



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

ANA KAROLINA DE SOUZA ANDRADE

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL *IN VITRO* DOS
DERIVADOS SINTÉTICOS DO INDOL**

SÃO CRISTÓVÃO/SE

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL *IN VITRO* DOS
DERIVADOS SINTÉTICOS DO INDOL

Projeto de pesquisa do Mestrado acadêmico
apresentado ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas (PROCFIS) para defesa de
Mestrado

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Bani Correa
Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Scher

SÃO CRISTÓVÃO
2021

FICHA CATALOGRÁFICA**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

A553a Andrade, Ana Karolina de Souza
Avaliação do potencial antitumoral *in vitro* dos derivados sintéticos do indol / Ana Karolina de Souza Andrade ; orientadora Cristiane Bani Correa. – São Cristóvão, SE, 2021.
54 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências Fisiológicas) –
Universidade Federal de Sergipe, 2021.

1. Câncer. 2. Morte celular. 3. Tumores. 4. Agentes antineoplásicos. 5. Indol. I. Correa, Cristiane Bani, orient. II. Título.

CDU 612:615.277

ANA KAROLINA DE SOUZA ANDRADE

Avaliação do potencial antitumoral *in vitro* dos derivados sintéticos do indol

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe como requisito final à obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada _____ em:
_____/_____/_____

1º Examinador: Prof. Dr^a. Cristiane Bani Corrêa
Universidade Federal de Sergipe

2º Examinador: Prof^a. Dr^a. Luciana Nalone Andrade
Universidade Federal de Sergipe

3º Examinador: Prof^a. Dr^a. Adriana Andrade Carvalho
Universidade Federal de Sergipe

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer a Deus por ter me dado forças, coragem e anjos em meu caminho que me ajudaram a chegar até aqui. Agradeço a meus pais, por sempre acreditarem nos meus sonhos e me fortalecerem nos momentos de fraqueza. Ao meu noivo, Rinelle por todo o incentivo e paciência durante esses dois anos. Ao meu irmão Samuel que mesmo em sua inocência me ajudava a seguir em frente. À minha família que sempre acredita muito em mim.

De maneira especial gostaria de agradecer à minha orientadora, Professora Cristiane Bani, pela oportunidade e pelo conhecimento adquirido. A todos que fazem parte do Labicel, que estiveram juntos comigo nessa caminhada. De maneira especial a Mari, Mariana Nobre, por termos divididos os experimentos, as alegrias e frustrações. Não poderia jamais esquecer dele que foi um verdadeiro anjo, Jileno, obrigada por me entusiasmar nos momentos de desânimo e me ajudar em verdadeiramente tudo, levarei você no meu coração. Não poderia também esquecer o professor James que foi um dos grandes incentivadores para a minha entrada no mestrado.

Também agradeço aos colegas que iniciaram junto comigo o mestrado, obrigada pelo companheirismo nas disciplinas e pelos momentos vividos, agradeço a todos na pessoa de Ingrede Tatiane. Agradeço de maneira especial a Renivan. Também agradeço ao meu coorientador Ricardo Scheer, pelas contribuições ao longo do trabalho. Ao professor Sócrates pela parceria para a realização deste trabalho. Agradeço a todas as pessoas que torciam por esse momento e me incentivavam a continuar, especialmente ao meu padrinho Padre Paulo, por muitas vezes me acolher e aconselhar.

Por fim, volto agradecer a Deus por me fazer acreditar que eu sou forte e que mesmo quando acreditei não ter forças ele me levantou e me fez seguir em frente. Diante de tudo que vivi nos últimos dias dedico essa vitória a minha estrelinha que agora se encontra no céu, meu avô Preto, essa conquista é para o senhor. Obrigada a todos.

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”. (Paulo Beleki)

RESUMO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL *IN VITRO* DOS DERIVADOS SINTÉTICOS DO INDOL. ANDRADE, A. K. S., São Cristóvão, 2020.

O câncer é considerado um problema de saúde pública em todo o mundo devido às altas taxas de mortalidade. Ele é ocasionado por mutações nos oncogenes que controlam o ciclo celular e que acabam por gerar proliferação desordenada das células. Os agentes antineoplásicos utilizados atualmente para o tratamento da doença ainda geram muitos efeitos adversos, tais como: neurotoxicidade, danos hepáticos e renais, dentre outros. Devido a isso, se faz necessária à busca de novos compostos que possam ter um potencial citotóxico em células tumorais. Nesse contexto, o indol por ser um composto que é amplamente distribuído entre os produtos naturais e que apresenta diversas atividades biológicas, como a atividade antitumoral, torna-se uma fonte importante para o desenvolvimento e busca de novas moléculas que venham apresentar atividade antitumoral. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antitumoral de derivados sintéticos do indol. Na primeira etapa do projeto foram selecionados doze compostos indólicos na concentração de 25 µg/mL para avaliação do grau de inibição nas linhagens tumorais de câncer de pulmão, melanoma e glioma pela técnica do SRB. De acordo com a estrutura química e alto grau de inibição nas linhagens tumorais foram selecionadas as substâncias NM-18-05, NM-01-38-29 e a NM-01-45-33 para avaliação da citotoxicidade e cálculo da CI_{50} . Os resultados da CI_{50} mostram que a molécula NM-01-38-29 teve eficácia em promover a atividade antitumoral na linhagem de glioma (C6). Com base nesse resultado as células C6 foram tratadas com o composto NM-01-38-29 para avaliação de mecanismos celulares como a capacidade de formação de colônias, capacidade de migração celular, e avaliação de alterações morfológicas. O composto NM-01-38-29 mostrou-se capaz de diminuir o número de colônias bem como atuou inibindo a capacidade migratória das células C6. Além disso, foi possível observar alterações morfológicas com os corantes DAPI e FALOIDINA/FITC sugerindo morte celular por apoptose nas células de glioma. Esses resultados mostram que derivados do indol possuem ação citotóxica em diferentes linhagens tumorais e que as diferenças estruturais desses compostos levaram a diferenças no valor de grau de inibição encontrado frente a linhagens celulares utilizadas. A molécula NM-01-38-29 apresentou maior efeito citotóxico na linhagem celular C6. Os resultados de atividade citotóxica com base no grau de inibição somado aos resultados de mecanismos celulares mostram que o composto NM-01-38-29 tem um efeito promissor, para o tratamento do câncer.

Palavras-chave: Câncer, compostos indólicos, células tumorais, efeito citotóxico, morte celular.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE *IN VITRO* ANTITUMORAL POTENTIAL OF INDOL SYNTHETIC DERIVATIVES. ANDRADE, A. K. S., São Cristóvão, 2020.

Cancer is considered a public health problem worldwide due to the high mortality rates. It is caused by mutations in the oncogenes that control the cell cycle and that end up generating disordered cell proliferation. The antineoplastic agents currently used for the treatment of the disease still generate many adverse effects, such as: neurotoxicity, liver and kidney damage, among others. Because of this, it is necessary to search for new compounds that may have a cytotoxic potential in tumor cells. In this context, the indole, without a compound that is widely distributed among natural products and that presents several biological activities, such as antitumor activity, which has already been investigated in indole alkaloids such as ellipticin, it becomes an important source for the development and search for new molecules that come to show antitumor activity. Thus, the objective of this work was to evaluate the antitumor activity of synthetic indole derivatives. In the first stage of the project, twelve indole compounds were selected at a concentration of 25 $\mu\text{g} / \text{mL}$ to assess the degree of inhibition in tumor lines of lung cancer, melanoma and glioma by the SRB technique. According to the chemical structure and high degree of inhibition in the tumor lines, the substances NM-18-05, NM-01-38-29 and NM-01-45-33 were selected to assess cytotoxicity and calculate CI_{50} . The CI_{50} results show that the NM-01-38-29 molecule was effective in promoting antitumor activity in the glioma (C6) lineage. Based on this result, C6 cells were treated with the compound NM-01-38-29 to evaluate cellular mechanisms such as the ability to form colonies, the capacity for cell migration, and the evaluation of morphological changes. The compound NM-01-38-29 was shown to be able to decrease the number of colonies as well as inhibiting the migratory capacity of C6 cells. In addition, it was possible to observe morphological changes with DAPI and FALOIDINA/FITC dyes suggesting cell death due to apoptosis in glioma cells. These results show that indole derivatives have cytotoxic action in different tumor lines and that the structural differences of these compounds led to differences in the value of the degree of inhibition found compared to the cell lines used. The NM-01-38-29 molecule showed a greater cytotoxic effect on the C6 cell line. The results of cytotoxic activity based on the degree of inhibition plus the results of cellular mechanisms show that the compound NM-01-38-29 has a promising effect for the treatment of cancer.

Key-words: Cancer, indole compounds, tumor cells, cytotoxic effect, cell death.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Código e nomenclatura da moléculas segundo a IUPAC.....	26
Tabela 2. Valores do grau de inibição celular das linhagens de células tumorais A549, B16-F10 e C6.....	31
Tabela 3. Valores de CI_{50} e intervalo de confiança das moléculas NM-01-18-05, NM-01-38-29, NM-01-45-33, Indol frente as linhagens de células C6, B16-F10 e A549.....	33

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação esquemática das principais vias moleculares que levam à apoptose.....	18
Figura 2. Estrutura química do indol.....	22
Figura 3. Compostos sintéticos derivados do indol obtidos do Laboratório de Química Farmacêutica da Universidade Federal de Sergipe que foram utilizados nesse projeto.....	25
Figura 4. Grau de inibição das linhagens tumorais C6, B16-F10 e A549 tratadas com NM-01-18-05, NM-01-38-29, NM-01-45-33 e Indol.....	32
Figura 5. Ensaio Clonogênico de células C6 tratadas com NM-01-38-29.....	34
Figura 6. Efeitos do NM-01-38-29 sobre a migração celular de células C6 pelo ensaio de <i>Wound Healing</i>	36
Figura 7: Efeito do NM-01-38-29 na morfologia do citoesqueleto e núcleo de células da linhagem C6.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A549 Linhagem de Células Epiteliais de Carcinoma Pulmonar Humano

B16-F10 Linhagem Celular de Melanoma

BSA Albumina sérica bovina

C6 Linhagem Celular de Glioma

CDK Quinases Dependentes de Ciclina

DAPI 6-Diamidine-2-Phenylindole Dihydrochloride

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO Dimetilsulfóxido

DOX Doxorubicina

DU-145 Células de Carcinoma de Próstata Humana

EDTA Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

EMT Transição Mesenquimal Epitelial

FALOIDINA/FITC Isotiocianato de Fluoresceína

GBM Glioblastoma Multiforme

HEP-2 Carcinoma Cervical Humano

INCA Instituto Nacional do Câncer José Alencar da Silva

IUPAC União Internacional da Química Pura e Aplicada

HL-60 Linhagem Celular de Leucemia

CI₅₀ Concentração inibitória para 50% das células

IGROV-1 Linhagem de Células de Câncer de Ovário Humano

MCF-7 Linhagem Celular de Adenocarcinoma

MDR Câncer de Cólon Humano Multiresistente

OMS Organização Mundial de Saúde

PBS Tampão Fosfato Salina

RB Proteína Supressora de Tumor de Retinoblastoma

SNC Sistema Nervoso Central

SFB Soro Fetal Bovino

THP-1 Linhagem Celular de Leucemia

TA Temperatura Ambiente

SUMÁRIO

1- Introdução	12
2- Revisão da literatura	14
2.1. Aspectos epidemiológicos do câncer.....	14
2.2.Mecanismos moleculares do câncer	14
2.3.Mecanismos de morte celular.....	17
2.4.Glioma	19
2.5.Tratamento.....	20
2.6.Produutos sintéticos no tratamento do câncer	21
2.7.Compostos heterocíclicos: indol e derivados indólicos.....	22
3- Objetivo	24
3.1. Objetivo Geral.....	24
3.2. Objetivos específicos.....	24
4- Materiais e métodos	25
4.1. Derivados sintéticos do Indol.....	25
4.2. Linhagens e cultivo de células	26
4.3. Ensaio de citotoxicidade – SRB.....	27
4.4. Formação de colônias.....	28
4.5. Alterações morfológicas – Ensaio DAPI/FITC/Faloidina.....	28
4.6. Migração celular.....	29
4.7. Análise estatística.....	29
5- Resultados	30
5.1.Citotoxicidade dos derivados indólicos.....	30
5.2. Determinação da CI_{50} por SRB.....	31
5.3.Avaliação da formação de colônias.....	34
5.4.Ensaio de migração celular.....	35
5.5.Ensaio DAPI/FITC/Faloidina.....	37
6- Discussão	40
7- Conclusão	44

8- Referências.....45

1- INTRODUÇÃO

O câncer é uma das doenças que mais causam temor na sociedade devido as altas taxas de mortalidade que apresenta em todo o mundo. Acredita-se que o câncer resulte do acúmulo gradual de diversas mutações genéticas que aumentam sucessivamente a proliferação celular e acabam por desordenar todo o mecanismo de controle do ciclo celular. Essas mutações são ocasionadas por diversos fatores que podem ser de origem ambiental (químicos e físicos) ou hereditários (LOPES-LAZARO, 2018).

As neoplasias podem ser geradas principalmente por mutações em genes que estão envolvidos no processo de multiplicação celular. Estes se transformam em oncogenes, os quais são responsáveis pela malignização das células normais (PEDRAZA-FARINA,2006). As células alteradas mudam seu comportamento e iniciam uma multiplicação descontrolada. Com o aumento do número destas células há a necessidade da formação de novos vasos sanguíneos, os quais serão os responsáveis por manter o fornecimento de nutrientes. A manutenção desses processos leva a formação dos tumores malignos que podem ainda migrar para outros órgãos e formar metástases (ALMEIDA *et al*, 2005).

A grande maioria dos mecanismos pelos quais acontecem o processo de carcinogênese envolve alterações no ciclo celular. O processo de crescimento e divisão celular se divide em duas partes: interfase e mitose. As fases G₁, S, G₂constituem o período da interfase, já a fase M corresponde a mitose. O objetivo principal do ciclo celular é a geração de cópias idênticas do DNA para a geração das células-filhas (MASSAGUÉ, 2004). Quando ocorre algum problema na replicação do DNA, as células interrompem a replicação ou iniciam o processo de apoptose. Devido a mudança no comportamento das células cancerosas, esses mecanismos de controle para a eliminação dos erros gerados na fita do DNA, são perdidos e logo ocorre a formação do câncer (MALUMBRES e BARBACID, 2009).

Durante o processo da carcinogênese as células sofrem diversas alterações que acabam interferindo no processo de morte celular programada (XU; SHI, 2007). É importante entender as várias etapas de ativação da morte celular programada para então buscar compostos que levem a destruição e morte das células cancerígenas. Dessa maneira, as vias de morte programada como a apoptose vem sendo bastante estudada a fim de se chegar a novos alvos e compostos terapêuticos para o tratamento do câncer (GALLUZZI *et al*,2018).

Dentre os tipos de câncer do sistema nervoso central temos os chamados gliomas que são causa de morte entre jovens em todo o mundo (FANG, 2014). São tumores bastante agressivos e que apresentam dificuldades para tratamento devido a sua complexidade

(RAMIREZ,2020). A heterogeneidade apresentada por esse tipo de tumor confere a eles forte angiogênese e capacidade de evasão dos processos de apoptose (XU ET AL,2014). Devido a isto, os gliomas são bastante estudados para a busca de novas opções terapêuticas.

A grande maioria dos agentes antineoplásicos atua de maneira não-específica, ou seja, eles acabam destruindo tanto células normais quanto células tumorais. Isso justifica os graves efeitos adversos que os atuais tratamentos utilizados ainda causam (ALMEIDA *et al*, 2005). Devido a isto, nos últimos anos tem-se buscado novas terapias, nas quais o tratamento é direcionado especificamente a alvos/moléculas, com a finalidade de diminuir a não-seletividade dos compostos (SEEBACHER *et al*, 2019). Nesse contexto se faz necessário a busca de moléculas que consigam ser mais citotóxicas/específicas para as células tumorais. A síntese de novas substâncias a partir de modificações moleculares tem sido uma boa fonte para a busca de possíveis novas terapias para o câncer (BANERJI, 2013).

Alcaloides indólicos como a elipticina possuem atividade antitumoral já conhecida para câncer de mama, leucemia, glioblastomas (LICHOTA *et al*,2018). Esses compostos têm em sua estrutura a molécula do indol. Esta substância é amplamente distribuída entre os produtos naturais e várias atividades biológicas já foram descritas para esse grupo (PEDROSA, 2017). O desenvolvimento de novas moléculas a partir do núcleo indol tem se mostrado bastante promissor para a busca de novas moléculas para o tratamento do câncer (LIMA, 2007). Por isso a síntese de novas moléculas com modificações estruturais a partir do indol é de grande importância para a busca de novos fármacos com atividade antitumoral, pois a partir dessas modificações é possível conferir a essas substâncias maior citotoxicidade e maior seletividade nas células tumorais, tornando-as moléculas mais potentes, mais seletivas e menos tóxicas.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Aspectos epidemiológicos do câncer

O câncer está entre as quatro principais causas de morte prematura na maioria dos países, tornando-se assim o principal problema de saúde pública no mundo (BRAY *et al.*, 2018). A taxa de incidência e mortalidade decorrente do câncer vem aumentando devido a diversos fatores tais como, o envelhecimento da população, crescimento populacional, bem como pela na distribuição e prevalência de fatores de risco para o câncer. No Brasil estima-se para os anos de 2020-2022, que para cada ano surja 625 mil novos casos de câncer (INCA,2020).

A mais recente estimativa mundial, ano 2018, aponta que ocorreram no mundo 18 milhões de casos novos de câncer (17 milhões excluindo os casos de câncer de pele não melanoma) e 9,6 milhões de óbitos (9,5 milhões excluindo os cânceres de pele não melanoma) (INCA,2020). A incidência dos diferentes tipos de canceres variam de acordo com o nível de desenvolvimento do país, acometendo principalmente os países mais subdesenvolvidos devido ao maior número de fatores de risco nestes. No entanto, o impacto gerado pelas taxas de mortalidade desta doença é sentido principalmente nos países de médio e baixo desenvolvimento devido as mortes prematuras que tal doença pode ocasionar (INCA, 2018).

Devido ao perfil epidemiológico que o câncer vem apresentando nos últimos anos no Brasil, têm-se aumentado as discussões nas diferentes esferas do governo a fim de se traçar novas estratégias para o controle e tratamento da doença. No que se refere a vigilância desta doença no Brasil, as ações de controle são apoiadas nas informações de morbimortalidade obtidas pelo Registro de Câncer de Base Populacional, Registros Hospitalares de Câncer e pelo Sistema de Informações sobre Mortalidade do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde que fornece os subsídios para que os gestores monitorem e organizem as ações para o controle de câncer, bem como o direcionamento da pesquisa em câncer (INCA, 2020). O Instituto Nacional do Câncer José Alencar da Silva (INCA) vêm ao longo dos anos sendo uma organização pioneira na abordagem da vigilância do câncer.

2.2- Mecanismos Moleculares do Câncer

O câncer é uma doença caracterizada pela formação e crescimento desordenado de células que pode acometer a vida de um indivíduo (LÓPEZ-LÁZARO, 2018). A malignização das células pode acontecer em diferentes tecidos do organismo e se apresentar com as mais distintas características. O processo de transformação de uma célula normal a uma célula

maligna acontece após uma série de mutações acumuladas que resulta na proliferação celular descontrolada. As mutações acontecem principalmente em genes envolvidos com o processo de divisão celular (proto-oncogenes e os genes supressores), os quais sofrem alterações em suas funções levando a perda do controle do ciclo celular (PEDRAZA-FARINA,2006). Ao sofrerem mutações recorrentes estes podem tornar-se oncogenes com funcionamento anormal capazes de levar a expansão clonal descontrolada das células afetadas e ao acúmulo de erros no DNA destas células tornando-as tumorais (GOMES-CARNEIRO, 2010).

O processo de carcinogênese é entendido como um acúmulo de múltiplas etapas na alteração do DNA, tais alterações levam as células que passam por esse processo a se tornarem menos especializadas do que as células normais, ocasionando uma perda da funcionalidade do tecido (LÓPEZ-LÁZARO, 2018). As alterações genéticas sofridas pelas células geram novas características as células tumorais, as quais garantem a malignidade do tumor, tais como: alterações no metabolismo celular, resistência a morte celular programada, angiogênese sustentada, capacidade de invasão de tecidos vizinhos, dentre outros. Além de tais alterações, o câncer consegue progredir no organismo, pelos efeitos imunossupressores mediados pelas células cancerosas (ZHU *et al*, 2018; WEINBERG, 2011).

A carcinogênese pode ser desencadeada por vários fatores químicos, físicos ou biológicos. Algumas substâncias químicas, chamadas de carcinógenos, podem aumentar a probabilidade de mutações. Tais compostos, são responsáveis por cerca de um quarto das mortes por câncer. Os tumores podem também ser decorrentes de predisposições hereditárias. Nesses casos, acredita-se que um ou mais genes cancerosos encontram-se alterados no genoma herdado (GOMES-CARNEIRO, 2010). No entanto, para que o desenvolvimento e a progressão do tumor aconteçam é necessário que exista uma comunicação contínua entre as células e o microambiente tumoral, o qual contribui para a formação de novos vasos e maior nutrição do tumor (WHITESIDE,2008).

O metabolismo de células cancerosas sofre alterações que são realizadas para adquirir os nutrientes necessários para as células obterem energia e construir nova biomassa para garantir as condições necessárias para a manutenção do microambiente tumoral (ZHU *et al*, 2018). Essas alterações metabólicas baseiam-se principalmente: na regulação de processos de captação de glicose e aminoácidos, estratégias oportunistas para a obtenção de nutrientes, interações metabólicas com o microambiente, dentre outros (DONG, 2018).

O ciclo celular é caracterizado por um conjunto ordenado e estritamente regulado de estágios, incluindo crescimento e divisão celular, onde duas células filhas são apresentadas ao

final do processo (MASSAGUÉ, 2004). Cada fase que constitui o ciclo celular é caracterizada por eventos específicos, as fases G_1 , S e G_2 constituem a fase chamada de interfase, na qual as células apresentam intensa atividade metabólica e crescimento celular. Na fase G_0 , a célula não está se replicando. Ela pode avançar para a fase G_1 , onde a célula é preparada para o processo de multiplicação celular que irá definir a entrada dela na fase S, na qual acontece a síntese do DNA. Já na fase G_2 são realizadas checagens para que os erros ou danos sofridos na síntese do DNA possam ser resolvidos (MASSAGUÉ, 2004). Após as fases de crescimento celular da interfase temos a chamada mitose, na qual acontece o processo de divisão celular. As células, na maioria dos tecidos, normalmente se encontram na fase G_0 , que pode ser transiente (quiescência) ou permanente. Quando elas estão quiescentes podem ser acionadas e entrarem novamente no ciclo celular por estimulação com fatores mitogênicos que utilizam as quinases dependentes de ciclina (CDK), especialmente CDK_4 e CDK_6 , as quais conduzem a progressão do ciclo celular da fase G_0 ou G_1 para a fase S (OTTO-SICINSKI *et al*, 2017) e, portanto, são consideradas as principais reguladoras deste processo diferentes (ZHENG *et al*,2019).

Além de atuarem na progressão do ciclo celular, as quinases CDK_4 e CDK_6 quando ativadas podem fosforilar vários alvos celulares, entre os quais o alvo mais importante é a proteína supressora de tumor de retinoblastoma (RB). A RB sofre fosforilação por CDK_4 e então o E2F (fator de transcrição) é liberado impedindo a progressão do ciclo celular (OTTO-SICINSKI *et al*, 2017). Além das CDK_4 e CK_6 , a CDK_2 é outra importante reguladora de transição G_1 / S . Após o início da mitose, a CDK_1 atua juntamente com a ciclina B e promovem vários eventos tais como, condensação da cromatina, formação do fuso mitótico e reorganização o citoesqueleto de actina (ZHENG *et al*,2019).

Em vários tipos de câncer como os gliomas, câncer de próstata e ovário e leucemias apresentam alterações nos genes que codificam as ciclinas e CDK. Em glioblastomas, o CDK_4 é amplificado em cerca de 50% e é ativado constitutivamente por uma mutação. Também o CDK_6 é ativado por translocações genômicas em linfomas. Os genes relacionados com a codificação das proteínas inibitórias do complexo $CDK_{4/6}$, como p_{16} e p_{14} encontram-se deletadas (OTTO-SICINSKI *et al*, 2017).

No processo de carcinogênese o estado mais avançado é quando os tumores iniciam o processo de metástase. Assim como no estágio inicial do câncer, a metástase acontece basicamente a partir das mesmas mutações sofridas no início da doença (FARES *et al.*, 2020). De maneira geral a cascata de metástases no câncer é semelhante para os diferentes tipos da doença. Acredita-se que a transição epitélio-mesenquimal (EMT) atue diretamente na entrada

e saída de células cancerosas em tumores primários (GAO *et al*,2019). As principais vias pelas quais as células tumorais podem se disseminar são: sistema circulatório, sistema linfático ou cavidades corporais (BOHL *et al*,2014).

2.3- Mecanismos de morte celular

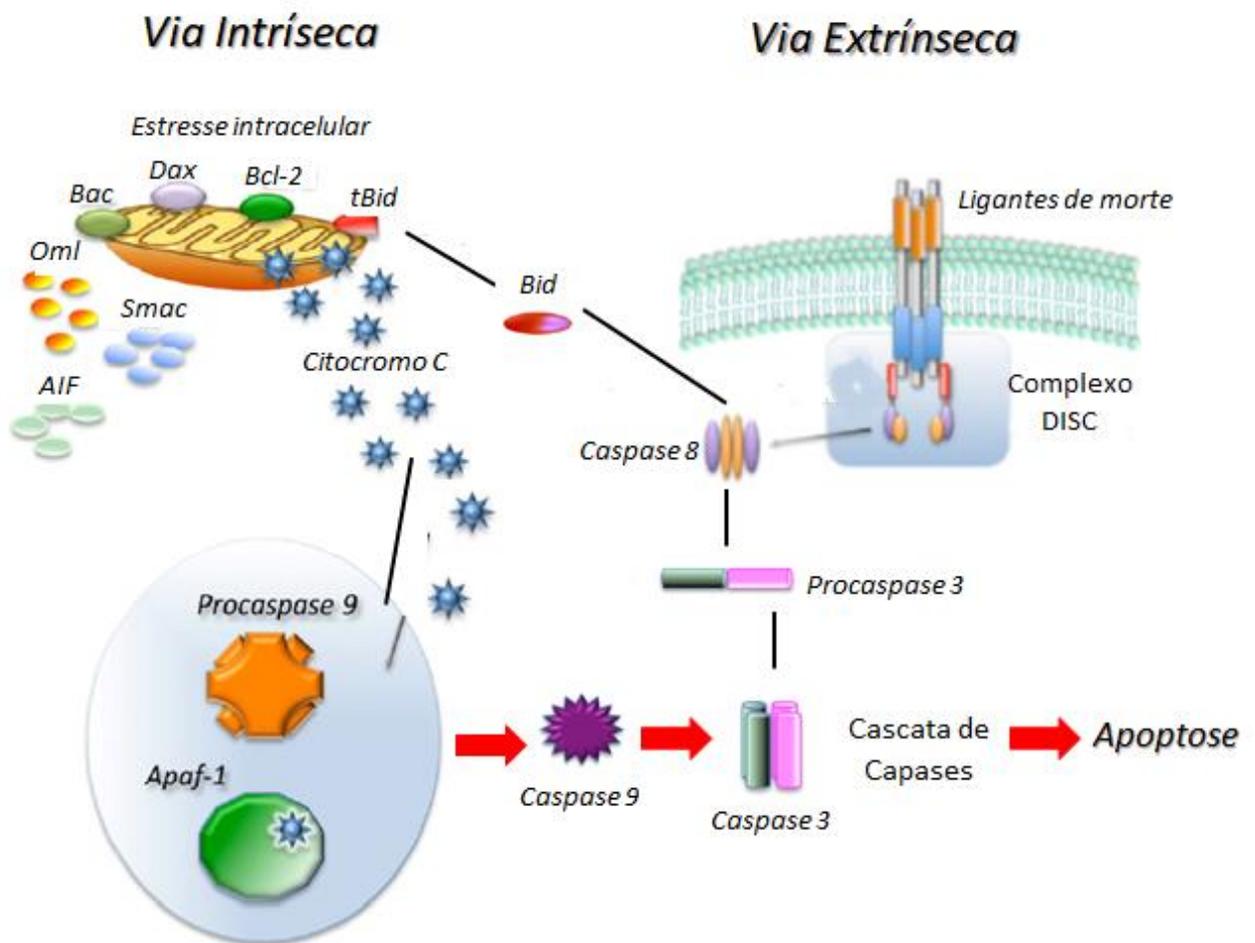
Entender o processo de morte celular é de fundamental importância para o avanço no conhecimento e desenvolvimento de estudos que busquem novos agentes farmacológicos para o tratamento do câncer (GALLUZZI *et al*,2018). A morte celular é resultado de várias causas, incluindo isquemia (redução do fluxo sanguíneo), infecção e toxinas. A classificação amplamente utilizada para a morte celular em mamíferos permite dividi-la em dois grupos: a morte por apoptose e a morte por necrose. Além desses tipos, também tem sido proposto um terceiro que é a morte por autofagia, na qual a célula digere todos os seus substratos disponíveis e acaba entrando em processo de morte celular. Acredita-se que a autofagia e a apoptose são processos de morte programada (HOTCHKISS *et al.*, 2009).

A necrose é caracterizada morfológicamente pelo aumento da célula e de suas organelas levando ao extravasamento de conteúdo celular devido a perda da integridade da membrana. As enzimas que digerem a célula necrótica são derivadas dos lisossomos das próprias células que estão morrendo ou dos lisossomos dos leucócitos que são recrutados como parte da reação inflamatória (GREEN; LLAMBI, 2015). Como resultados de uma falha metabólica, a necrose ocorre espontaneamente em neoplasias quando a proliferação celular supera a angiogênese, levando assim a um quadro de hipóxia celular (YU *et al*, 2020).

A apoptose é um processo altamente conservado e rigidamente regulado para eliminar células danificadas ou desnecessárias e ocorre normalmente nos organismos. Alterações no controle da apoptose estão associadas a uma grande variedade de doenças, incluindo o câncer. Este tipo de morte celular envolve a ativação de diversas enzimas e levam a uma sequência específica de alterações morfológicas que englobam o encolhimento celular, fragmentação da cromatina, desintegração celular e formações de corpos apoptóticos (ALBERTS; LEWIS; RAFF, 2008). Tais mudanças morfológicas são comandadas por proteases especializadas da família das caspases que atuam clivando e inativando diversas proteínas. Além dos estímulos naturais do organismo, a apoptose pode ser induzida por estímulos patológicos ou quando a célula sofre mutação (HOTCHKISS *et al.*, 2009).

A apoptose é o tipo de morte celular que pode ser considerada um alvo para a ação de agentes antitumorais, pois os mecanismos deste tipo de morte acontecem de forma mais organizada com fragmentação em vesículas e posterior fagocitose, não acontecendo desta maneira extravasamento dos conteúdos celulares, evitando danos ao tecido. Na maioria das células, o início da apoptose geralmente acontece por meio da ativação das caspases, as quais interferem na autodestruição da célula. Este grupo de enzimas normalmente existe na forma de precursores inativos chamados de pro caspases, estas após ativadas clivam vários substratos da membrana intracelular e citoplasmática levando a desintegração celular (XU; SHI, 2007). Todo esse processo de apoptose pode ser iniciado por duas vias distintas: a via extrínseca iniciada por receptores de morte e a via intrínseca que ocorre via mitocondrial (Figura 1).

Figura 1- Representação esquemática das principais vias moleculares que levam à apoptose.



Adaptado de (FAVALORO *et al.*,2012).

A via intrínseca é ativada em resposta a condições estressantes, incluindo danos ao DNA, estresse oxidativo, dentre outros. Todas essas formas de estresse celular convergem para

a mitocôndria levando a alteração da permeabilidade mitocondrial resultando na dissipação do potencial de membrana, cessando a produção de ATP, bem como uma série de proteínas que contribuem para a ativação da caspase. A via intrínseca responde também aos sinais de dentro da célula, tais como danos causados por radiação e por agentes quimioterápicos, induzindo assim a sinalização apoptótica por meio da liberação de fatores mitocondriais. Já a via extrínseca depende de mediadores exógenos específicos para receptores de morte na superfície celular. No entanto, as vias intrínsecas e extrínsecas não são completamente independentes, em algumas células, de fato, a ativação da caspase 8, a qual é considerada uma mediadora da via extrínseca, resulta na ativação da via mitocondrial (FAVALORO,2012).

A maioria das neoplasias apresentam alterações no sistema de apoptose celular, entre as mais caracterizadas estão o aumento de proteínas da família BCL2, bem como, mutações no gene supressor de tumor TP53 (MOHAMED *et al*,2017). Este gene é o responsável pela iniciação da apoptose em resposta a danos ao DNA induzido por radiação, agentes químicos, estresse oxidativo, dentre outros. Defeitos no TP53 resulta em neoplasias, incluindo gliomas e sarcomas (HOTCHKISS *et al.*, 2009). Devido as falhas no processo de apoptose que levam ao câncer a maioria dos agentes quimioterápicos induzem a apoptose em células tumorais (XU; SHI, 2007).

2.4- Glioma

Dentre os tumores mais comuns do sistema nervoso central (SNC) estão os gliomas, considerados como tumores cerebrais primários e que estão entre as três principais causas de morte por câncer em jovens (menores de 35 anos) (FANG, 2014). Recentemente, a classificação dos tumores do SNC foi atualizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Tal classificação leva em conta o tipo de célula primária juntamente com características histológicas e moleculares. O tumor de glioma mais agressivo é glioblastoma multiforme (GBM), que tem um prognóstico ruim e uma baixa taxa de sobrevivência. Esses tumores se caracterizam por alta taxa de crescimento e alta vascularização (GIAKOMETIS,2018).

Os gliomas são tumores altamente agressivos e apesar dos numerosos estudos quase sempre são incuráveis. Devido à sua forte resistência à quimio e radioterapia, esses tumores não demonstraram resposta ao tratamento ou frequentemente apresentam recidiva após uma resposta inicial (RAMIREZ,2020). Atualmente, o tratamento convencional para glioma é realizado pela remoção cirúrgica associada com quimioterapia e/ou radioterapia (FANG, 2014).

Infelizmente, nos últimos anos, houve apenas alguns avanços terapêuticos para os gliomas, mesmo sendo proposto por pesquisadores diversas vias moleculares e uma variedade de alvos, não houve sucesso nos ensaios clínicos (GIAKOMETIS,2018).

Apesar de vários estudos para definir os fatores determinantes da agressividade desse tumor, mecanismos da gênese do glioma permanecem indefinidos e os fatores moleculares subjacentes à sua agressividade ainda não são claros (PALUMBO,2018). Atualmente acredita-se que células-tronco de glioma são responsáveis pela formação, expansão, recorrência e a alta resistência à terapia deste tipo de câncer. A população de células que formam os tumores glioma é bastante heterogênea e se caracteriza por forte angiogênese, alta proliferação e evasão da apoptose (XU *et al*,2014).

2.5- Tratamento

A terapia para o câncer tem como principal objetivo inibir a atividade cancerígena das células tumorais, além disso objetiva-se que esse tratamento seja o mais seletivo possível para as células tumorais. Porém o grande problema das terapias existentes atualmente é que elas atuam de maneira não-específica, ou seja, tanto as células normais quanto as tumorais são destruídas e devido a isso graves efeitos adversos ocorrem (SUN *et al*,2017). A escolha da terapia depende do tipo de tumor que acomete o paciente, dentre as principais formas de tratamento utilizadas no combate ao câncer temos: a remoção cirúrgica do tumor, radioterapia e quimioterapia. Também é comum se combinar formas de tratamento para conseguir erradicar o câncer. Os agentes antitumorais utilizados na quimioterapia são agrupados em várias categorias entre elas, agentes alquilantes, antimetabólitos, alcaloides vegetais, antibióticos antitumorais, enzimas, hormônios (ALMEIDA *et al*, 2005).

Um dos medicamentos bastante conhecido e utilizado no tratamento do câncer é a Doxorrubicina. Esta droga pertence à classe das antraciclinas, juntamente com a Daunorrubicina, Epirubicina, Idarrubicina, entre outros (ALMEIDA *et al*, 2005). É conhecido pelo menos dois mecanismos pelos quais a Doxorrubicina exerce seu efeito sobre as células tumorais: através da intercalação entre os pares de bases dos filamentos do DNA, interferindo nos processos de replicação e transcrição do DNA. O efeito citotóxico da Doxorrubicina também está associado à inibição da enzima topoisomerase II e na formação de radicais livres que levam ao aparecimento do estresse oxidativo (CAGEL *et al*, 2016). A Doxorrubicina é comumente utilizada para tratamento de câncer de mama, fígado, cólon, linfoma e em leucemias (GORINI *et al*,2018).

Os agentes alquilantes foram os primeiros agentes antineoplásicos descobertos. Eles têm seu mecanismo baseado em efeitos na síntese do ácido desoxirribonucleico e ligando-se a este, impedindo a abertura da dupla hélice. Medicamentos como o Metotrexato, Fluorouracil utilizados na quimioterapia são da classe dos agentes antimetabólitos, esse grupo atua bloqueando bioquimicamente a síntese do DNA, portanto são restritos a fase S do ciclo celular (CAETANO-PINTO *et al*, 2017). Já a classe dos alcaloides vegetais, são derivados de produtos naturais e agem através da inibição da formação do fuso mitótico na metáfase, interrompendo assim o ciclo celular, um exemplo bastante conhecido desse grupo é a Vincristina bastante utilizada no tratamento de leucemias (CHAO *et al*,2015)

Mesmo sendo a principal abordagem para o tratamento de tumores metastáticos, a quimioterapia está associada a diversos efeitos colaterais graves que tornam o tratamento difícil para o paciente. Dentre esses efeitos têm-se a supressão da medula óssea, neurotoxicidade, reações gastrointestinal, além de danos hepáticos e renais (FENG, 2017). Por tais motivos é necessária a busca de novas moléculas que sejam mais efetivas frente as células tumorais e que causem menos problemas aos pacientes. Uma opção para essa busca é a síntese orgânica de novas substâncias a partir de alguns precursores com atividade tumoral conhecida (BANERJI, 2013).

2.6- Produtos Sintéticos no Tratamento do Câncer

O processo de desenvolvimento de novas substâncias candidatas a fármacos é complexo, de alto custo e demanda a combinação de várias áreas estratégicas em ciência e tecnologia (AMARAL *et al*, 2017). A busca por novas moléculas para o tratamento do câncer atualmente é bastante baseada em produtos naturais, no entanto a indústria farmacêutica utiliza em grande escala bancos de compostos sintéticos a fim de encontrar novos candidatos a fármacos (ATANASOV *et al*,2015). Uma nova alternativa também utilizada é a modificação estrutural de compostos de origem natural, resultando em moléculas sintéticas (JANOWSKA *et al*, 2020).

Investigações recentes estão focadas no desenvolvimento de moléculas que utilizam como base esqueletos de determinadas estruturas já conhecidas, devido ao potencial biológico apresentadas por estas (GROZAV,2017). Alterações estruturais em pequenas moléculas com porções heterocíclicas cresceu bastante nos últimos anos e mostrou-se bastante promissora na busca de novos compostos com atividade antitumoral (JANOWSKA *et al*, 2020). Os compostos heterocíclicos têm sua origem enraizada na síntese orgânica e química medicinal

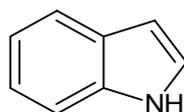
(MARTINS *et al*, 2015). No entanto também é possível encontrar esses compostos em fontes naturais, como plantas, micro organismos e outros (PARRINO *et al*,2015).

Estudo recente demonstrou que substâncias sintéticas com porções heterocíclicas apresentaram atividades antiproliferativas promissoras em um pequeno painel de linhagens de células tumorais, incluindo THP-1(leucemia), A549 (pulmão), IGROV-1 (ovário), HEP-2 (fígado), MCF-7 (mama) e DU-145 (próstata) (MARTINS *et al*, 2015). Mais recentemente, também foi observado que a análogos sintéticos da Camalexina, composto de origem natural que possui em sua estrutura anéis de indol e tiazol, demonstraram atividade antiproliferativa em mesotelioma peritoneal (GROZAV,2017). Dessa maneira o desenvolvimento de moléculas sintéticas a partir de estruturas já conhecidas vem ganhando grande destaque na busca por novos candidatos a fármacos para tratamento do câncer (JANOWSKA *et al*, 2020).

2.7- Compostos Heterocíclicos: Indol e Derivados Indólicos

Os derivados heterocíclicos com unidades indol (Figura 2) podem ser encontrados em uma variedade de compostos biologicamente ativos que os torna alguns dos heterocíclicos mais extensivamente estudados (GROZAV,2017). Estes compostos são amplamente distribuídos em diversos produtos naturais. Além de sua distribuição natural, o núcleo indol é utilizado como base para a síntese de substâncias que são utilizadas para a descoberta de novos fármacos. Os compostos indólicos apresentam diferentes atividades biológicas tais como: atividade antitumoral, anti-inflamatória, antimicrobiana e antiplasmódica (PEDROSA, 2017). Dentre tais atividades destaca-se a citotóxica, a qual tem sido demonstrada frente a diferentes linhagens de células tumorais como por exemplo células da linhagem CCF-7 de câncer de mama (JANOWSKA,2020).

Figura 2. Estrutura química do indol.



As elipticinas são alcaloides indólicos bastante estudados devido a sua conhecida atividade antitumoral (HENRIQUE, 2010). Tais moléculas são particularmente importantes pois clinicamente apresentam efeitos colaterais reduzidos e alta citotoxicidade (CIRINO, 2005). O mecanismo de ação das elipticinas ligam-se fortemente ao DNA e levam à interrupção do ciclo celular através da regulação de expressão de algumas quinases, além disso elas também

podem fosforilar ciclinas, induzindo a apoptose e geração de radicais livres citotóxicos. As elipticinas são citotóxicas em células de câncer de mama (MCF-7), células de leucemia (HL-60) e glioblastoma (U87MG) (LICHOTA,2018).

O núcleo indol apresenta plasticidade em sua estrutura o que é levado em conta no planejamento do desenvolvimento de novas drogas (MARTINS,2015). Os compostos indólicos são considerados bons ligantes ao DNA, devido a características que a sua estrutura apresenta, logo tais substâncias podem levar a alterações no DNA e conduzir a célula a morte por apoptose (PEDROSA, 2017). Com base nesse contexto, os compostos derivados do indol são considerados uma classe terapêutica promissora para a busca de futuros medicamentos antineoplásicos que consigam apresentar maior citotoxicidade para as células cancerosas e menores efeitos adversos para os pacientes (BISWAL et al., 2012).

A combinação de várias estratégias em ciência e tecnologia resulta em um planejamento mais racional para a busca de inovações terapêuticas (AMARAL,2017). As estratégias de modificação molecular, vêm ao longo dos anos ganhando espaço para a busca e desenvolvimento de novas moléculas biologicamente ativas (LIMA, 2017). Através da obtenção de compostos derivados de alterações moleculares é possível a descoberta de fármacos inovadores para o tratamento de enfermidades que causam altas taxas de mortalidade, como por exemplo o câncer. Assim esse projeto tem por objetivo avaliar a atividade citotóxica de derivados indólicos frente as células tumorais.

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo Geral

Avaliar a atividade citotóxica dos derivados do indol, em linhagens de células de melanoma (B16-F10), carcinoma de pulmão (A549) e glioma (C6).

3.2- Objetivos Específicos

- Avaliar o grau de inibição celular pelo método SRB dos derivados sintéticos do indol nas linhagens tumorais;
- Determinar a CI_{50} pelo método SRB dos derivados sintéticos do indol com maior grau de inibição sobre as células das linhagens tumorais;
- Avaliar o efeito do derivado indólico na inibição da formação de colônias e migração de células de glioma;
- Avaliar as alterações morfológicas nas células de glioma tratadas com o derivado indólico.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Derivados Sintéticos de Indol

Doze compostos sintéticos (Figura 3 e tabela 01) derivados do indol foram obtidos em colaboração com Professor Dr. Sócrates Cabral de Holanda Cavalcanti do Laboratório de Química Farmacêutica (LQF), da Universidade Federal de Sergipe. Foram preparadas e armazenadas diferentes soluções estoque de cada um dos compostos indólicos à 20 mg/mL em DMSO. Essas soluções foram diluídas em meio DMEM para o preparo das soluções de trabalho a 25 µg/mL.

FIGURA 3. Compostos sintéticos derivados do indol obtidos do Laboratório de Química Farmacêutica da Universidade Federal de Sergipe que foram utilizados nesse projeto.

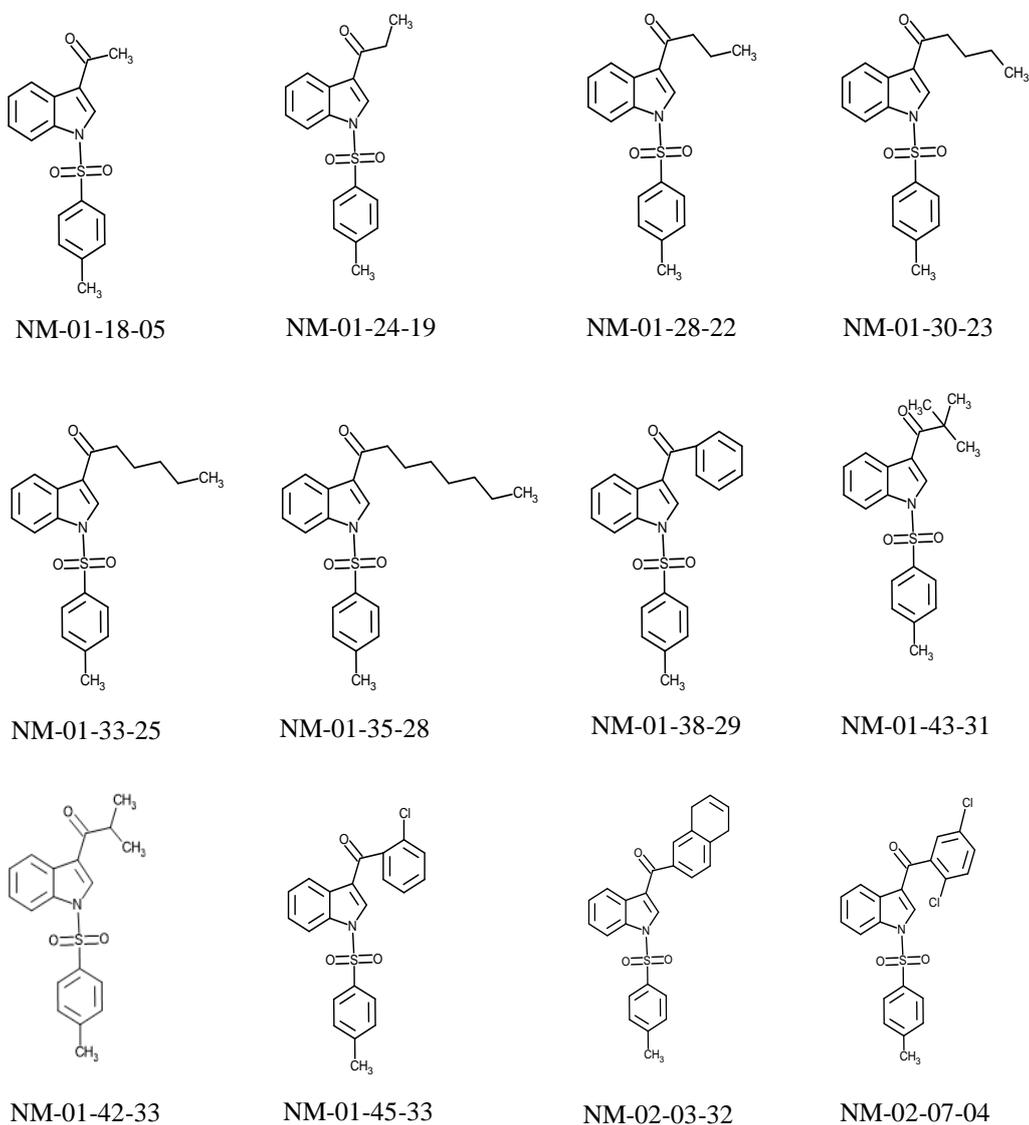


Tabela 1: Código e nomenclatura das moléculas segundo a União Internacional da Química Pura e Aplicada (IUPAC).

Código	Nome da Molécula
NM-01-18-05	3-acetil-N-arilsulfonilindol
NM-01-24-19	3-propil-N-arilsulfonilindol
NM-01-28-22	3-butil-N-arilsulfonilindol
NM-01-30-23	3-pentil-N-arilsulfonilindol
NM-01-33-25	N-tosil-3-hexanoilindol
NM-01-35-28	3-heptil-N-arilsulfonilindol
NM-01-38-29	3-benzoil-N-arilsulfonilindol
NM-01-42-33	3-isovaleroila-N-arilsulfonilindol
NM-01-43-31	(3,3-dimetil-1-tosil-1H-indol-3-il)butan-1-ona
NM-01-45-33	(3-clorofenil)(1-tosil-1H-indol-3-il)metanona
NM-02-03-32	Naphtalen-2-il-[1-tolueno-4-sulfonil]-1H-indol-3-il)-metanona
NM-02-07-04	(2,6-diclorofenil)(1-tosil-1H-indol-3-il)-metanona

4.2- Linhagens e Cultivo de Células

A citotoxicidade dos derivados sintéticos do indol foi avaliada em células das linhagens A549 (carcinoma de pulmão), B16-F10 (melanoma) e C6 (glioma). Todas as células foram obtidas do banco de células do Laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Sergipe (UFS). As linhagens foram mantidas em garrafas de cultivo em meio Dulbeccos's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de Soro Fetal de Bovino (SBF) e 1% de antibiótico (penicilina 10000 U/mL; estreptomicina 10000 mg/mL) e incubadas em estufa à 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, a fim de simular as condições fisiológicas. Ao obter confluência de 80%, as células foram desprendidas da garrafa através do tratamento com solução Tripsina-EDTA (Tripsina 0,25%; EDTA 0,53 Mm) por tempo de 5 a 15 min à 37°C. Em seguida, a solução de Tripsina-EDTA foi inativada por adição de meio DMEM completo (1:3). O meio contendo as células foi transferido para tubo Falcon de 15 mL e centrifugado a 259 x g por 10 min à 4°C. O pellet de células formado após centrifugação foi ressuspenso em meio DMEM completo (SBF 10%; antibiótico 1%) e uma alíquota de 10 µL foi colocada em câmara de Neubauer para ajuste da concentração de células para subcultivo e realização de experimentos.

4.3- Avaliação de Citotoxicidade– SRB

A Sulforodamina B (SRB) é um corante aniônico utilizado para avaliação da viabilidade celular por base na medição do teor de proteínas que se ligam a este eletrostaticamente (FERNANDES, 2014). As linhagens A549, B16-F10 e C6 foram semeadas em placas de 96 poços (1×10^4 células/poço) contendo meio DMEM suplementado com 10% de SBF e 1% de antibiótico (penicilina 10000 U/mL; estreptomicina 10000 mg/mL). As células foram incubadas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ à 37°C por 24 h para aderência. Após esse tempo as células foram tratadas com 25 µM dos derivados indólicos por 72 h. DMSO 0,1% e Cloridrato de Doxorrubicina 5µg/mL foram usados como controle negativo e controle positivo de morte, respectivamente. Ao completar o tempo, o meio contendo os tratamentos, controle negativo e controle positivo foram descartados e as células foram fixadas com ácido tricloroacético (30%) por uma hora à 4°C. A placa foi lavada por 4 vezes com água destilada e seca. Um volume final de 100 µL da solução de SRB 0,057% (p/v) dissolvida em ácido acético (1%) foi adicionada aos poços por 30 min em temperatura ambiente (TA). A placa foi lavada por 4 vezes com ácido acético para remoção do excesso de corante e seca. TRIS base (10 mM; pH 10,5) foi usado para diluição do SRB por 30 min e então a placa foi lida em leitor de microplaca (Synergy H1, Biotek, VT, EUA) por espectrofotometria com comprimento de onda de 510 nm. Os valores de absorbância foram convertidos a porcentagem de inibição do crescimento celular a partir da fórmula:

$$\% \text{Grau de Inibição} = \left\{ 100 - \left[\left(\frac{\text{Abs. (tratamentos)}}{\text{Abs. (controle negativo)}} \right) \times 100 \right] \right\}$$

Os derivados indólicos que apresentaram maior inibição no crescimento celular foram selecionados para determinação da CI₅₀, concentração inibitória para 50% das células. Utilizando-se a mesma técnica do SRB descrita acima foram feitos ensaios de citotoxicidade com os compostos NM-18-05, NM-01-38-29 e a NM-01-45-33 com concentrações de 25 a 0,09 µg/mL. Como controle foi utilizado a Doxorrubicina 2,5 µg/mL e o indol 25 a 0,09 µg/mL. Após o cálculo da CI₅₀ nas diferentes linhagens estudadas foi selecionado o derivado indólico NM-01-38-29 para os próximos testes na linhagem C6.

4.4- Formação de Colônias

As células C6 foram semeadas em placa de 6 poços (300 células/poço) em meio DMEM contendo 10% de SBF e 1% de antibiótico (penicilina 10000 U/mL; estreptomicina 10.000 mg/mL). A placa foi deixada em estufa com atmosfera de 5% CO₂ a 37°C por 24h para aderência celular. Após esse tempo as células foram expostas as concentrações de 0,2, 0,4 e 0,8 µg/mL do composto NM-01-38-29, por 72h em estufa sob mesmas condições. DMSO 0,1% e Cloridrato de Doxorrubicina 2,5µg/mL foram usados como controle negativo e controle positivo de morte, respectivamente. Após o tempo de tratamento os meios foram desprezados e o meio DMEM completo foi adicionado aos poços e deixados em estufa com atmosfera de 5% CO₂ a 37°C por 10 dias. Esse ensaio consiste em avaliar a viabilidade proliferativa e a capacidade de formação de colônias por uma única célula após um período de incubação (FRANKEN et al., 2006). Após 10 dias, as células são fixadas com metanol + ácido acético (3:1) por 5min e coradas com cristal violeta 0,5% em água por 30min. Após a coloração os poços contendo células são lavadas com água. Ao final do experimento, foi observado e contado o padrão de crescimento em número de colônias das células, com auxílio do *software Image J*.

4.5- Alterações Morfológicas – Ensaio DAPI/FITC/Faloidina

As células C6 foram semeadas em 1×10^4 em placas de 48 poços (1×10^4 /poco), em meio DMEM contendo 10% de SBF e 1% de antibiótico (penicilina 10000 U/mL; estreptomicina 10.000 mg/mL). As células foram deixadas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ à 37°C por 24 h para aderência. Ao completar esse tempo, as células foram expostas ao composto indólico NM-01-38-29, nas concentrações referentes a 0,2, 0,4 e 0,8 µg/mL por 24h. DMSO 0,1% e Cloridrato de Doxorrubicina 5 µg/mL foram usados com controle negativo e controle positivo, respectivamente. O meio contendo os tratamentos, controles negativo e positivo de morte foram descartados e as células lavadas com solução PBS (1x) por três vezes e fixadas com formol 4% por 15 min. Após fixação foi realizada a lavagem dos poços com PBS. A permeabilização celular foi realizada com solução Triton X 100 a 0,2% em PBS por 15 min. Mais uma vez foi feita a lavagem dos poços com PBS. Em seguida foi utilizada albumina sérica bovina (BSA) a 1% em PBS por 20 min em temperatura ambiente. Os poços novamente foram lavados com PBS. O citoesqueleto das células foi corado com FITC/Faloidina 25 µg/mL por 30 min no escuro e em seguida os poços foram lavados com PBS. O núcleo celular foi contra corado com DAPI 1µg/mL por 10 min, no escuro e adicionado PBS aos poços. As análises foram realizadas em microscópio de fluorescência (Zeiss, USA) onde foram avaliadas alterações nas

características do citoplasma e núcleo, bem como, a fragmentação da cromatina, características que podem sugerir o mecanismo de morte celular por apoptose e necrose.

4.6- Migração Celular

Os efeitos do derivado indólico NM-01-38-29 sobre a migração das células tumorais de glioma C6 foram avaliados pelo método de Wound Healing. Para este ensaio, as células de glioma C6 foram semeadas em quantidade 7×10^5 células em placa de 12 poços e após 24h, um risco foi feito na porção central de cada poço, removendo as células desta região com o auxílio de uma micropipeta amarela. Os poços foram lavados com PBS para remover as células desaderidas. Em seguida, as células foram expostas a concentrações crescentes do composto 0,2, 0,4 e 0,8 $\mu\text{g/mL}$ e incubadas por 24h. DMSO 0,1% e Cloridrato de Doxorrubicina 5 $\mu\text{g/mL}$ foram usados com controle negativo e controle positivo de morte, respectivamente. Durante o período de incubação, a área da risca foi analisada com auxílio de microscópio óptico invertido (Nikon, T5100) em aumento de 40X a fim de observar o fechamento da risca. Fotos foram tiradas em 0, 24 e 48h de tratamento. A área de fechamento foi medida com auxílio do software Image J, e a porcentagem de fechamento foi calculada, comparando os tempos com o tempo zero, utilizando a fórmula previamente descrita (YARROW et al., 2004).

$$\begin{array}{l} \% \text{ Porcentagem} \\ \text{de} \\ \text{fechamento} \end{array} = \frac{(A_{t=0h} - A_{t=h})}{A_{t=0h}} \times 100$$

4.7- Análise Estatística

Os ensaios de citotoxicidade serão realizados em quadruplicata de pelo menos três experimentos independentes. Para todos os experimentos, intervalo de confiança de 95% será utilizado e valores $p < 0,05$ serão considerados significantes estatisticamente. Análises e gráficos assim como as CI_{50} foram obtidos através da utilização do programa GraphPadPrism 6. O teste para comparação entre grupos utilizado ANOVA, seguido de pós teste Dunnett ou pós teste Bonferroni.

5- RESULTADOS

5.1- Citotoxicidade dos derivados indólico

Doze derivados indólicos foram testados quanto a ação citotóxica nas células tumorais: A549 (carcinoma de pulmão), B16-F10 (melanoma) e C6 (glioma) pela técnica do SRB. As moléculas obtidas do Laboratório de Química Farmacêutica da Universidade Federal de Sergipe foram testadas por meio de “*screening*” farmacológico na concentração de 25 µg/mL, como descrito no item 4.3 de material e métodos.

Dos doze compostos avaliados, cinco compostos (NM-01-18-05, NM-01-24-19, NM-01-28-22, NM-01-39-29 NM-01-45-33) apresentaram um grau de inibição maior que 75% (GI>75%), para as três linhagens estudadas, sendo assim considerados compostos com alta atividade citotóxica (Tabela 2). Entre os compostos que apresentaram alta atividade citotóxica (GI>75%), cabe destacar os compostos NM-01-24-19 e o NM-01-38-29 que apresentaram grau de inibição maior que 90% (GI>90%), nas linhagens tumorais (Tabela 2).

A Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo devido a sua atividade citotóxica já conhecida para vários tipos de câncer. Observamos que a Doxorrubicina apresentou um grau de inibição maior que 90% nas três linhagens.

Tabela 2: Valores do grau de inibição celular das linhagens de células tumorais A549, B16-F10 e C6.

Compostos	Células					
	<u>A549</u>	DP	<u>B16-F10</u>	DP	<u>C6</u>	DP
NM-02-07-04	67,07	±6,00	79,71	±4,75	64,76	±1,71
NM-01-18-05	94,90	±5,45	95,09	±5,20	84,58	±7,10
NM-01-24-19	94,32	±5,34	94,15	±4,86	96,08	±7,87
NM-01-28-22	88,71	±12,10	94,91	±3,82	92,52	±8,07
NM-01-30-23	52,54	±12,11	86,00	±5,27	38,27	±10,69
NM-01-33-25	48,46	±11,02	74,59	±0,52	25,23	±10,81
NM-01-35-28	42,82	±6,81	76,80	±2,62	37,63	±3,65
NM-01-38-29	92,21	±9,21	91,89	±1,14	96,95	±7,88
NM-01-43-31	29,00	±14,94	34,08	±6,36	45,32	±4,55
NM-02-02-32	39,44	±5,77	32,73	±6,27	17,46	±2,80
NM-01-42-33	57,38	±13,37	70,78	±18,77	74,44	±6,92
NM-01-45-33	78,17	±5,48	76,62	±16,00	94,60	±5,58
Doxorrubicina	100,00	±1,28	100,00	±2,31	97,55	±2,04

Fonte: Autoria própria

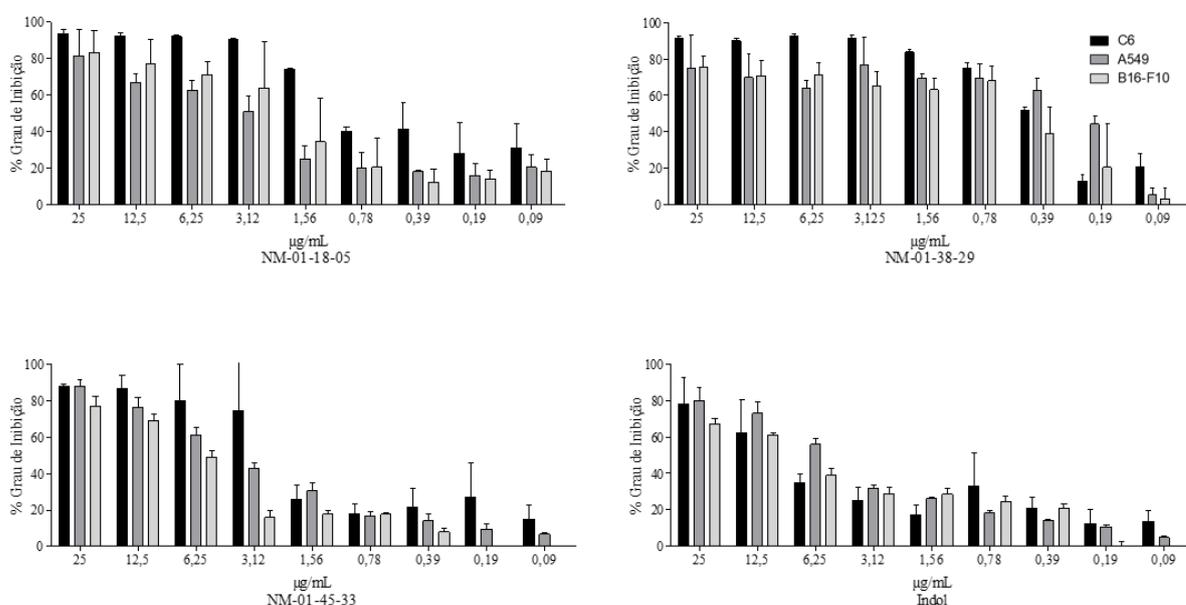
Grau de inibição celular das linhagens de células tumorais A549, B16-F10 e C6 tratadas com derivados indólicos na concentração de 25µg/mL por 72 horas. Os valores de grau de inibição estão expressos como média e ±DP de três ensaios independentes e em quadruplicata. Doxorrubicina foi usada como controle positivo.

5.2- Determinação da CI_{50} por SRB

Dentre esses compostos que apresentaram alta atividade citotóxica três foram selecionados para a determinação do valor de CI_{50} nas linhagens B16F10, A549 e C6. Para a escolha dos compostos foi levado em consideração além dos valores de grau de inibição, a estrutura química apresentada pelas moléculas, levando em consideração a diferença na substituição na lateral do núcleo indol. Com base nessa condição foram selecionadas as moléculas NM-01-18-05, NM-01-38-29 e NM-01-45-33 para determinação da CI_{50} (Figura 3 e Tabela 3).

Além dos três derivados indólicos também foi determinada a CI_{50} para a molécula do indol, precursor sintético dos compostos avaliados. As células tumorais foram tratadas com os diferentes compostos nas concentrações de 25 a 0,09 $\mu\text{g/mL}$ por 72 horas para o cálculo do percentual do grau de inibição (Figura 3). Foi possível observar que as moléculas avaliadas apresentaram grau de inibição celular de maneira concentração dependente. Nas primeiras concentrações utilizadas (25, 12,5 e 6,25 $\mu\text{g/mL}$) quase não se observa variação do grau de inibição principalmente para a linhagem C6. Já para o indol, precursor das moléculas avaliadas é possível observar que o grau de inibição apresentado nas concentrações mais altas é menor do que os apresentados para os compostos utilizados (Figura 3).

Figura 4: Grau de inibição das linhagens tumorais C6, B16-F10 e A549 tratadas com NM-01-18-05, NM-01-38-29, NM-01-45-33 e Indol.



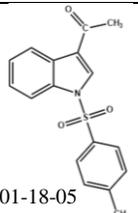
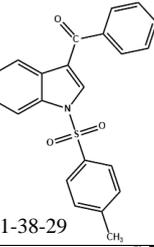
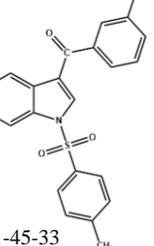
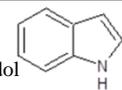
Grau de inibição celular das linhagens celulares C6, A549, B16-F10 tratadas com derivados indólicos nas concentrações de 25 $\mu\text{g/mL}$ a 0,09 $\mu\text{g/mL}$ por 72 horas. Doxorrubicina 2,5 $\mu\text{g/mL}$ foi utilizado como controle positivo. O percentual de inibição foi calculado a partir do ensaio colorimétrico por sulforrodamina (SRB). O gráfico representa a média e o desvio padrão de três experimentos independentes realizados em quadruplicata.

Os valores de CI_{50} apresentados na tabela 3, mostram que a molécula NM-01-38-29 apresenta maior atividade citotóxica, com menor valor de CI_{50} para a linhagem C6 e A549. A molécula NM-01-18-05 também apresentou baixo valor de CI_{50} frente a linhagem C6. Dentre os compostos avaliados o NM-01-45-33 foi o que apresentou maior valor de CI_{50} frente as três linhagens celulares avaliadas. Quando comparados os valores de CI_{50} dos três derivados

indólicos com o da molécula do indol, observamos que este apresentou maior valor de CI_{50} para as linhagens usadas.

Entre os derivados indólicos o NM-01-38-29 foi o que apresentou menor CI_{50} nas três linhagens estudadas, sendo a linhagem C6 com menor CI_{50} (0,46 $\mu\text{g/mL}$). Assim, o derivado NM-01-38-29 foi selecionado para a realização dos experimentos posteriores na linhagem C6, nos quais foram avaliados capacidade de formação de colônias, capacidade de migração e alterações morfológicas por DAPI e FALOIDINA/FITC.

Tabela 3: Valores de CI_{50} e intervalo de confiança das moléculas NM-01-18-05, NM-01-38-29, NM-01-45-33, Indol frente as linhagens de células C6, B16-F10 e A549.

Moléculas	Linhagem celular		
	C6 CI_{50} $\mu\text{g/mL}$	B16F10 CI_{50} $\mu\text{g/mL}$	A549 CI_{50} $\mu\text{g/mL}$
 NM-01-18-05	0,46 (0,32–0,65)	2,51 (1,70–3,71)	3,83 (2,79–5,25)
 NM-01-38-29	0,41 (0,35–0,49)	1,04 (0,65–1,68)	0,56 (0,18–0,90)
 NM-01-45-33	1,9 (1,32–2,93)	3,78 (3,38–4,22)	7,31 (5,94–9,02)
 Indol	7,91 (4,71–13,28)	5,01 (4,36–5,76)	8,44 (6,37–11,19)

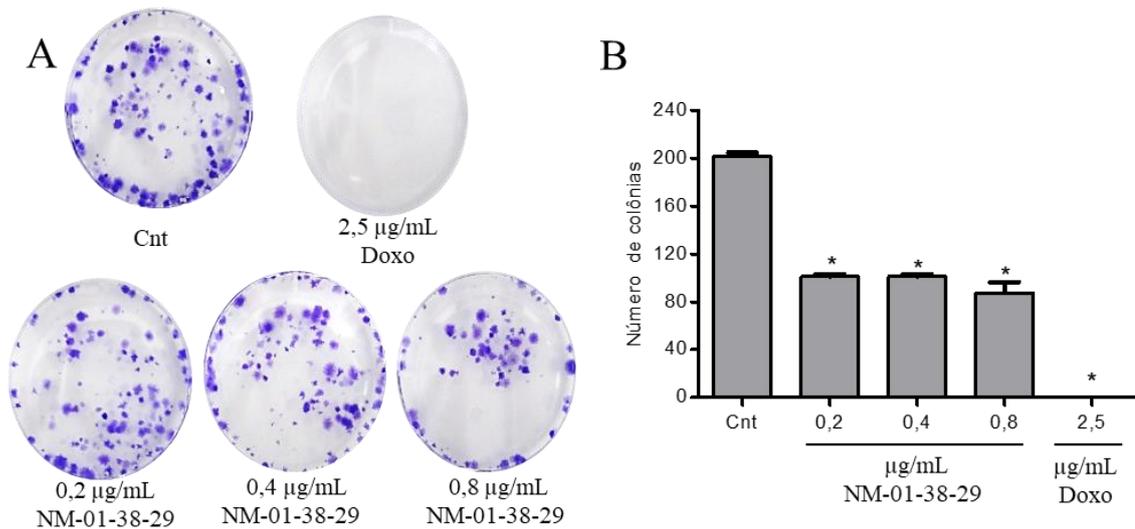
Os valores de CI_{50} estão expressos como média e intervalo de confiança de três ensaios independentes e em quadruplicata. Os dados são apresentados como valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) e seu intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não linear de três experimentos independentes realizados em quadruplicata, medido por ensaio SRB após 72 h de tratamento. A doxorrubicina foi usada como o controle positivo.

5.3- Avaliação da Formação de Colônias

O ensaio de formação de colônias que tem por objetivo avaliar a capacidade de uma única célula se proliferar e formar colônias foi realizado com a linhagem C6, utilizando o composto NM-01-38-29 como tratamento. Foram utilizadas três concentrações (0,2, 0,4 e 0,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) definidas com base no valor de CI_{50} . O número de colônias foi determinado através do software Image J a partir das imagens obtidas na realização do experimento (Figura 5A).

Na figura 5B, é possível observar que o número de colônias foi reduzido significativamente para as três concentrações utilizadas quando comparadas ao controle. Com base nos valores encontrados verificou-se que não houve variação do número de colônias entre as três concentrações utilizadas no NM-01-38-29, mas em todas observou-se diferença significativa quando comparadas ao controle sem tratamento. Foi utilizado como controle positivo a Doxorrubicina, a qual inibiu completamente a formação de colônias como observa-se na figura 4A e 4B. Com base nos resultados encontrados é possível afirmar que neste experimento o número de colônias não foi reduzido de maneira concentração dependente.

Figura 5: Ensaio Clonogênico de células C6 tratadas com NM-01-38-29.



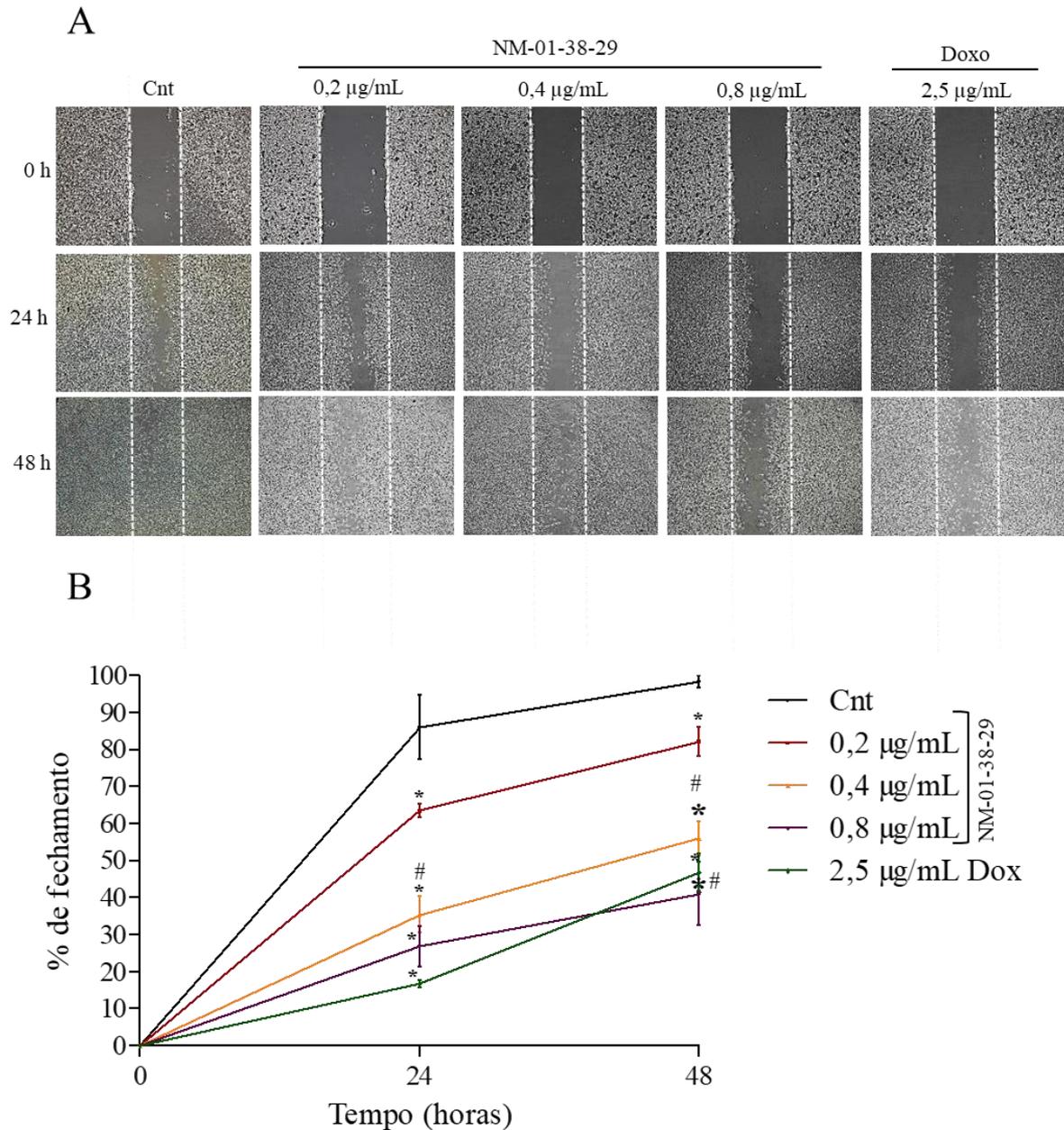
Ensaio clonogênico de células C6 tratadas com as concentrações indicadas de NM-01-38-29 por 72 horas e 10 dias de crescimento. Em A, fotografias dos poços em um experimento representativo, em B, quantificação gráfica do número de colônias. Os dados representam a média \pm DP de três ensaios independentes. Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. Análise entre grupos realizada com ANOVA, seguida de pós teste Dunnett. $p < 0,05$ * comparado ao controle.

5.4- Ensaio de Migração Celular

O ensaio de *Wound Healing* utilizado neste trabalho com o objetivo de avaliar os efeitos do NM-01-38-29 sobre a migração da linhagem C6. Foram utilizadas as mesmas concentrações definidas para o ensaio clonogênico. Na figura 6A é possível observar que o fechamento em 24 e 48 horas apresentados pela molécula na concentração de 0,8 µg/mL é bastante semelhante com o apresentado pela Doxorrubicina. Nas menores concentrações utilizadas do composto verificou-se que no tempo de 48 horas o fechamento da ferida foi quase completo.

Os resultados do fechamento da ferida mostraram que em 24 horas de tratamento, a maior concentração utilizada (0,8 µg/mL) conseguiu inibir em cerca de 73% o fechamento da ferida quando comparada a ferida não tratada (controle), conforme mostra a **Figura 6**. A concentração de 0,4 µg/mL em 24 horas também apresentou um resultado promissor de inibição de fechamento da ferida com valor em torno de 64%. A Doxorrubicina utilizada como controle positivo apresentou porcentagem de fechamento em 24 horas semelhante ao da NM-01-38-29, como mostra a figura 5B.

Figura 6: Efeitos do NM-01-38-29 sobre a migração celular de células C6 pelo ensaio de Wound Healing.



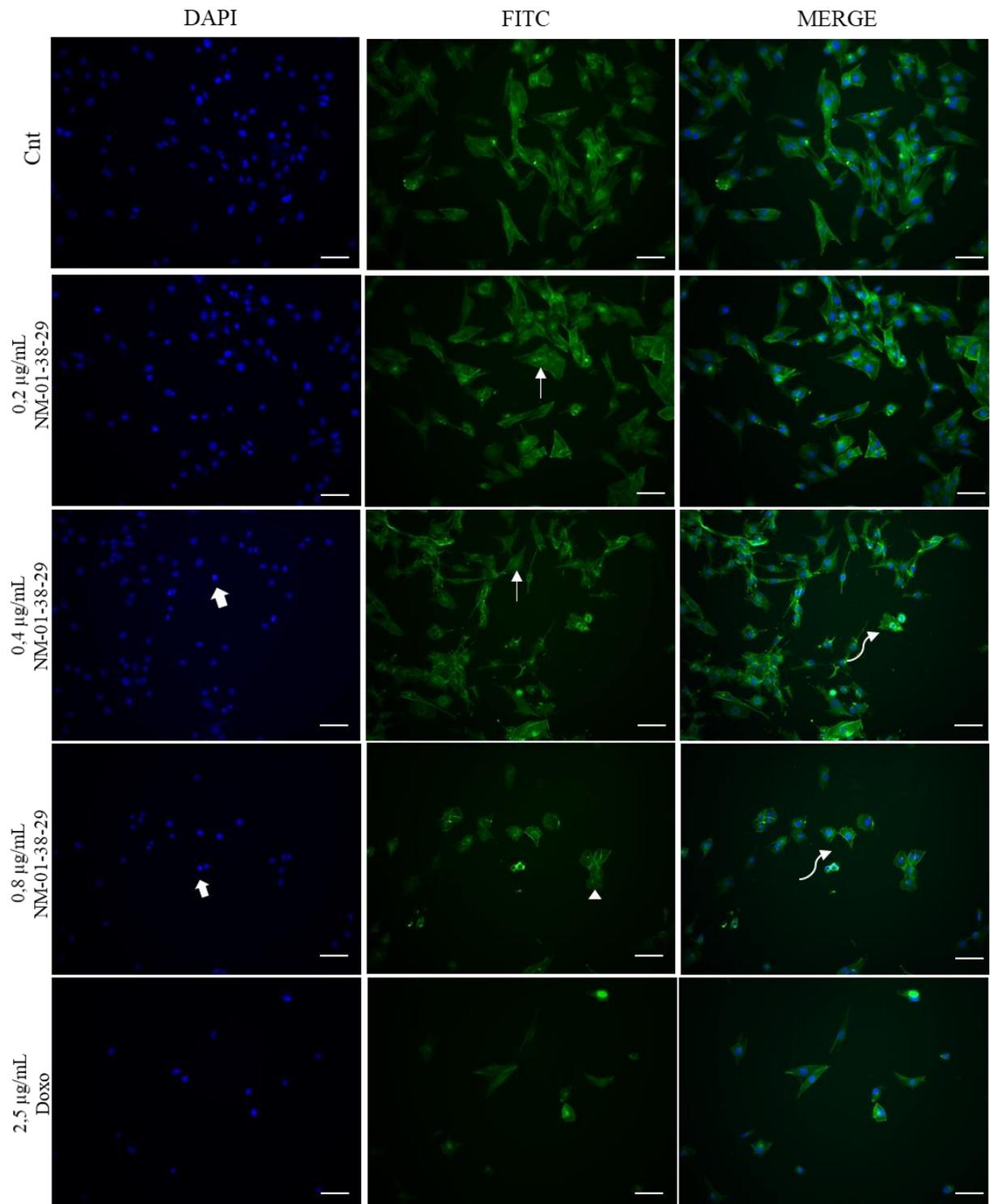
Efeitos do NM-01-38-29 sobre a migração de células C6. **(A)** Fotomicrografias representativas do ensaio de *Wound Healing* em 0, 24 e 48h de tratamento com as concentrações indicadas de NM-01-38-29 em aumento de 40x. **(B)** O gráfico representa a porcentagem de fechamento da risca, comparando as células tratadas com o grupo controle. Dados representam média \pm DP de três ensaios independentes. Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. Análise entre grupos realizada com Anova de Duas Vias, seguida de pós teste Bonferroni. $p < 0,05$ *comparado com controle, #comparado com a menor concentração NM-01-38-29 (0,8 $\mu\text{g/mL}$).

5.5- Ensaio Dapi/Faloidina-FALOIDINA/FITC

Para avaliar as alterações sofridas pelo núcleo e citoesqueleto das células tumorais da linhagem C6, após tratamento de 24 horas com a molécula NM-01-38-29, foi realizado ensaio de marcação com DAPI e Faloidina/FALOIDINA/FITC, para coloração do núcleo e citoesqueleto, respectivamente. Os resultados indicaram que no tratamento a partir da concentração de 0,4 µg/mL é possível observar alterações no núcleo das células, com indicação de condensação da cromatina sinalizados pela maior luminosidade apresentada pelo núcleo das células nas imagens (Figura 7).

É possível observar já na concentração de 0,2 µg/mL, alterações na disposição dos feixes de stress presentes na célula. Essa alteração é possível de verificar quando comparamos a imagem de Faloidina/FALOIDINA/FITC dos tratamentos com NM-01-38-29 com a do controle sem tratamento (Figura 5). Além dessa alteração também é possível observar uma diminuição do volume citoplasmático das células em todas as concentrações, principalmente na mais alta (0,8 µg/mL) (Figura 5). Também foi apresentado indícios de apoptose pela característica de formação de projeções na membrana das células pela sobreposição da marcação com DAPI e FITC\Faloidina. As alterações citadas foram observadas em todas as concentrações do composto utilizado, mas em maior frequência na concentração de 0,8 µg/mL. A Doxorrubicina, medicamento de referência utilizado provocou alterações de condensação de cromatina, perda do volume citoplasmático, alterações na disposição das fibras de estresse, formação de corpos apoptóticos assim como as apresentadas pelo tratamento com a molécula teste em sua maior concentração (Figura 7).

Figura 7: Efeito do NM-01-38-29 na morfologia do citoesqueleto e núcleo de células da linhagem C6.



Alterações morfológicas observadas em coloração DAPI e Faloidina/FALOIDINA/FITC nas células C6 após tratamento com NM-01-38-29 nas concentrações de 0,2, 0,4 e 0,8 $\mu\text{g/mL}$, após 24 horas. Seta cheia indica condensação da cromatina; cabeça de seta representa desorganização nos feixes de stress celular;

perda de volume citoplasmático; seta curva representa células em início de apoptose. Aumento de 200x.
Barra de escala = 20 μ m. Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.

6- DISCUSSÃO

Os derivados heterocíclicos que apresentam unidades estruturais como indol podem ser encontrados em uma variedade de compostos biologicamente ativos o que os torna alguns dos compostos heterocíclicos mais estudados (GROZAV,2017). Dessa maneira, torna-se importante a busca de derivados indólicos tanto de origem natural quanto de origem sintética (RAMIREZ,2020). Investigações recentes têm proposto a utilização do indol como base para o desenvolvimento de novas moléculas, devido ao seu alto potencial biológico (ABDELHAMID,2016). Alcaloides com porção indol em sua estrutura são citados na literatura por sua atividade antiproliferativa, como o grupo das elipticinas (GROZAV,2017). Abdelhamid em 2016 relata síntese de uma serie de tiazóis que contém a porção indol e apresentam atividade antitumoral contra uma linha celular de carcinoma de mama humano MCF-7.

No presente estudo foi possível observar o efeito antiproliferativo de derivados sintéticos do indol frente a três diferentes linhagens celulares tumorais (C6, A549 e B16-F10). Dentre os doze compostos avaliados quanto ao grau de inibição de crescimento celular, cinco deles apresentaram alto grau de inibição (>75%) frente todas as linhagens utilizadas, o que corrobora com a atividade antiproliferativa descrita para moléculas heterocíclicas com núcleo indol. Observou-se que as diferentes substituições no carbono α do grupo cetona das moléculas utilizadas geraram diferenças nos valores encontrados para o grau de inibição frente as linhagens celulares. O grau de inibição foi menor quando a substituição no carbono α , foi feita com cadeias mais extensas de carbono, como no caso das moléculas NM-01-35-28, NM-01-43-31, NM-01-33-25, NM-01-30-23. Nas moléculas NM-01-18-05, NM-01-24-19, NM-01-28-22, NM-01-42-33, as substituições foram feitas com grupos metila, etila, propila e para essas observou-se um potencial grau de inibição frente as linhagens, o que sugere que o tamanho e característica da molécula interfere na atividade destas substâncias. Também foi possível observar que a substituição com anel aromático no carbono alfa na molécula NM-01-38-29, resultou em um grau de inibição satisfatório, no entanto quando adicionado átomo de cloro a esse anel (NM-01-45-33, NM-02-07-04), ou até mesmo, outro anel aromático (NM-02-03-32), o valor do grau de inibição encontrado foi menor.

Três dos compostos com maior grau de inibição (NM-01-18-05, NM-01-38-29, NM-01-45-33) foram utilizados para a determinação da CI_{50} frente as mesmas linhagens celulares utilizadas no *screening* farmacológico. A escolha levou em consideração não apenas o valor do grau de inibição, mas também as diferenças estruturais pelas diferentes substituições no carbono

do grupo cetona, a fim de observar as diferenças entre elas. Além disso, foi também determinada a CI_{50} para a molécula pura do indol, o valor encontrado para esta foi bem maior do que os apresentados para os seus derivados, indicando que os derivados são mais promissores para a busca de novos fármacos para o tratamento do câncer. Resultados descritos por Martins e colaboradores (2015) para CI_{50} de compostos heterocíclicos frente a linhagens de câncer de mama corroboram com os valores encontrados para os derivados indólicos utilizados neste trabalho. Xu e colaboradores (2020) fizeram um estudo com compostos heterocíclicos derivados de metabolitos de fungos do gênero *Aspergillus*, no qual foi avaliada a atividade anticâncer desses compostos. Alguns alcaloides heterocíclicos não apresentaram citotoxicidade para células de câncer de cólon humano multirresistentes (MDR), já outros também avaliados por Xu et al. apresentaram citotoxicidade contra células de leucemia HL-60, mas não apresentaram atividade citotóxica para a linhagem A549, na qual os compostos avaliados no presente estudo apresentaram significativa atividade citotóxica.

Dos derivados indólicos os quais a CI_{50} foi determinada, é possível observar que a inserção do anel aromático no carbono α na estrutura da molécula NM-01-38-29, levou a uma redução do valor da CI_{50} frente a todas as linhagens celulares utilizadas quando comparada aos valores encontrados para o indol e para os outros dois derivados avaliados. Observou-se que a adição do cloro ao anel aromático levou a valores de CI_{50} maiores. Os valores de CI_{50} encontrado para as moléculas NM-01-18-05 e NM-01-38-29 frente a linhagem celular C6 foram semelhantes 0,46 e 0,41 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. No entanto, a molécula NM-01-38-29 apresentou resultados promissores de CI_{50} para todas as três linhagens utilizadas, sendo então a escolhida para os demais ensaios deste trabalho.

O ensaio clonogênico foi realizado com a molécula com menor valor de CI_{50} nesse estudo, a NM-01-38-29 (CI_{50} 0,4 $\mu\text{g/mL}$) frente a linhagem celular C6. Neste ensaio além da concentração de CI_{50} , foram utilizadas duas diferentes concentrações também determinadas com base no valor da CI_{50} . O NM-01-38-29 foi capaz de diminuir significativamente o número de colônias de glioma em relação ao controle sem tratamento. Ramirez e colaboradores (2020) demonstraram que compostos heterocíclicos conseguem inibir a formação de clones por células de glioma. O ensaio de formação de colônias realizado neste estudo foi baseado no descrito por Ramirez e colaboradores (2020), pois tal método é considerado como de escolha para a determinação da morte reprodutiva celular após tratamento com radiação ionizante em glioma. Com base nesses resultados, mais uma vez é possível afirmar o potencial antiproliferativo apresentado por compostos heterocíclicos tais como os utilizados no presente estudo.

Após a confirmação da atividade antiproliferativa pelo ensaio clonogênico do composto frente a linhagem celular C6, foi verificada a capacidade do mesmo em inibir a migração das células pelo ensaio de Wound Healing. A migração de células tumorais é um processo que pode levar ao extravasamento de células tumorais para outros órgãos, levando assim ao aparecimento de tumores secundários ou de metástases (LEE,2008). As células de glioma possuem essa capacidade migratória (XU et al,2014), sendo importante a busca de compostos que além de atividade citotóxica também apresentem atividade contra a migração das células. O NM-01-38-29, conseguiu inibir a migração celular da linhagem C6 de tanto no tempo de 24 quanto no de 48 horas. Logo podemos afirmar que esse composto pode vir a interromper processos importante de metástases. Respostas concentração dependente foram encontradas em estudo com câncer de mama com linhagem celular MDA-MB-231 para ensaio de migração celular com compostos de complexo de rutênio em anéis heterocíclicos (NAVES,2019).

Outro resultado que permite avaliar a perda da capacidade migratória das células são as alterações observadas no citoesqueleto das células, já que o citoesqueleto se encontra envolvido em diversas funções, tais como: sinalização celular, organização das organelas citoplasmáticas, transporte intracelular, dentre outros (SANCHO-MARTÍNEZ *et al.*, 2012). Nos resultados encontrados para a molécula NM-01-39-29 é possível observar alterações no citoesqueleto das células marcadas com FALOIDINA/FITC, dentre as quais podemos citar: alterações na disposição dos feixes de stress quando comparadas a organização apresentada no grupo controle, sem tratamento; perda de volume citoplasmático que pode ser observado em todas as concentrações de tratamento utilizadas, mas principalmente na maior concentração. Tais alterações sugerem que o composto avaliado tanto atua na perda de capacidade migratória das células quanto também são sinais de apoptose celular (NAVES,2019).

Compostos como os de complexo de Rutênio, que possuem associado às suas estruturas anéis aromáticos, como os apresentados na molécula utilizada neste trabalho conseguem induzir a morte por apoptose em células de câncer de mama com alterações celulares semelhantes as apresentadas neste trabalho (NAVES, 2019). Ainda no experimento de fluorescência com a marcação com DAPI, na qual se observa alterações a nível de núcleo, foi possível verificar alterações no núcleo destas células como a condensação da cromatina, que é caracterizada através da maior luminosidade apresentada pelo núcleo da célula corada com o DAPI. Com as sobreposições da marcação de DAPI e FALOIDINA/FITC é possível observar projeções formadas pela membrana das células em formato esférico o que leva a acreditar que está acontecendo morte por apoptose. Todas essas alterações observadas tanto a nível de núcleo

quanto de citoesqueleto culminam em processos que levam a morte celular por diversos mecanismos como sinalização pró-apoptótica, ativação de caspases o que facilita a formação de corpos apoptóticos (SANCHO-MARTÍNEZ et al., 2012).

Em conclusão, os resultados desse trabalho mostram que derivados indólicos sintéticos são uma fonte de possíveis moléculas com atividade citotóxica e antiproliferativa em células tumorais. A molécula NM-01-38-29 apresentou alto grau de inibição, ação antiproliferativa, inibição da migração celular e ainda levou a alterações na estrutura celular das células de glioma C6 que indicam indícios de apoptose. Na literatura temos estudos que descrevem essa mesma atividade para compostos heterocíclicos assim como os utilizados nesse estudo. Os resultados encontrados no trabalho foram bastante promissores, mas é necessário a realização de novas avaliações que busquem aprofundar os mecanismos apresentados por esta molécula.

7- CONCLUSÃO

Os resultados obtidos pelo presente estudo mostraram que das doze moléculas analisadas no *screening* farmacológico, cinco apresentaram grau de inibição maior que 90% em pelo menos uma das três linhagens tumorais avaliadas. A molécula NM-01-38-29 selecionada para os experimentos posteriores demonstrou ter função antiproliferativa frente a linhagem C6, a partir das análises realizadas no experimento de formação de colônias. A molécula ainda demonstrou ter atividade inibitória frente a migração destas células, além disso alterações morfológicas foram observadas como condensação da cromatina, perda do volume citoplasmático e células com indício de apoptose. Os achados deste trabalho revelam o potencial citotóxico da molécula NM-01-38-29 e serve de base para estudos posteriores para melhor elucidação dessa atividade.

8- REFERENCIAS

ABDELHAMID, A., GOMHA, S., ABDELRIHEEM, N., KANDEEL, S. Synthesis of New 3-Heteroarylindoles as Potential Anticancer Agents. **Molecules**, 2016, 21, 929; doi:10.3390/molecules21070929.

ALBERTS, B. J.; LEWIS, A.; RAFF, J. Molecular biology of the cell. 2008. ISBN 0815341059.

ALBUQUERQUE, K. R. S. et al. "Applicability of Plant Extracts in Preclinical Studies of Melanoma: A Systematic Review". **Mediators of Inflammation**, [S.L], v. 2018, ID. 6797924, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2018/6797924>. Acesso em: 13 nov. 2018.

AMARAL, A. T. D. et al. A evolução da química medicinal no brasil: avanços nos 40 anos da sociedade brasileira de química. **Química Nova**, v. 40, n. 694, p. 700, mar. 2017.

ALMEIDA, V. L. D. et al. Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos e Ciclo-Celular Não Específicos que Interagem com o DNA: Uma Introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

ATANASOV, A. G et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review. **Biotechnol**, 2015, v.33, n.8, p. 1582-1614.

BANERJI, B.; PRAMANIK, S K.; SANPHUI, P.; NIKHAR, S.; BISWAS, SC. Synthesis and cytotoxicity studies of novel triazolo-benzoxazepine as new anticancer agentes. **Chem Biol Drug Des**. 2013 Oct;82(4):401-9. doi: 10.1111/cbdd.12164.

BRANDÃO, H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, jun.2010.

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

BISWAL, S.; SAHOO, U.; SETHY, S.; KUMAR, H.K.S.; BANERJEE, M. Indole: the molecule of diverse biological activities. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 5, p. 1-6, 2012.

BOHL, C.R., HARIHAR, S., DENNING, W., SHARMA, R., WELCH, R. Metastasis supressor in breast cancers: mechanistic insights and clinical potential. **J Mol Med (Berl)**, 2014. Disponível em: doi:10.1007/s00109-013-1109-y.

CAETANO-PINTO, P et al. Cetuximab Prevents Methotrexate-induced cytotoxicity in vitro through epidermal growth fator dependente regulation of renal drug transportes. **Molecular Pharmaceutics**, 2017. Disponível em: DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00308.

CAGEL, M. et al. Doxorubicin: nanotechnological overviews from bench to bedside. **Drug Discov Today**, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2016.11.005>.

CIRINO, J. J. V. et al. Estrutura e propriedades de elipticinas. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 30-36, nov. 2005.

CHAO, M., LAI, M., LIOU, J., CHANG, Y., WANG, J., PAN, S., TENG, C. The synergic effect of vincristine and vorinostat in leucemia in vitro and in vivo. **Journal of Hematology & Oncology**, 2015. Disponível em: doi 10.1186/s13045-015-0176-7

DHONG, Z., CUI, H. Epigenetic modulation of metabolismo in glioblastoma. **Seminars in Cancer Biology**. 57 (2019). 45-51.

FANG, K., YANG, C., LIN, T., CHAN, T., TZENG, S. Inducec interleukin33 expression enhances the tumorigenic activity of rat glioma cells. **Neuro-Oncology**, v.16, n.4, p.552-566, 2014.

FARES, J. *et al.* Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, 2020.

FAVALORO, B. et al. Role of apoptosis in disease. **Aging (Albany NY)**, v. 4, n. 5, p. 330-49, May 2012.

FERNANDES, R. A. C. **Citotoxicidade de materiais indicados em proteções pulpares diretas: estudo in vitro.** Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Mestrado integrado em Medicina Dentária, Coimbra, 2014.

FENG, T., WEI, Y., LEE, R J., ZHAO, L. **Liposomal curcumin and its application in cancer.** *Int J Nanomed.* 2017;12:6027. doi: 10.2147/IJN.S132434.

FRANKEN, N. A. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*, v. 1, n. 5, p. 2315-9, 2006.

GALHARDAS, D. J. M. Contribuição para o estudo da Anexina V na apoptose celular em concentrados de eritrócitos. **Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa**, Universidade Atlântica, 2014.

GALLUZI L., VITALE I., KROEMER G. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation* 25, 486-541, 2018.

GAO, Y., BADO, I., WANG, H., ZHANG, W., ROSEN, J.M., ZHANG, X. Metastasis organotropism: redefining the congenial soil. *Dev Cell*, 2019, disponível em: doi:10.1016/j.devcel.2019.04.012.

GIAKOUMETTIS, D., KRITIS, A., FOROGLU, N. C6 cell line: the gold standard in glioma research. *Hippokratia*, v.22, n.3, p.105-112, 2018.

GOMES-CARNEIRO, M R., RIBEIRO-PINTO, L F.; PAUMGARTTEN, F J R. Fatores de risco ambientais para o câncer gástrico: a visão do toxicologista. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 13, n. 1, 1997. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X1997000500004>>. Acesso em: 16 nov. 2018.

GORINI, S., ANGELIS, A., BERRINO, L., MALARA, N., ROSANO, G., FERRANO, E. Chemotherapeutic drugs and mitochondrial dysfunction: focus on Doxorubicin, Trastuzumab and Sunitinib. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2018/7582730>.

GREEN, D. R.; LLAMBI, F. Cell death signaling. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 12, 2015.

GROZAV, A et al. Cytotoxicity antioxidante potencial of novel 2-2((1-H-indol-5yl)methylene)-hydrazinyl)-thiazole Derivatives. **Molecules**, 2017, 22, 260; doi:10.3390/molecules22020260.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa I 2018: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa 2020: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2020.

HANAHAN D., WEINBERG A. R. Hallmarks of Cancer: The next generation. **Cell**, 144, 2011, doi:10.1016/j.cell. 2011.02.013.

HENRIQUE, C; NUNOMURA, S; POHLIT, A. Alcaloides Indólicos de Cascas de *Aspidosperma Vargasii* E A. *Desmanthum*. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 284-287, nov/2010.

HOTCHKISS, R. S. et al. Cell death. **N Engl J Med**, v. 361, n. 16, p. 1570-83, Oct 15 2009.

JANOWSKA, S., PANETH, A., WUJEC, M. Cytotoxic properties of 1,3,4-thiadiazole derivatives – a review. **Molecules**, 2020, 25, 4309; doi:10.3390/molecules25184309.

LEE, H., SEO, E., KANG, N., KIM, W. [6]-Gingerol inhibits metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells. **Journal of Nutritional Biochemistry** 19 (2008) 313–319. doi:10.1016/j.jnutbio.2007.05.008.

LIMA, L M. Química medicinal moderna: desafios e contribuição brasileira. **Química Nova**. 30, n. 6, p. 1456-1468, 2007.

LICHOTA, A., GWOZDZINSKI, K. Anticancer activity of natural compounds from plant and marine environment. **International Journal of Molecular Sciences** 2018, 19, 3533.

LÓPEZ-LÁZARO, M. “The stem cell Division theory of cancer”. **Critical Reviews in Oncology and Hematology**. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.01.01>.

MAJTNEROVÁ, P. ROUSAR, T. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. **Molecular Biology Reports**, 2018.

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

MASSAGUÉ, J. A G1 engine of cyclins and kinases. **Nature**, v. 432:298-306, 2004.

MARTINS, P et al. Heterocycle anticâncer compounds: recente advances and the paradigma shift towards the use of nanomedicine's tool box. **Molecules**, 2015, 20, 16852-16891, doi:10.3390/molecules200916852.

MOHAMED, M. S., BISHR, M. K., ALMUTAIRIN, F. M., ALI, A. G. Inhibitors of apoptosis: clinical implications in cancer. **Apoptosis**, 22(12):1487-1509, 2017.

NAVES, M.A. Transport of the Ruthenium Complex [Ru(GA)(dppe)₂]PF₆ into Triple-Negative Breast Cancer Cells Is Facilitated by Transferrin Receptors. **Molecular Pharmaceutics**, 2019, 16, 1167–1183, DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b01154.

OLSSON, M; ZHIVOTOVSKY, B. Caspases and cancer. **Cell Death and Differentiation.**, p. 1441-1449, set. 2011.

OTTO, T., SICINSKI, P. Cell cycle proteins as promising targets in câncer therapy. **Nature reviews**. V. 17, February, 2017.

PALUMBO, P et al. Involvement of NOS2 activity on human glioma cell growth, clonogenic potential, and neurosphere generation. **International Journal of Molecular Sciences**, 2018. Disponível em: doi:10.3390/ijms1909280.

PEDROSA, S. Síntese, caracterização estrutural e estudos do mecanismo de ação antitumoral de derivados indólicos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.

PARRINO, B et al. 3-[4-(1H-Indol-3-yl)-1,3-thiazol-2-yl]-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridines, Nortopsentin Analogues with Antiproliferative Activity. **Marine Drugs**, 2015, 13, 1901-1924; doi:10.3390/md1304190.

PEDRAZA-FARINA, L. G. Mechanisms of oncogenic cooperation in cancer initiation and metastasis. **Yale J Biol Med**, v. 79, n. 3-4, p. 95-103, Dec 2006.

RAMIREZ-ESCAMILLA, A et al. Autophagy as potencial therapy for malignant glioma. **Pharmaceuticals**, 2020. Disponível em: doi:10.3390/ph13070156.

SANCHO-MARTÍNEZ, S. M. et al. Subcellular targets of cisplatin cytotoxicity: an integrated view. **Pharmacology & therapeutics**, v. 136, n. 1, p. 35-55, 2012.

SEEBACHER, N., STACY, A., PORTER, G., MERLOT, A. Clinical development of targeted and immune based anti-cancer therapies. **Journal of Experimental e Clinical Cancer Research**, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1094-2>.

SUN, J., WEI, Q., ZHOU, Y., WANG, J., LIU, Q., Xu, H. Asystematic analysis of FDA-approved anticancer drugs. **BMC Systems Biology**, 2017. Disponível em: DOI 10.1186/s12918-017-0464-7.

WHITESIDE, T. L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. **Oncogene**, v. 27, n. 45, p. 5904-12, Oct 06 2008.

YARROW, J. C. et al. A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. **BMC Biotechnol**, v. 4, p. 21, Sep 09 2004.

YU, J. et al. Induction of programmed necrosis: A novel anti-cancer strategy for natural compounds. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 214, p. 107593, 2020.

XU, G.; SHI, Y. Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis. **Cell Res**, v. 17, n. 9, p. 759-71, Sep 2007.

XU, C.; WANG, Z.; DAI, L.; CHU, S.; GONG, L.; YANG, M.; LI, Z. Induction of proline-rich tyrosine kinase 2 activation-mediated C6 glioma cell invasion after anti-vascular endothelial growth factor therapy. **Journal of Translational Medicine**, 2014.

ZHENG, K., HE, Z., KITAZATO, K., WANG, Y. Selective autophagy regulates cell cycle in cancer therapy. **Theranostics** 2019, Disponível em: doi: 10.7150/thno.30308.

ZHU, S et al. The Role of Sirtuins Family in Cell Metabolism during Tumor Development. **Seminars in Cancer Biology**, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.11.003>.