia em $8,90 \pm 1,15$ %, apresentando um aumento significativo em relação ao controle, que apresentou $0,52 \pm 1,5$ % de apoptose precoce e $1,39 \pm 1,95$ % de apoptose tardia. O Etoposídeo apresentou, principalmente, maior porcentagem de células em apoptose tardia, com o equivalente a $26,60 \pm 9,77$ % de células, e cerca de $2,10 \pm 1,08$ % de apoptose precoce (**Figura 16**).

Figura 16. Avaliação da porcentagem % de células marcada para apoptose precoce e apoptose tardia.



Os dados correspondem a média \pm DP em porcentagem de dois experimentos em duplicata, analisados por ANOVA, seguido de pós-teste Bonferroni, onde $**p < 0.01$, $***p < 0,001$ e $****p < 0,0001$.

6 DISCUSSÃO

Um dos maiores problemas relacionados ao tratamento do câncer está na toxicidade sistêmica causada pelos fármacos ao organismo, isso se dá principalmente pela falta de seletividade de diversos compostos utilizados atualmente para esse tratamento. Assim, esses fármacos podem levar a sobrevida dos pacientes com câncer, mas aumentar a morbidade e mortalidade por outros fatores, devido aos seus efeitos colaterais. Essa falta de seletividade, muitas vezes está relacionada ao mecanismo de ação do fármaco não reconhecer apenas as células neoplásicas, sendo tóxicos para diversos tipos de células do corpo. Um exemplo disso está na alta cardiotoxicidade causada por diversas drogas existentes hoje no mercado, que resultam no desenvolvimento de doenças cardiovasculares (HOLOHAN et al., 2013; HE et al., 2014; ZAMORANO et al., 2016).

Pode-se observar, então, que a seletividade de um composto às células cancerígenas é uma das principais características buscada na prospecção de tratamentos mais eficientes para o combate a esta doença. Os compostos naturais têm mostrado maior eficácia quanto a essa característica em relação aos compostos sintéticos, de forma que o estudo dessas substâncias pode levar a fabricação de novos fármacos mais eficazes (CHINEMBIRI et al., 2014; NICACIO et al., 2017).

Nesse contexto foram realizados experimentos de avaliação dos efeitos citotóxicos do composto natural de origem marinha Fistularin 3 na viabilidade celular de células cancerígenas (K562, THP-1 e MDA-MB-231) e não cancerígenas (HUVEC), por meio do método de redução do MTT. Foi possível visualizar, a partir desta técnica, que o composto apresentou seletividade em relação às células neoplásicas, não possuindo efeito até a maior concentração testada (200 μM) na linhagem não cancerígena HUVEC nos períodos de 24 e 48 horas, e apresentando elevada CI_{50} de $135,20 \pm 3,24 \mu\text{M}$ no período de 72 horas.

Sendo assim o composto pode ser considerado seletivo para todos os períodos de tempo, devido a sua CI_{50} encontrada para 72 horas ser quase quatro vezes maior do que aquela que foi encontrada para o mesmo período de tempo em THP-1, $36,94 \pm 3,17 \mu\text{M}$, quase cinco vezes maior do que a que foi encontrada em células K562,

28,66 ± 3,09 µM, e quase duas vezes a encontrada em células MDA-MB-231, 68,65 ± 3,55 µM (**Tabela 1**).

Pode ser visualizado, também, que a partir do período de 24 horas o composto já apresentou efeito citotóxico nas células leucêmicas K562 e THP-1, e que seu efeito em K562 foi tempo dependente, de forma que foi observada maior citotoxicidade do composto em 72 horas. Para THP-1, o efeito também se demonstrou tempo dependente de 24 a 48 horas, tornando-se mais citotóxico em 48 horas. Porém de 48 a 72 horas, não foi visualizada redução da CI_{50} .

O controle positivo utilizado nesse estudo, a droga Etoposídeo, também se apresentou seletivo no período de 24 horas, não apresentando efeito na maior concentração testada em HUVEC. Porém, no período de 72 horas esse composto se demonstrou mais citotóxico para essas células, além de não ter se apresentado seletivo para células K562, sendo sua CI_{50} cerca de 2,3 vezes menor para a linhagem HUVEC em relação ao que se pode visualizar na linhagem de leucemia mielóide crônica.

Desta forma, a Fistularin 3 se mostrou menos citotóxica para a linhagem não cancerígena, em relação a droga controle, além de ter se apresentado seletivo para todas as linhagens, ao contrário do que foi visto com o Etoposídeo.

Com esses resultados foi possível visualizar que a célula leucêmica THP-1 foi a que apresentou maior sensibilidade em relação ao tratamento com o composto Fistularin 3. Assim, foram realizados experimentos que puderam elucidar o mecanismo de morte celular ativado por esse composto nesta linhagem.

A avaliação dos efeitos de um determinado composto em relação ao ciclo celular de uma célula é um dos pontos chaves na determinação do mecanismo de ação dessa substância. A parada no ciclo celular, em células não cancerígenas, na fase G1 pode prevenir a replicação de um DNA que apresente danos, alterações e até mutações, enquanto a parada do ciclo na fase G2 permite que a célula evite a segregação de cromossomos defeituosos. Quando há uma maior concentração do DNA na fase SubG1, há a indicação de fragmentação do DNA, indicando que ocorreram danos irreversíveis a esse material genético, ou seja, que não puderam ser reparados. No caso do câncer, as células entram em crescimento de forma

desordenada, fazendo com que haja o acúmulo progressivo de mutações nesse material genético, assim, drogas que atuem de forma a impedir a divisão celular dessas células ou que causem danos irreversíveis ao DNA, são imprescindíveis no tratamento de neoplasias (AGAMI e BERNARDS, 2000; ESCRIBANO-DÍAZ et al., 2013; HONG et al., 2014; ZHANG et al., 2015).

Na literatura, as substâncias da mesma classe da Fistularin 3, os alcaloides derivados de esponjas marinhas, possuem diversos efeitos anticâncer relatados, como a capacidade da substância Ranieramycin M induzir apoptose via p53-dependente, inibindo assim, a progressão das células cancerígenas de câncer de pulmão não pequenas, atuando por meio do aumento de DNA na fase SubG1 do ciclo celular. Outras substâncias, como a Kuanoniamines A, possuem forte mecanismo de inibição do ciclo celular em G2/M em células MCF-7 (ESSACK et al., 2011; DYSHLOVOY et al., 2015)

Desta forma, foi avaliado o efeito da substância Fistularin 3 no ciclo celular de células THP-1 por meio do experimento de análise da fluorescência do IP por citometria de fluxo. Pôde-se observar que no tratamento de 24 horas, com o aumento da concentração da substância, há também o aumento do número de células na fração hipodiploide do ciclo celular (SubG1) de $13,59 \pm 2,26\%$ no controle para $33,55 \pm 3,07\%$ na maior concentração testada, indicando que o composto causa danos irreversíveis ao DNA destas células. Também foi visualizado o aumento da porcentagem de células na fase G1 do ciclo de $35,20 \pm 3,42\%$ no controle para $58,19 \pm 11,35\%$ na maior concentração testada, e consequente diminuição do número de células G2/M, indicando que com o aumento da concentração da substância, há uma maior parada no ciclo celular, impedindo a replicação e proliferação dessas células. Esse resultado apresenta um perfil semelhante aquele que foi observado na literatura, em relação aos alcaloides derivados de esponjas marinhas.

A fragmentação do DNA é um processo celular relacionado a morte celular programada, em que devido ao sofrimento de danos irreversíveis ao material genético, estresse oxidativo ou até mesmo a inibição aos fatores de crescimento, essa via de morte celular é ativada. Essa fragmentação pode ser observada nas fases finais do processo apoptótico, quando um segundo grupo de proteínas pró-apoptóticas, AIF, endonuclease G e S é liberado pela mitocôndria. Essas proteínas podem ser

translocadas para o núcleo celular e então causarem a fragmentação do DNA (LEPRÊTRE et al., 2013; ZHDANOV et al., 2015; ROOS et al., 2016).

Nesse contexto e devido aos resultados anteriores que demonstraram o aumento do número de células em SubG1 do ciclo celular, foi realizado o experimento de extração e análise de fragmentação do DNA por meio da eletroforese em gel de agarose, em diferentes períodos de tempo (24, 48 e 72 horas) com a finalidade de observar se há indução a fragmentação do DNA pelo composto Fistularin 3.

Foi possível observar que a partir de 48 horas há um maior arraste do DNA no gel de agarose, sendo possível observar uma fragmentação mais visível no período de 72 horas. Indicando que o composto causa danos irreversíveis ao DNA de células THP-1 a partir do tratamento de 48 horas, sendo dependente de tempo.

A partir desses resultados, o período de 48 horas foi selecionado para a avaliação dos possíveis mecanismos de morte celular induzidos pelo composto em estudo.

Como já foi citado, a despolarização da mitocôndria é um processo diretamente ligado a via de morte celular por apoptose, de forma que o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial e a liberação do citocromo c, faz com que haja a geração de estresse oxidativo intracelular. A perda do potencial de membrana faz com que a mitocôndria permita a redistribuição de solutos como o NAD^+ e NADH para o citosol. No estresse oxidativo que pode levar a formação dos poros mitocondriais, as espécies reativas de oxigênio que conseguem chegar ao núcleo celular, podem causar danos ao DNA e levarem a ativação de poli(ADP-ribose) polimerase (PARP), que normalmente está envolvida com o reparo ao DNA, porém, nessas condições PARP ativada consome NAD^+ citosólico ou mitocondrial, o que causa a paralisação da glicólise e crise bioenergética letal para células. Horas após o início desse processo, há também a ruptura da membrana mitocondrial externa (SABHARWA e SCHUMACKER, 2014; SU et al., 2015; ROOS et al., 2016).

Desta forma, foi realizado o experimento por microscopia de fluorescência para avaliar a porcentagem de células que apresentavam o potencial de membrana alterado. Foi possível visualizar que o composto Fistularin 3 causou $20,24 \pm 11,32 \%$

de despolarização mitocondrial, 9,5% a mais do que foi visualizado no controle, ao contrário do Etoposídeo, que apresentou $98,53 \pm 3,26\%$.

A intensidade da fluorescência também foi medida nesse experimento, devido a diminuição de sua fluorescência corresponder ao aumento da despolarização mitocondrial. Não foram observadas diferenças estatísticas entre a intensidade de fluorescência emitida pelas células do controle e pelas células que foram tratadas com a Fistularin 3. Ao contrário do Etoposídeo, que apresentou considerável redução de sua fluorescência, em relação ao controle.

Assim, pode-se observar que o Etoposídeo, em THP-1, induz a alteração do potencial de membrana da mitocôndria, porém, isso não pôde ser visualizado com o composto Fistularin 3 que apresentou baixa depolarização mitocondrial. Desta forma, pode-se inferir que o principal tipo de morte celular causado pelo composto não é por via de indução e alterações no potencial da membrana da mitocôndria.

Em condições normais, as espécies reativas de oxigênio podem apresentar um importante papel na sinalização celular que desencadeia a iniciação da morte celular por apoptose. Porém em condições patológicas, o aumento de EROS pode contribuir para a geração de danos ao DNA, levando a uma conseqüente progressão ao câncer. Essas espécies podem causar a despolarização da mitocôndria, e também podem ter seu aumento intracelular como conseqüência dessa alteração de membrana. O aumento das EROs também pode ser relacionado ao mecanismo de ação de fármacos, por meio da sensibilização celular a terapias devido ao estresse adicional imposto a célula, ou a própria ação excessiva de danos ao DNA (AHMAD et al., 2013; SABHARWA e SCHUMACKER, 2014; MA et al., 2017).

Assim, a presença de EROs foi avaliada em células THP-1, com a finalidade de avaliar se essas espécies estão relacionadas a citotoxicidade causada pelo composto em estudo. Corroborando com os resultados anteriores de análise da porcentagem de células apresentando despolarização mitocondrial, foi possível observar que as EROs não apresentam grande influência no efeito citotóxico do composto, de forma que apenas $1,67 \pm 3,32\%$ foram marcadas positivamente para a presença de EROs. Sendo assim, pode-se observar que o estresse oxidativo não está relacionado ao tipo de morte celular causado pelo composto, ao contrário do que foi

visualizado no etoposídeo. Esse resultado corrobora com o que foi visto no experimento de despolarização mitocondrial, já que o aumento de espécies reativas de oxigênio pode causar a despolarização mitocondrial, ou ser uma consequência dessa alteração no potencial de membrana mitocondrial (MA et al., 2017).

Após a observação de que o estresse oxidativo e a ativação da via intrínseca da apoptose não estão relacionadas ao efeito citotóxico do composto, foi realizado o experimento de avaliação da presença de AVOs nas células, que são indicativos de autofagia.

Diversos alcaloides de origem marinha também demonstraram alta capacidade de induzir morte por autofagia em células cancerígenas. Um exemplo, é a Monanchocidin A (MonA) que em células de câncer de próstata e de bexiga, levou a formação de organelas vesiculares ácidas, indicando autofagia e teve seu efeito citotóxico inibido quando encubado com o composto inibidor de autofagia 3-metiladenina. O esteroisômero da Fistularin 3, o Isofistularin-3 também pode ser considerado um indutor de autofagia em células de linfoma de Burkitt (RAJI) (ESSACK et al., 2011; FLOREAN et al., 2016; DYSHLOVOY et al., 2015).

Outra substância que atualmente está sendo bastante relacionada a esse tipo de morte celular, é a Ivermectin, que é derivada da droga antiparasitária Avermectin. Esse composto demonstrou a capacidade de indução a autofagia em células de câncer de mama, por meio da inibição da expressão de PAK1 (p21 [RAC1] quinase 1 ativada), sendo seu efeito citotóxico relacionado à autofagia citostática apoptose (WANG et al., 2017).

A autofagia, como já foi citado, é um processo de degradação e renovação dos componentes citoplasmáticos, sendo essencial para o crescimento e sobrevivência celular. Esse processo possui uma relação complexa com a apoptose, de forma que em ativação de mecanismos de recuperação dos componentes citoplasmáticos, a autofagia pode inibir os mecanismos de apoptose, porém também é relatado que em alguns casos a autofagia pode influenciar na ativação da apoptose por meio da indução da ativação da caspase-8 e depleção de inibidores apoptóticos endógenos. Porém esse processo, após ser estimulado por fármacos, por exemplo, pode gerar um mecanismo de morte celular, em que não ocorre a ativação de outros mecanismos

de morte, e sim a superativação da autofagia (SU et al., 2015; WHITE, 2015; REPSOLD et al., 2017).

Foi observado, então, que a autofagia possui um importante papel nos mecanismos de citotoxicidade causados pelo composto, assim como em outros compostos alcaloides de origem marinha, de forma que pôde ser observado quase 50% a mais de células positivas para a autofagia em relação ao que pôde ser visualizado no controle. O aumento da fluorescência do fluorocromo LA nas células, indica que há uma maior quantidade de AVOs intracelulares, sendo assim um indicativo de um processo de autofagia mais intenso. Com isso, foi possível observar também que a intensidade de fluorescência foi significativamente maior nas células tratadas com o composto Fistularin 3 do que pôde ser visualizado no controle e no etoposídeo. Este último apresentou baixo número de células positivas para autofagia e baixa fluorescência.

Por fim foi determinado a influência do composto Fistularin 3 sobre a indução a apoptose em células THP-1. A apoptose em seus estágios precoces apresenta a externalização da fosfatidilserina, porém não se pode visualizar danos ou rompimento da membrana nesses estágios, essa é uma característica das células apoptóticas tardias, em que a apoptose se apresenta em seus estágios finais, onde já pode ser observado, outros fatores, como o rompimento da membrana externa mitocondrial, a fragmentação do DNA e redução significativa do volume celular (CASTROGIOVANNI et al., 2017; HEIDEN e DEBERARDINIS, 2017).

Foi possível observar, então que o composto Fistularin 3 induziu cerca de $5,83 \pm 1,22$ % de apoptose precoce e a $8,90 \pm 1,15$ % de apoptose tardia, sendo esses valores significativos em relação ao controle, porém pode-se visualizar que essa não é a principal via de morte causada pelo composto, A substância controle positivo Etoposídeo, que gerou cerca de $26,60 \pm 2,18$ % de apoptose tardia e $2,10 \pm 1,08$ % de apoptose precoce, enquanto o controle apresentou $1,39 \pm 1,95$ % de apoptose tardia e $0,52 \pm 1,5$ % de apoptose precoce.

Esse resultado pode ser relacionado com os dados obtidos em relação a indução a autofagia pelo composto Fistularin 3, corroborando com o que pode ser visualizado na literatura, que quando o mecanismo de morte por autofagia é ativado,

pode-se observar a redução ou inativação de outros mecanismos de morte celular, como a apoptose. Assim, o mecanismo de ação desse composto também pode ser relacionado ao efeito citotóxico da autofagia, em ao contrário do efeito citostático não há apenas a parada do ciclo celular e consequente inibição do crescimento celular, e sim a indução a morte celular, sendo essa, principalmente, independente de apoptose.

7 CONCLUSÕES

Foi possível concluir com o presente trabalho que o composto Fistularin 3 se apresentou seletivo, possuindo baixo ou nenhum efeito citotóxico em células não cancerígena da linhagem HUVEC, além de ter se demonstrado citotóxico para as células cancerígenas testadas. Também foi possível observar que o composto afeta o ciclo celular de células THP-1 provocando parada em G1 e aumento do número de células de SubG1, indicando danos irreversíveis ao DNA. Também foi possível observar que este composto natural de origem marinha, provoca a fragmentação do DNA a partir de 48 horas de tratamento, tendo um aumento dessa fragmentação no período de 72 horas.

Os resultados do estudo, também indicam que o composto causa baixa despolarização da membrana mitocondrial, e não possui influência de espécies reativas de oxigênio em seu mecanismo de ação citotóxico. Também foi possível observar alta indução a formação de organelas vesiculares ácidas, indicando que o composto Fistularin 3 induz o processo de autofagia, de forma que esse dado pode ser reafirmado devido à baixa indução do composto as apoptoses precoce e tardia.

Assim, pode-se observar que o composto Fistularin 3 apresentou efeitos anticancerígenos promissores, indicando ser uma substância em potencial para continuação dos estudos e elucidação dos seus efeitos citotóxicos em outras linhagens neoplásicas, além do melhor entendimento do seu mecanismo de ação indutor da autofagia na linhagem THP-1.

REFERÊNCIAS

- AGAMI, R. e BERNARDS, R. Distinct initiation and maintenance mechanisms cooperate to induce G1 cell cycle arrest in response to DNA damage. **Cell**. v. 102, 2000.
- AHMAD, J. et al. Concentration-dependent Induction of reactive oxygen species, cell cycle arrest and apoptosis in human liver cells after nickel nanoparticles exposure. **Environmental toxicology**, v. 52, 2013.
- BERTOLI, C. et al. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. **Nature Reviews, Molecular cell biology**, v.14, 2013.
- BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Nat. prod. Red.**, v. 31, p. 160-258, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. **INCA**, Rio de Janeiro, 2016.
- BRAUCHLE, E. et al Cell death stages in single apoptotic and necrotic cells monitored by Raman microspectroscopy. **Nature, Scientific reports**, v. 4, 2013.
- BRAY, F. et al. Cancer incidence in five continents: inclusion criteria, highlights from volume X and the global status of cancer registration. **International Journal of Cancer**, v. 137, p. 2060-71, 2015.
- CASTROGIOVANNI, C. et al. Decrease of mitochondrial p53 during late apoptosis is linked to its dephosphorylation on serine 20. **Cancer biology & therapy**, v. 16, 2015.
- CHAMMAS, R. Biologia do câncer: uma breve introdução. **Atheneu**, v.1, p. 3-7, 2013.
- CHAN, F. K. M. Programmed Necrosis/Necroptosis: An inflammatory form of cell death. **Cell death: mechanism and disease**, p. 211-28, 2013.
- CHINEMBIRI, T. N. et al. Review of natural compounds for potential skin cancer treatment. **Molecules**, v. 19, 2014.
- COULIDIATI et al. Distinct effects of novel naphthoquinone-based triazoles in human leukaemic cell lines. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, p. 1682-95, 2015.
- DANTAS, B. B. et al. Effects of curine in HL-60 leukemic cells; cell cycle arrest and apoptosis induction. **Journal of Natural Medicines**, v. 69, n. 2, 2015.
- DAI, J. et al. Bromotyrosine-derived metabolites from an Indonesian marine sponge in the family aplousinellidae (Order Verongiida). **Bioorg Med Chem Lett**, 2016.

- DEMPSEY, L. A. Interferon-induced necroptosis. **Nature immunology**, v.14, 2013.
- ENGELAND, K. Cell cycle arrest through indirect transcriptional repression by p53: I have a DREAM. **Cell death and differentiation**, p. 1-19, 2017.
- ESCRIBANO-DÍAZ, C. et al. A cell Cycle-Dependent Regulatory Circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice. **Molecular Cell**, v. 49, p. 872-883, 2013.
- ESSACK, M.; BAJIC, V. B; ARCHER, J. A. C. Recently Confirmed Apoptosis-Inducing Lead Compounds Isolated from Marine Sponge of Potential Relevance in Cancer Treatment. **Marine drugs**, v. 9, 2011
- FERLAY et al. GLOBOCAN 2012. Cancer incidence and mortality worldwide: IARC. **Cancer Base**, v. 10, n. 11, 2013.
- FLOREAN, C. et al. Discovery and characterization of Isofistularin-3, a marine brominated alkaloid, as a new DNA demethylating agent inducing cell cycle arrest and sensitization to trail in cancer cells. **Onco target**, v. 7, n. 17, 2016.
- FAHEINA-MARTINS, G.V. et al. Antiproliferative effects of lectins from *Canavalia ensiformis* and *Canavaliabrasiliensis* in human leukemia cell. **Lines Toxicology in Vitro**, v. 26, p. 1161–1169, 2012.
- GALEANO, E. et al. Antiparasitic Bromotyrosine Derivatives from the Marine Sponge *Verongula rigida*. **Marine Drugs**, v. 9, 2011.
- GBD 2015 risk factors collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. **Global Burden of Disease Study, Lancet**, v. 388, p. 1659-1724, 2016.
- GÓMEZ-ARCHILA, L. G. et al. Bromotyrosine derivatives from marine sponge inhibit the HIV-1 replication *in vitro*. **Vitae**, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica, v.21, n.2, 2014.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.
- HE, L. et al. A cancer-targeted nanosystem for delivery of gold(III) complexes: enhanced selectivity and apoptosis-inducing efficacy of a gold(III) porphyrin complex. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 53, n. 46, p. 12532–12536, 2014.
- HEIDEN, M. G. et al. Understanding the intersections between metabolism and cancer biology. **Cell**, v. 168, 2017.
- HOLOHAN, C.; VON SCHAEYBROECK, S.; LANGLEY, D.B.; JOHNSTON, P.G.; Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nature Reviews**, Vol 13, 2013.

HONG, J. Y. et al. Induction of cell cycle arrest and apoptosis by physcion, an anthraquinone isolated from rhubarb (rhizomes of *Rheum tanguticum*), in MDA-MB-231 human breast cancer cells. **Journal of cancer prevention**, v. 19, n. 4, 2014.

IARC, INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Pharmaceuticals: a review of human carcinogens. **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, Lyon, v. 100 2014.

IWAMOTO, T. Clinical Application of Drug Delivery Systems in Cancer Chemotherapy: Review of the Efficacy and Side Effects of Approved Drugs. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 5, 2013.

KALLIOSKOSKI, T. et al. Comparability of mixed IC₅₀ data – a statistical analysis. **Plos One**, v. 8, 2013.

KALYANARAMAN, B. et al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. **Free Radic Biol Med.**, v.51, n. 1, p.1-6, 2012.

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

KAUR, K. et al. Isoxazoline containing natural products as anticancer agents: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 77, p. 121-33, 2014.

KENIFIC, C. M. e DEBNATH, J. Cellular and metabolic functions for autophagy in cancer cells. **Trends cell biology**, v. 25, 2015.

LABARBERA, D. V. et al. The marine alkaloid naamidine A promotes caspase-dependent apoptosis in tumor cells. **Anticancer Drugs**, v. 6, 2009.

LEPRÊTRE, C. et al. Apoptosis-inducing factor (AIF) and leukocyte elastase inhibitor/I-DNase II (LEI/LDNaseII), can interact to conduct caspase-independent cell death. **Apoptosis**, v. 18, 2013.

LI, T. et al. Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence. **Cell**, v. 149, p. 1269-83, 2012.

LU J., CHEN H., WALSH, C. Necroptotic signaling in adaptive and innate immunity. **Seminars Cell Biology**, v. 35, p. 33-39, 2014.

MA, Y. et al. Tumor suppressor NPRL2 induces ROS production and DNA damage response. **Nature, scientific reports**, v. 7, 2017.

MAYER, A. M. et al. Marine Pharmacology in 2009–2011: Marine Compounds with Antibacterial, Antidiabetic, Antifungal, Anti-Inflammatory, Antiprotozoal, Antituberculosis, and Antiviral Activities; Affecting the Immune and Nervous Systems, and other Miscellaneous Mechanisms of Action. **Marine Drugs**, v. 11, 2013.

MCGRANAHAN, N.; SWANTON, C. Clonal heterogeneity and tumor evolution: Past, Present, and the future. **Cell**, v. 168, 2017.

MESQUITA, L. M. et al. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, Elsevier, v. 123, p. 439–445, 2009.

MIJARES, M. R. et al. Cytotoxic effects of Fistularin-3 and 11-Deoxyfistularin-3 on Jurkat and U937 cell lines. **Biomed Pap Med**, v.157, n. 3, 2013.

MILLER, K. D. et al. Cancer treatment and Survivorship Statistics, 2016. CA: A Cancer **Journal for Clinicians**, v. 66, n.4, 2016.

MILLIMOUNO, F. M. et al. Targeting apoptosis pathways in cancer and perspectives with natural compounds from mother nature. **Cancer Prevention Research**, v. 7, n. 11, p. 1081-107, 2014.

MINN, A. J.; WHERRY, E. J. Combination cancer therapies with immune checkpoint blockade: Convergence on Interferon Signaling. **Cell**, v. 165, 2016.

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

NAJAFOV, A.; CHEN, H.; YUAN, J. Necroptosis and cancer. **Trends in cancer**, v.3, p. 294-301, 2017.

NICACIO, K. J. et al. Cultures of the marine bacterium *Pseudovibrio denitrificans* Ab134 produce bromotyrosine-derived alkaloids previously only isolated from marine sponges. **Journal of Natural Products**, v. 80, p. 235-40, 2017.

NIEMANN, H. et al. Sponge derived bromotyrosines: structural diversity through natural combinatorial chemistry. **Natural product communications**, v. 10, n. 1, p. 219-31, 2015.

PALKAR, M. B. et al. An insight into purine, tyrosine and tryptophan derived marine antineoplastic alkaloids. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 15, 2015.

PATIL, S.; RAO, R. S.; MAJUMDAR, B. Necroptosis: changing trends in cell biology cancer. **Journal of International oral health**, v. 7, 2015.

PIETKIEWICZ, S.; SCHMIDT, J. H.; LAVRIK, I. N. Quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination of imaging flow cytometry with classical Annexin V/popidium iodide staining. **Journal of Immunological Methods**, v. 423, p. 99-103, 2015.

PLUMMER, M. et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. **Lancet Glob Health**, 2016.

PUYANA, M. et al. Metabolite variability in caribbean sponges of the genus *Aplysina*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, p. 592-99, 2015.

REPSOLD, L.; POOL, R.; KARODIA, M.; TINTINGER, G.; JOUBERT, A. M. N., A overview of the role of platelets in angiogenesis, apoptosis and autophagy in chronic myeloid leukaemia. **Cancer Cell International**, v. 17, 2017.

REYES-REYES, E. M. et al. Physangulidine A, a withanolide from *Physalis angulata*, perturbs the cell cycle and induces cell death by apoptosis in prostate cancer cells. **Journal of Natural Products**, v.76, p. 2-7,2012.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1458-61, 2006.

RISS, T. L. et al. Stereochemical Heterogeneity in Verongid Sponge Metabolites. Absolute Stereochemistry of (+)-Fistularin-3 and (+)-11-*epi*-Fistularin-3 by Microscale LCMS-Marfey's Analysis. **Journal of Nature products**, v.65, p. 891-896, 2005.

ROOS, W.; THOMAS, A. D.; KAINA, B. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. **Nature reviews**, v. 16, 2016.

RUSSO, M.; MUPO, A.; SPAGNUOLO, C.; RUSSO, G. L. Exploring death receptor pathways as selective targets in cancer therapy. **Biochem Pharmacol.**, v. 80, n. 5, p. 674 - 682, 2010.

SABHARWAL, S. S.; SCHUMACKER, P. T. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or na Achilles' hell? **Nature Reviews, Cancer**, v. 14, 2014.

SALIEV, T. et al. Induction of apoptosis in U937 cells by using a combination of bortezomib and low-intensity ultrasound. **Medical Science monitor**, v. 22, 2016.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2016. CA; **Cancer Journal for Clinicians**, v. 66, n. 1, 2016.

SU, Z. et al. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. **Molecular Cancer**, v. 14, n.48, 2015.

SU, Z. et al. Cancer therapy in the necroptosis era. **Cell death and Differentiation**, v.23, p. 748-756, 2016.

SULLIVAN, L. B. et al. Altered metabolite levels in cancer: implications for tumour biology and cancer therapy. **Nature Reviews, cancer**, v. 16, 2016.

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

THOMÉ, M. P. et al. Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. **Journal of Cell Science**, v. 129, 2016.

TURAJLIC, S. et al. Insertion and deletion derived tumour-specific neoantigens and the immunogenic phenotype a pan-cancer analysis. **The lancet Oncology**, v. 18, n. 8, 2017.

UNGETHUM, L. et al., Molecular imaging of cell death in tumors. Increasing Annexin A5 size reduces contribution of Phosphatidylserine-targeting function to tumor uptake. **Plos one**, v. 9, 2014.

US. National Cancer Institute. What you need to know about leucemia. **Department of Health and Human services**, v. 13, 2013.

WANG, K. et al. Ivermectin induces PAK1-mediated cytostatic autophagy in breast cancer. **Autophagy**, v.12, n. 12, 2017.

WIDLAK, P.; GARRARD, W. T. Roles of the major apoptotic nuclease-DNA fragmentation factor-1 in biology and disease. **Cell Mol Life Sci.**, v. 66, n. 2, p. 263 - 274, 2009.

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

XU, W. et al., n Regulates Alternative Pathway Complement Necrotic Cells Independently of C3b and regulates alternative pathway complement activation. **The journal of immunology**, v. 16, 2017.

YANO, S. et al. Cancer cells mimic in vivo spatial-temporal cell cycle phase distribution and chemosensitivity in 3 dimensional Gelfoam® histoculture but not 2-dimensional culture as visualized with real-time Fucci imaging. **Cell cycle**, v. 14, 2015.

YOO, D. et al. Magnetically triggered dual functional nanoparticles for resistance-free apoptotic hyperthermia. **Angewandte Chemie**, v. 52, p. 13047-51, 2013.

ZAMORANO, J. L. et al. 2016 ESC position paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of ESC committee for practice guidelines. **European Heart Journal**, v. 37, 2016.

ZHANG, F. H. et al. Lactucin induces potent anti-cancer effects in HL-60 human leukemia cancer cells by inducing apoptosis and sub-G1 cell cycle arrest. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 11, p. 478-84, 2016.

ZHDANOV, D. et al. Regulation of Apoptotic Endonucleases by EndoG. **DNA and cell biology**, v. 34, 2015.