

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

JOÃO HENRIQUE OLIVEIRA BONIFACIO

**EFEITO CITOTÓXICO DE UM DERIVADO SINTÉTICO DO INDOL EM LINHAGEM
DE MELANOMA E CARCINOMA DE PULMÃO**

**ARACAJU
2024**

JOÃO HENRIQUE OLIVEIRA BONIFACIO

**EFEITO CITOTÓXICO DE UM DERIVADO SINTÉTICO DO INDOL
EM LINHAGEM DE MELANOMA E CARCINOMA DE PULMÃO**

2024

JOÃO HENRIQUE OLIVEIRA BONIFACIO

**EFEITO CITOTÓXICO DE UM DERIVADO SINTÉTICO DO INDOL EM LINHAGEM
DE MELANOMA E CARCINOMA DE PULMÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof. Dr. Cristiane Bani Correa

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Guimarães Amaral

**ARACAJU
2024**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA SAÚDE – BISAU
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

| | |
|------------|--|
| B715e a | <p>Bonifácio, João Henrique Oliveira</p> <p>Efeito citotóxico de um derivado sintético do indol em linhagem de melanoma e carcinoma de pulmão / João Henrique Oliveira Bonifácio; orientadora Cristiane Bani Correa ; coorientador Ricardo Guimarães Amaral. – Aracaju, 2024. 80 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, 2024.</p> <p>1. Ciências da saúde. 2. Câncer de pulmão. 3. Antineoplásicos. 4. Apoptose. 5. Tratamento do câncer. I. Correa, Cristiane Bani, orient. II. Amaral, Ricardo Guimarães. III. Título.</p> <p>CDU 616.24-006</p> |
|------------|--|

JOÃO HENRIQUE OLIVEIRA BONIFACIO

**EFEITO CITOTÓXICO DE UM DERIVADO SINTÉTICO DO INDOL EM LINHAGEM
DE MELANOMA E CARCINOMA DE PULMÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em: 28/08/2024

Orientadora: Prof(a). Dr(a). Cristiane Bani Correa
Universidade Federal de Sergipe

1ª Examinadora: Prof(a). Dr(a). Audrey Rouse Soares Tavares Silva

2ª Examinadora: Prof(a). Dr(a). Renata Grespan

Dedico esta obra à minha avó, Laudice Henrique de Lima e ao meu avô, José Bonifacio. Vocês que tanto investiram em mim e enxergaram potencial naquele menino que chegou para ser criado por vocês, como se filho fosse. Os perdi nesta trajetória do mestrado, mas os trago no meu coração. No mais comum dos meus dias os vejo presentes.

Dedico ainda aos meus pais, Valdice de Oliveira Batista e José Domingos de Lima Bonifacio, que mesmo com tanta dificuldade nunca mediram esforços para ver seus nove filhos no caminho do bem.

Agradeço a Deus por ter me dado forças para concluir este trabalho. O percurso foi árduo, mas é gratificante perceber onde a dedicação pode nos levar.

Agradeço à minha família na pessoa da minha tia Maria Acácia de Lima Bonifacio. Ela que sempre me ajudou financeiramente e emocionalmente.

Agradeço à minha orientadora Cristiane Bani Correa que me acolheu no LaBICeL desde a iniciação científica. Ela que costuma dizer que os seus alunos são como seus filhos e assim nos faz sentir. Serei sempre grato! Ao mesmo tempo agradeço ao meu coorientador Ricardo Guimarães Amaral por todos os ensinamentos e discussões científicas.

Agradeço ao meu namorado Jhonatan Santana Batista, o trajeto do mestrado se tornou mais leve quando decidimos caminhar juntos.

Por fim e não menos importante, agradeço aos amigos do LaBICeL nas pessoas de Mariana, Rauan, Cristiane e Jileno. A contribuição de vocês foi importante para o andamento deste trabalho. O LaBICeL é uma família acolhedora, unida e extremamente dedicada.

A persistência e a constância são as maiores ferramentas para tornar realidade os sonhos mais lindos que carregamos dentro de nós.

Autoria própria.

RESUMO

O câncer é uma doença multifatorial caracterizada por divisão desordenada das células. O tratamento do câncer é, na maioria das vezes, inespecífico e altamente citotóxico, afetando também células não tumorais. Na busca por novos compostos antineoplásicos, as pesquisas com derivados de produtos naturais têm se mostrado cada vez mais promissoras e revelam a constante evolução da ciência para proporcionar tratamentos com menos efeitos adversos. O Indol é um composto natural encontrado em plantas e microrganismos com comprovada atividade antitumoral. Modificações em sua estrutura podem potencializar a ação citotóxica sobre células tumorais. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial citotóxico do derivado sintético do Indol 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one em linhagens tumorais. Para isso, a sulforodamina B (SRB) foi utilizada para determinar o efeito citotóxico do composto 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one em linhagens de melanoma (B16F10), câncer de pulmão (A549), câncer de mama (MCF7) e câncer de próstata (PC-3). Os ensaios clonogênico e de migração celular foram realizados para analisar a formação de colônias e a capacidade migratória das linhagens A549 e B16F10. O DAPI e a Faloidina/FITC foram utilizados para observar alterações morfológicas nas linhagens A549 e B16F10 após o tratamento com o composto 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one. O tipo de morte celular foi analisado por citometria de fluxo e, em seguida, foi realizado o ensaio de hemólise em eritrócitos humanos e de camundongos C57BL/6. Todos os testes foram realizados em três experimentos independentes e os resultados foram representados como média e intervalos de confiança de 95%. Para análise de comparação entre grupos foi utilizado ANOVA seguida de pós teste de *Dunnett*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos estatisticamente. Como resultados, observamos uma alta inibição do crescimento celular com CI_{50} menor ou igual a 10 μ M nas quatro linhagens estudadas. Os maiores efeitos de inibição foram observados nas linhagens A549 e B16F10 com CI_{50} de 2,6 e 7,6 μ M, respectivamente. As linhagens A549 e B16F10 foram selecionadas para os próximos testes biológicos considerando a CI_{50} e a relevância epidemiológica desses cânceres. No ensaio de formação de colônias, foi observada inibição de clones na linhagem A549 na concentração de 5,2 μ M e na linhagem B16F10 nas concentrações de 3,8 a 15,2 μ M. Na análise de migração observamos que o composto inibiu o fechamento da risca nas linhagens A549 e B16F10 nas maiores concentrações após 48 horas de tratamento. Além disso, foram observadas alterações morfológicas características de apoptose nas linhagens A549 e B16F10 pela marcação com DAPI e Faloidina/FITC como redução citoplasmática e alterações na disposição dos filamentos de actina. Esses resultados corroboram com a citometria de fluxo, na qual foi evidenciado que o tratamento induziu apoptose nas linhagens A549 e B16F10. Não foi observada atividade hemolítica em eritrócitos humanos e de camundongos C57BL/6 após exposição ao composto. Nossos resultados mostram que o tratamento com o composto 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one nas linhagens A549 e B16F10 inibiu o crescimento e a migração celular, além de induzir morte celular por apoptose.

Descritores: Antineoplásicos. Apoptose. Citometria de fluxo. Indóis. Neoplasias.

ABSTRACT

Cancer is a multifactorial disease characterized by disordered cell division. Cancer treatments is often nonspecific and highly cytotoxic, affecting also nontumor cells. In the search for new antineoplastic compounds, research into derivatives of natural products has proved increasingly promising and reveals the constant evolution of science to provide treatments with fewer adverse effects. Indole is a natural compound found in plants and microorganisms with proven anti-tumor activity. Modifications to its structure can potentiate its cytotoxic action on tumor cells. The aim of this study was to evaluate the cytotoxic potential of the synthetic indole derivative 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one in tumor cell lines. For this, sulforhodamine B (SRB) was used to determine the cytotoxic effect of compound 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one in melanoma (B16F10), lung cancer (A549), breast cancer (MCF7) and prostate cancer (PC-3) cell lines. In vitro clonogenic and cell migration assays were carried out to analyze the colony formation and migratory capacity of the A549 and B16F10 cell lines. DAPI and Phalloidin/FITC were used to observe morphological changes in the A549 and B16F10 cell lines after the treatment with compound 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one. The type of cell death was analyzed by flow cytometry and then the hemolysis assay was performed on human and C57BL/6 mouse erythrocytes. All the tests were carried out in three independent experiments and the results were represented as means and 95% confidence intervals. ANOVA followed by Dunnett's post-test was used to analyze comparisons between groups. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. As a result, we observed a high inhibition of cell growth with IC_{50} less than or equal to 10 μM in the four cell lines studied. The greatest inhibition effects were observed in the A549 and B16F10 cell lines with IC_{50} of 2.6 and 7.6 μM , respectively. The A549 and B16F10 cell lines were selected for the next biological tests considering the IC_{50} and the epidemiological relevance of these cancers. In the colony formation assay, clone inhibition was observed in the A549 cell line at a concentration of 5.2 μM and in the B16F10 cell line at concentrations of 3.8 to 15.2 μM . In the migration analysis, we observed that the compound inhibited the closure of the stripe in the A549 and B16F10 cell lines at the highest concentrations after 48 hours of treatment. In addition, morphological changes characteristic of apoptosis were observed in the A549 and B16F10 cell lines by DAPI and Phalloidin/FITC labeling, such as cytoplasmic reduction and changes in the arrangement of actin filaments. These results corroborate flow cytometry, which showed that the treatment induced apoptosis in the A549 and B16F10 cell lines. No hemolytic activity was observed in human erythrocytes and C57BL/6 mouse after exposure to the compound. Our results show that treatment with compound 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one in A549 and B16F10 cell lines inhibited cell growth and migration, as well as inducing cell death by apoptosis.

Descriptors: Antineoplastics. Apoptosis. Flow cytometry. Indoles. Neoplasms.

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------------|---|----|
| Tabela 1 | Linhagens de células utilizadas nos experimentos | 40 |
| Tabela 2 | Valores de CI_{50} determinados para o derivado do Indol 1-(1-tosyl-1 <i>H</i> -indol-3-yl)propan-1-one | 48 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 1 | Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para o triênio de 2023 a 2025 por sexo, exceto pele não melanoma | 23 |
| Figura 2 | Etapas do processo de carcinogênese | 26 |
| Figura 3 | Apoptose e Necrose: características morfológicas e vias de sinalização | 29 |
| Figura 4 | Regra ABCDE para detecção do melanoma | 30 |
| Figura 5 | Estrutura química do Indol | 39 |
| Figura 6 | Composto sintético derivado do Indol 1-(1-tosyl-1 <i>H</i> -indol-3-yl)propan-1-one obtido do Laboratório de Química Farmacêutica da Universidade Federal de Sergipe | 40 |
| Figura 7 | Porcentagem de inibição do crescimento das linhagens B16F10, A549, MCF7 e PC-3 | 47 |
| Figura 8 | Efeito inibitório do 1-(1-tosyl-1 <i>H</i> -indol-3-yl)propan-1-one na formação de colônias | 49 |
| Figura 9 | Efeito inibitório do 1-(1-tosyl-1 <i>H</i> -indol-3-yl)propan-1-one na migração celular | 51 |
| Figura 10 | Alterações morfológicas em células de câncer de pulmão | 53 |
| Figura 11 | Alterações morfológicas em células de melanoma | 54 |
| Figura 12 | Análise de citometria de fluxo após tratamento com o composto 1-(1-tosyl-1 <i>H</i> -indol-3-yl)propan-1-one por 24 horas | 56 |
| Figura 13 | Ensaio de hemólise em eritrócitos | 58 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL - Microlitro

μM - Micromolar

A10 - Linhagem híbrida: linfócito B

A549 - Linhagem de carcinoma de pulmão

AHIM - Anemia hemolítica induzida por medicamentos

ANOVA - Análise de variância

Apaf-1 - Fator ativador de protease apoptótica 1

B16F10 - Linhagem de melanoma

Bak - Proteína Bak

Bax - Proteína Bax

Bcl-2 - *B-cell lymphoma 2*

BH3 - Proteínas

BRAF - Isoforma B da proteína RAF

BRCA1 - Gene supressor de tumor BRCA1

BRCA2 - Gene supressor de tumor BRCA2

BxPC-3 - Linhagem de câncer de pâncreas

C4-2B - Linhagem de câncer de próstata

C57BL/6 - Linhagem de camundongo de laboratório

C6 - Linhagem de glioma

CD11 - Glicoproteína CD11

CD14A - Receptor de reconhecimento padrão CD14A

CDKs - Quinases dependentes de ciclinas

CH₂Cl₂ - Diclorometano

CI₅₀ - Concentração Inibitória para 50% das células

CO₂ - Dióxido de Carbono

CONITEC - Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde

DAPI - 4',6'-diamino-2-fenil-indol

DMEM - *Dulbeccos's Modified Eagle Medium*

DMO - Departamento de Morfologia

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DOXO - Cloridrato de Doxorrubicina

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*

EGFR - Receptor do fator de crescimento epidérmico

ERG - Oncogene ERG da família dos ETS

ETS - *Erythroblast transformation-specific*

Faz - Receptor FAS

FasL - Faz ligante

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

G - Grama

G0 - Intervalo 0, quiescência

G1 - Intervalo 1

G2 - Intervalo 2

GBM - Grupo Brasileiro de Melanoma

GI₅₀ - Grau de Inibição para 50% das células

GLOBOCAN - *Global Cancer Observatory*

HeLa - Linhagem de câncer do colo do útero

HepG2 - Linhagem de hepatócito

HL-60 - Linhagem de leucemia promielocítica aguda

HT29 - Linhagem de câncer de colo humano

HT-29 - Linhagem de câncer de cólon

IARC - *International Agency for Research on cancer*

IL-2 - Interleucina-2

IL- β - Interleucina-1 beta

INCA - Instituto Nacional do Câncer

IUPAC - União Internacional da Química Pura e Aplicada

L1210 - Linhagem de leucemia

LLC-PK1 - Células do epitélio tubular proximal do rim

LNCaP - Linhagem de câncer de próstata

LQF - Laboratório de Química Farmacêutica

M - Mitose

MCF7 - Linhagem de câncer de mama

MDA-MB-23 - Linhagem de carcinoma de mama triplo-negativo

MEK - MAPK/ERK quinase

mg - Miligrama

mL - Mililitro

mmol - Milimol

MYC - Oncogene MYC

NaCl - Cloreto de sódio

NaOH - Hidróxido de Sódio

NF-κB - Fator nuclear Kappa-B

1-(1-tosyl-1H-indol-3-yl)propan-1-one - Composto derivado sintético do Indol

°C - Grau Célsius

OIT - Organização Internacional do Trabalho

p21 - Proteína 21

p53 - Proteína 53

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

PC-3 - Linhagem de câncer de próstata

PET-CT - Exame com radiofármacos para detectar e acompanhar tumores

PET-SCAN - Teste de imagens para avaliar funções de órgãos e tecidos

pH - Potencial Hidrogeniônico

PI - Iodeto de Propídeo

PM - Peso Molecular

RB - Proteína de retinoblastoma

RNA - Ácido ribonucleico

ROS - Espécies reativas de oxigênio

RPM - Rotação por minuto

SBC - Sociedade Brasileira de Cancerologia

SFB - Soro Fetal Bovino

SH-SY5Y - Linhagem de neuroblastoma

SRA - Sistema renina-angiotensina

SRB - Sulforodamina B

STAT1 - Transdutor de sinal e ativador da transcrição 1

STAT2 - Transdutor de sinal e ativador da transcrição 2

TLC - Cromatografia em camada delgada

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

TP53 - Gene supressor de tumor 53

TsCl - Cloreto de 4-Toluenossulfonila

U/mL - Unidades Internacionais por mililitro

U-937 - Linhagem de linfoma histiocitário

UFS - Universidade Federal de Sergipe

μ g - Micrograma

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 19 |
| 2 | OBJETIVOS | 21 |
| 2.1 | Objetivo geral | 21 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 21 |
| 3 | REVISÃO DE LITERATURA | 22 |
| 3.1 | Aspectos gerais e epidemiológicos do câncer | 22 |
| 3.2 | Biologia do câncer | 25 |
| 3.3 | Melanoma | 30 |
| 3.4 | Câncer de pulmão | 32 |
| 3.5 | Produtos naturais e sintéticos no tratamento do câncer | 35 |
| 3.5.1 | Indol e derivados Indólicos | 37 |
| 4 | CASUÍSTICA E MÉTODOS | 39 |
| 4.1 | Insumos | 39 |
| 4.2 | Derivado sintético do Indol 1-(1-tosyl-1 <i>H</i> -indol-3-yl)propan-1-one | 39 |
| 4.2.1 | Preparo da amostra | 39 |
| 4.3 | Cultivo e manutenção das linhagens tumorais | 40 |
| 4.4 | Testes <i>in vitro</i> | 41 |
| 4.4.1 | Avaliação da viabilidade celular por Sulforodamina B | 41 |
| 4.4.2 | Ensaio de formação de colônias | 42 |
| 4.4.3 | Ensaio de migração celular <i>in vitro</i> | 42 |
| 4.4.4 | Ensaio de alterações morfológicas com Dapi/Phalloidina-FITC | 43 |
| 4.4.5 | Detecção de células apoptóticas e necróticas por Anexina V / Iodeto de Propídeo | 44 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 4.5 | Teste <i>ex vivo</i> | 45 |
| 4.5.1 | Citotoxicidade em eritrócitos – Teste de Hemólise | 45 |
| 4.6 | Análise estatística | 46 |
| 5 | RESULTADOS | 47 |
| 5.1 | Inibição do crescimento celular em linhagens tumorais pelo 1-(1-tosyl-1<i>H</i>-indol-3-yl)propan-1-one | 47 |
| 5.2 | Inibição da formação de colônias em células A549 e B16F10 pelo 1-(1-tosyl-1<i>H</i>-indol-3-yl)propan-1-one | 48 |
| 5.3 | Inibição da migração das células A549 e B16F10 pelo 1-(1-tosyl-1<i>H</i>-indol-3-yl)propan-1-one | 50 |
| 5.4 | Indução de alterações morfológicas em células A549 e B16F10 pelo 1-(1-tosyl-1<i>H</i>-indol-3-yl)propan-1-one | 52 |
| 5.5 | Indução de apoptose em células A549 e B16F10 pelo 1-(1-tosyl-1<i>H</i>-indol-3-yl)propan-1-one | 55 |
| 5.6 | Avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos pelo 1-(1-tosyl-1<i>H</i>-indol-3-yl)propan-1-one | 57 |
| 6 | DISCUSSÃO | 59 |
| 7 | CONCLUSÃO | 63 |
| | REFERÊNCIAS | 64 |
| | Anexo 1 – Comitê de Ética no Uso de Animais da UFS | 73 |
| | Anexo 2 – Comitê de Ética em Pesquisa da UFS | 74 |

1 INTRODUÇÃO

O termo câncer refere-se a um grupo de doenças com alta incidência e mortalidade no mundo, sendo a segunda maior causa de óbitos dentre as doenças não-infecciosas (Diori Karidio *et al.*, 2021). No Brasil são estimados 704 mil novos casos de câncer para o triênio 2023 a 2025, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA).

O câncer é caracterizado por uma proliferação celular descontrolada e ocorre a partir de uma mutação genética nos proto-oncogenes que quando ativados, tornam-se responsáveis por transformar as células normais em cancerosas (INCA, 2020). Estas mutações podem ser induzidas por fatores externos como a exposição a radiações, exposição a produtos químicos, vírus, consumo de álcool, tabagismo, alimentação inadequada e sedentarismo, além de fatores genéticos relacionados à hereditariedade (Prado, 2014).

A cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia são considerados a base do tratamento do câncer (Guerra *et al.*, 2019). Mesmo que comprovada a eficácia desses tratamentos, os efeitos adversos dos fármacos afeta diretamente a qualidade de vida dos pacientes, principalmente se tratando da quimioterapia e da radioterapia. Náuseas, vômitos, dores nas articulações e diarreia são conhecidos por quase sempre estarem presentes em pacientes que recebem uma administração de quimioterapia (Silva *et al.*, 2022). Além disso, a baixa seletividade dos fármacos administrados no tratamento do câncer acaba por destruir também células não-tumorais.

Tendo em vista as taxas de incidência e prevalência do câncer, assim como a heterogeneidade da doença associada a quimiorresistência apresentada ao tratamento com antineoplásicos tradicionais torna-se evidente a necessidade da busca por novas substâncias, protocolos e associações que apresentem especificidade às células tumorais e baixa toxicidade às células não-tumorais para um tratamento mais assertivo e com menos efeitos adversos.

Na busca por novos compostos, os produtos naturais constituem uma importante fonte de moléculas biologicamente ativas sendo que cerca de 40% dos fármacos aprovados para comercialização têm origem natural. No câncer, 64,9% dos fármacos antineoplásicos existentes são oriundos de fontes naturais (Newman & Cragg, 2020).

Entre os produtos naturais, o Indol é um composto orgânico heterocíclico aromático encontrado em vegetais da família *Brassicaceae* como o brócolis, na flor de laranjeira e em compostos marinhos (Biswal *et al.*, 2012). Ele é o precursor de diversos insumos farmacêuticos ativos e componente estrutural que dá fragrância a diversas estruturas florais (Biswal *et al.*, 2012). O Indol possui efeito comprovado em linhagens tumorais de glioma, adenocarcinoma de pulmão, melanoma (Andrade *et al.*, 2024) e mama (Kelly *et al.*, 2016).

É crescente o número de pesquisas com derivados sintéticos de compostos naturais para o tratamento do câncer. Tais derivados sintéticos com atividade biológica ativa comprovada podem apresentar perfis cinéticos melhorados em relação às suas moléculas de origem. Nestes casos, pode ser modificado, por exemplo, o perfil de absorção, bem como aumentar a citotoxicidade sobre células tumorais e diminuir os efeitos tóxicos sobre células não-tumorais, aumentando sua seletividade e potência (Ottoni *et al.*, 2013).

Estudos do nosso grupo de pesquisa mostram que os derivados Indólicos apresentam uma alta atividade citotóxica em linhagens de carcinoma de pulmão, melanoma e glioma (Andrade *et al.*, 2024). Dando continuidade à investigação do efeito antitumoral de derivados Indólicos, esse trabalho teve como objetivo avaliar o potencial citotóxico do derivado sintético do Indol 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one nas linhagens de carcinoma de pulmão (A549), melanoma (B16F10), mama (MCF7) e próstata (PC-3).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial citotóxico do derivado sintético do Indol 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one em linhagens tumorais.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o grau de inibição celular do composto nas linhagens B16F10, A549, MCF7 e PC-3.
- Determinar a Concentração Inibitória para 50% das células (CI_{50}) do composto nas linhagens B16F10, A549, MCF7 e PC-3.
- Avaliar o efeito do composto na formação de colônias e na migração das linhagens A549 e B16F10.
- Analisar alterações morfológicas nas linhagens A549 e B16F10 após tratamento com o composto.
- Determinar o tipo de morte celular nas linhagens A549 e B16F10 após tratamento com o composto.
- Avaliar a citotoxicidade do composto em eritrócitos humanos e eritrócitos de camundongos C57BL/6.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aspectos gerais e epidemiológicos do câncer

Câncer é um termo usado para um conjunto de mais de 100 tipos de doenças e que tem em comum o crescimento desordenado de células. Entre os diferentes tipos de câncer, os adenocarcinomas são classificados como tumores malignos que se originam nas células epiteliais ou glandulares com forte tendência a invadir tecidos vizinhos. Os mais comuns entre todos os adenocarcinomas são os cânceres de mama, pulmão, bexiga, próstata, pele, estômago, ovário e pâncreas (INCA, 2023; Prado, 2014).

Do ponto de vista epidemiológico, o aumento gradual no número de casos de câncer pode ser explicado pelo aumento da população idosa, de 47 anos (1950 – 1955) para cerca de 72 anos (2015 – 2020). O envelhecimento da população tem sido acompanhado por mudanças no comportamento, na dieta e na exposição a poluentes ambientais. Além disso, o sucesso de ações para o controle de doenças infecciosas também contribui na mudança do perfil de morte para as causadas por doenças crônicas não transmissíveis (Van *et al.*, 2023; Martins *et al.*, 2021; Wild *et al.*, 2020).

No mundo são estimados para o ano de 2025, 21 milhões de novos casos e 10 milhões de mortes por câncer, de acordo com o *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN). Na estimativa de novos casos de câncer, os mais prevalentes serão os cânceres de traqueia, brônquios e pulmão com 2.661.254 casos, mama com 2.454.864 casos, cólon e reto com 2.064.415 casos e próstata com 1.507.067 novos casos. Para o melanoma, estima-se 353.947 novos casos. Já os cânceres mais mortais estimados para 2025 são os cânceres de traqueia, brônquios e pulmão com 1.946.870 mortes, cólon e reto com 966.099 mortes, câncer dos ductos biliares hepáticos e intra-hepáticos com 809.259 mortes e o câncer de mama com 715.156 mortes. Estima-se 62.551 mortes por melanoma e 416.922 mortes por câncer de próstata (GLOBOCAN, 2022).

No Brasil, o câncer de pele não melanoma é estimado como o mais incidente para o triênio de 2023 a 2025 com 220 mil novos casos (31,3%), seguido pelos cânceres de mama com 74 mil (10,5%); próstata com 72 mil (10,2%); cólon e reto com 46 mil (6,5%); pulmão com 32 mil (4,6%); e estômago com 21 mil (3,1%) novos casos (Figura 1). No Nordeste são estimados 152.930 novos casos de câncer e, para o

estado de Sergipe, são estimados 6.450 novos casos para cada ano do triênio de 2023 a 2025 (INCA, 2022).

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para o triênio de 2023 a 2025 por sexo, exceto pele não melanoma.

| Localização Primária | Casos | % | | | Localização Primária | Casos | % |
|-----------------------------|--------|-------|--------|----------|-----------------------------|--------|-------|
| Próstata | 71.730 | 30,0% | Homens | Mulheres | Mama feminina | 73.610 | 30,1% |
| Cólon e reto | 21.970 | 9,2% | | | Cólon e reto | 23.660 | 9,7% |
| Traqueia, brônquio e pulmão | 18.020 | 7,5% | | | Colo do útero | 17.010 | 7,0% |
| Estômago | 13.340 | 5,6% | | | Traqueia, brônquio e pulmão | 14.540 | 6,0% |
| Cavidade oral | 10.900 | 4,6% | | | Glândula tireoide | 14.160 | 5,8% |
| Esôfago | 8.200 | 3,4% | | | Estômago | 8.140 | 3,3% |
| Bexiga | 7.870 | 3,3% | | | Corpo do útero | 7.840 | 3,2% |
| Laringe | 6.570 | 2,7% | | | Ovário | 7.310 | 3,0% |
| Linfoma não Hodgkin | 6.420 | 2,7% | | | Pâncreas | 5.690 | 2,3% |
| Fígado | 6.390 | 2,7% | | | Linfoma não Hodgkin | 5.620 | 2,3% |

* Números arredondados para múltiplos de dez. **Fonte:** Adaptado de INCA, 2022.

No Brasil, estima-se que para cada ano do triênio de 2023 a 2025, os tipos de câncer mais frequentes em homens serão pele não melanoma com 102 mil (29,9%); próstata com 72 mil (21,0%); cólon e reto com 22 mil (6,4%); pulmão com 18 mil (5,3%); estômago com 13 mil (3,9%); e cavidade oral com 11 mil (3,2%) novos casos. Nas mulheres os cânceres de pele não melanoma com 118 mil (32,7%); mama com 74 mil (20,3%); cólon e reto com 24 mil (6,5%); colo do útero com 17 mil (4,7%); pulmão com 15 mil (4,0%); e tireoide com 14 mil (3,9%) serão os mais frequentes (INCA, 2022).

De acordo com o *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN) e a *International Agency for Research on Cancer* (IARC), no ano de 2022, 227.750 pessoas morreram por câncer no Brasil. O câncer mais letal foi o de traqueia, brônquios e pulmão, 38.292 óbitos, seguido dos cânceres de cólon e reto, 28.884 óbitos; mama, 22.189 óbitos; próstata, 19.958 óbitos; estômago, 18.138 óbitos e pâncreas 12.294 óbitos. 2.273 pessoas morreram no ano de 2022 decorrentes do câncer de pele melanoma no Brasil. Destes, 1.317 foram do sexo masculino e 956 do sexo feminino (GLOBOCAN, 2022).

Em Sergipe, o maior número de óbitos foi registrado para o câncer de mama, 180 óbitos. Na sequência estão os cânceres de traqueia, brônquio e pulmão, 160 óbitos; próstata, 153 óbitos; cólon e reto, 107 óbitos; pâncreas 94 óbitos e estômago 92 óbitos. Foram registrados 32 óbitos relacionados a neoplasias malignas da pele.

Na população masculina os cânceres com maior número de óbitos foram próstata; traqueia, brônquios e pulmão e estômago. Na população feminina, os cânceres com maior número de óbitos foram mama; traqueia, brônquios e pulmão e cólon e reto (GLOBOCAN, 2022).

Os tratamentos mais comuns empregados no câncer são a radioterapia, a quimioterapia e cirurgias. Em muitos casos, há combinação de mais de uma dessas modalidades de tratamento. Há também tratamentos como transplante de medula óssea, imunoterapia, hormonioterapia, drogas antiangiogênicas, proteínas imunoregulatórias, reguladores do ciclo celular e inibidores de enzimas (De Francisco *et al.*, 2019).

A radioterapia faz uso de radiação ionizante com o intuito de destruir células tumorais em seu local de replicação. No entanto, sabe-se que a radiação ionizante não tem apenas ação local, mas também efeitos sistêmicos, modulando muitas vias de sinalização molecular (Carvalho *et al.*, 2018). Além disso, os efeitos da radiação no tecido ósseo, estão bem descritos, porém ainda não se sabe completamente quais alterações metabólicas ocorrem pós-irradiação (Novaes, 2018). A cirurgia oncológica, consiste na retirada do tumor, que uma vez indicada, sua intenção é remover totalmente o tumor (INCA, 2020).

Na quimioterapia são utilizados fármacos que agem sobre as células tumorais. Suas administrações podem se dar por via oral, intravenosa, intramuscular, subcutânea, intratecal e tópica. A quimioterapia possui efeito sistêmico e, apesar da comprovada eficácia no tratamento do câncer, ela apresenta efeitos adversos significativos como queda de cabelo, prisão de ventre, diarreias, feridas na boca, enjoos e vômito, hiperpigmentação, anemia, leucopenia e trombocitopenia (INCA, 2020).

Os quimioterápicos são classificados de acordo com a sua interação com o DNA em agentes alquilantes, agentes metabólitos e antibióticos antitumorais. Os agentes alquilantes causam alterações nas cadeias de DNA, impedindo sua replicação, sendo capazes de destruir células em repouso ou em processo de divisão ativa. Os agentes antimetabólitos, atuam sobre células em fase de síntese do DNA, pois, incorporam-se a célula e bloqueiam a produção das enzimas necessárias à síntese de substâncias fundamentais. Estão divididos em análogos das purinas, do

ácido fólico e das pirimidinas (Andrade *et al.*, 2007; Bonassa *et al.*, 2005; Machado *et al.*, 2000; Fonseca *et al.*, 2000).

Os antibióticos antitumorais interferem na síntese dos ácidos nucléicos com consequente impedimento da duplicação e separação das cadeias de DNA e RNA. Os alcaloides agrupam os inibidores mitóticos e os inibidores da topoisomerasas, uma enzima necessária para o término da replicação do DNA. O que se observa é que os fármacos antineoplásicos utilizados na quimioterapia podem ser tóxicos a qualquer tecido com alta atividade mitótica e ciclo celular curto, sendo eles normais ou cancerosos, e deste modo, tem como consequência o aparecimento dos efeitos adversos (Andrade *et al.*, 2007; Bonassa *et al.*, 2005; Machado *et al.*, 2000; Fonseca *et al.*, 2000).

3.2 Biologia do câncer

A carcinogênese é caracterizada como o processo de mutações em genes que controlam a proliferação celular, a morte celular e os reparo no DNA. Ela é dividida em três processos, o de iniciação, de promoção e de progressão do tumor (Oliveira *et al.*, 2007; INCA, 2022).

No estágio de iniciação, os genes sofrem mutações por meio da ação de agentes cancerígenos. No estágio de promoção, as células com genes mutados sofrem o efeito dos agentes cancerígenos oncopromotores. É nesse estágio que de forma lenta e gradual a célula é transformada em maligna. Para a transformação da célula em maligna, é necessário o contato continuado com o agente cancerígeno promotor. No estágio de progressão ocorre a multiplicação descontrolada das células mutadas. Nesse estágio, o câncer já está instalado, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença (Oliveira *et al.*, 2007; INCA, 2022) (Figura 2).

No processo de carcinogênese duas classes de genes ganham evidência, os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor. Os proto-oncogenes são genes ligados ao processo de estimulação do crescimento celular e os genes supressores de tumor são responsáveis pela regulação da divisão celular (Voskarides *et al.*, 2023; Oliveira *et al.*, 2007).

Figura 2. Etapas do processo de carcinogênese.



Fonte: Adaptado de Oliveira, 2002. Tese de doutorado, UNESP.

O gene ERG é um exemplo de proto-oncogene da família de fatores de transcrição ETS. Estima-se que a superexpressão do gene ERG é atribuída a 85% dos casos de câncer de próstata (Tomlins *et al.*, 2008). Além disso, pesquisas mostram que estágios tumorais avançados, mortalidade aumentada e maiores taxas de metástase em coortes estão relacionados com a superexpressão do gene ERG em cânceres epiteliais, leucemias e sarcoma de Ewing (Adamo *et al.*, 2016; Hagglof *et al.*, 2014).

Como exemplo de gene supressor de tumor, o gene TP53 que codifica a proteína p53, é considerado um dos genes supressores de tumor mais importantes. Ele atua como um fator de transcrição, está envolvido no reparo do DNA, senescência, controle do ciclo celular, morte celular por autofagia e morte celular por apoptose. Mutações na p53 são relatadas em pelo menos 50% dos tumores (Voskarides *et al.*, 2023). Tais mutações são comumente encontradas em conjunto com mutações hereditárias e espontâneas no gene BRCA1 ou BRCA2 em tumores de ovário e mama. 70 a 90% dos cânceres com mutações no gene BRCA1 também têm mutações no gene TP53. Isto pode ser explicado porque mutações no gene TP53 frequentemente ocorrem com mutações em genes de reparo de danos ao DNA.

Mutações no gene TP53 também são frequentemente observadas em tumores de pulmão, cólon e pâncreas com mutações no Sistema renina-angiotensina (SRA) (Levine, 2021; Weistein *et al.*, 2013; Muzny *et al.*, 2012).

A modulação dos reguladores do ciclo celular é usada por células tumorais para reprogramar a divisão celular. Assim, a diminuição de genes supressores de tumor, como as proteínas p53 e Retinoblastoma (RB), ou o aumento dos níveis de proto-oncogenes, como MYC e receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), estão comumente associados à formação de tumores (Cordon-Cardo, 1995; Soussi *et al.*, 2000). Outro fator associado à formação de tumores é a evasão de células mutadas aos mecanismos de morte celular. Em tecidos normais, as células passam por processos de divisão e de morte celular. Esses processos são importantes para manter a homeostase do tecido (Gabriel *et al.*, 2017; Teixeira *et al.*, 2010; McGavin *et al.*, 2009).

O processo de divisão celular está inserido no ciclo celular. O ciclo celular é dividido em duas fases, a interfase, subdividida nos períodos G0, G1, S e G2 e a mitose (M), o processo de divisão celular propriamente dito. No período G1 a célula passa por processos que definem se ela vai entrar no período S, no qual ocorre a síntese do DNA, ou se ela permanecerá quiescente, no período G0. No período G2 a célula produz proteínas, organelas e reorganiza o seu conteúdo para a mitose (Hanahan *et al.*, 2011, 2000).

Todo o ciclo celular é coordenado por quinases dependentes de ciclinas (CDKs) que são reguladas por genes supressores de tumor, como o p53 e RB. Pontos de checagem nos períodos G1/S, G2/M e M garantem a integridade dos eventos que ocorrem durante todo o mecanismo de divisão da célula, como a integridade do material genético. No período G0, a ciclina D1 se liga às quinases 4 e 6 e regulam a progressão do ciclo celular para o período G1. No período G1, a ciclina-CDK fosforila o RB permitindo que o ciclo celular avance para o período S. A CDK2 induz pontos de verificação nas transições G1 para S e G2 para M por fosforilação de p53, o que leva à parada do ciclo celular através da ativação do inibidor de CDK p21, caso algum erro seja detectado. Caso o erro persista, a p53 pode conduzir a célula para a via de morte celular apoptótica para prevenir a formação de tumores (Giacinti *et al.*, 2006; Flores, 2005; Levine, 1997; Sherr *et al.*, 2002). Mutações na p53 causa a perda da função regulatória do gene e conseqüente incapacidade de inibir a formação do câncer.

O mecanismo de morte celular, por sua vez, é caracterizado pela perda da integridade da membrana plasmática e pela fragmentação do núcleo celular. Os principais mecanismos de morte celular descritos na literatura são a apoptose, a necrose e a autofagia. A autofagia é um mecanismo de morte celular importante porque se manifesta com extensa vacuolização citoplasmática e culmina em captação fagocitária e degradação lisossômica (Kroemer *et al.*, 2007; Galluzzi *et al.*, 2018).

A apoptose é caracterizada por retração citoplasmática, condensação da cromatina, fragmentação nuclear e desintegração da membrana plasmática, culminando com a formação dos corpos apoptóticos que são eficientemente absorvidos por células vizinhas com atividade fagocítica e degradadas dentro dos lisossomos (Kroemer *et al.*, 2007; GalluzKzi *et al.*, 2018). A apoptose é importante no câncer porque a doença tem como característica principal a evasão aos mecanismos de morte celular, além de evadir-se aos mecanismos de controle do ciclo celular. A apoptose pode ser ativada por duas principais vias de sinalização, a via intrínseca e a via extrínseca.

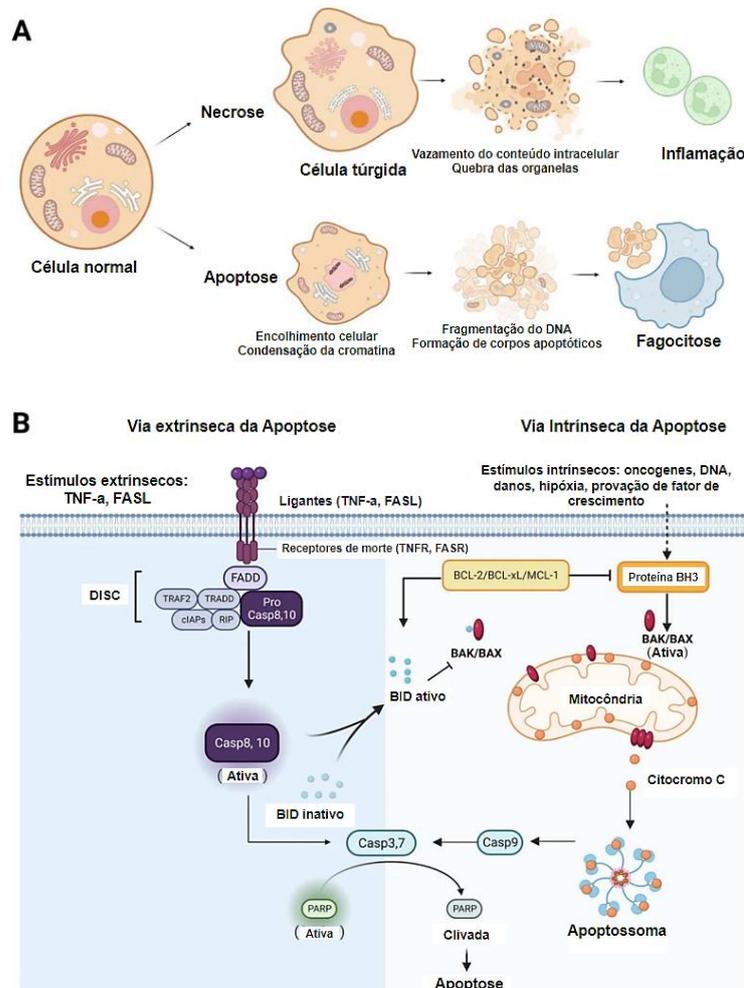
A via intrínseca da apoptose é iniciada por uma variedade de alterações intracelulares, incluindo a retirada de fatores de crescimento, danos ao DNA, estresse de retículo endoplasmático, sobrecarga de espécies reativas de oxigênio, estresse de replicação, alterações microtubulares ou defeitos mitóticos (Roos *et al.*, 2016; Brumatti *et al.*, 2010). A via intrínseca é regulada pela família de proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL, proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak e proteínas BH3. Em resposta ao estresse intracelular, a ativação de proteínas pró-apoptóticas BH3 inibe as proteínas antiapoptóticas, permitindo que Bax e Bak formem poros mitocondriais e liberem citocromo c no citosol. O citocromo c liberado forma um apoptossoma com fator ativador de protease apoptótica 1 (Apaf-1) e ativa a caspase-9, que inicia uma cascata proteolítica (Czabotar *et al.*, 2014; Kluck *et al.*, 1997; Ow *et al.*, 2008).

A via extrínseca da apoptose é ativada por ligantes extracelulares, como o fator de necrose tumoral [TNF]- α e ligante Fas-FasL, que se ligam aos receptores de morte, TNF e Fas, respectivamente. Depois que ligantes extracelulares se ligam aos receptores de morte, complexos de sinalização indutores de morte (DISC) são formados, recrutam e ativam caspases iniciadoras, como caspase-8 e caspase-10. Essas caspases iniciadoras clivam e ativam caspases efetoras, como as caspases-3,

6 e 7, levando à degradação de componentes intracelulares e à indução de apoptose (Wajant *et al.*, 2002; Locksley *et al.*, 2001; Ashkenazi *et al.*, 2002; Riedl *et al.*, 2004).

A necrose é um mecanismo de morte celular desencadeado por uma injúria irreversível, como a falta de oxigênio para as células, temperaturas extremas, medicamentos, em resposta a lesões teciduais, traumas e infecções. Os mecanismos celulares que levam à necrose geralmente envolvem uma série de eventos que culminam com quebra de componentes celulares e no extravasamento do conteúdo celular no espaço extracelular (Berghe *et al.*, 2014; Khalid *et al.*, 2024; Golstein *et al.*, 2007). A necrose resulta em uma resposta inflamatória devido ao extravasamento do conteúdo celular no espaço extracelular, como proteínas, enzimas e nucleotídeos. Isso atrai células do sistema imune, como neutrófilos, macrófagos e linfócitos, para o local de ruptura das células.

Figura 3: Apoptose e necrose: características morfológicas e vias de sinalização.



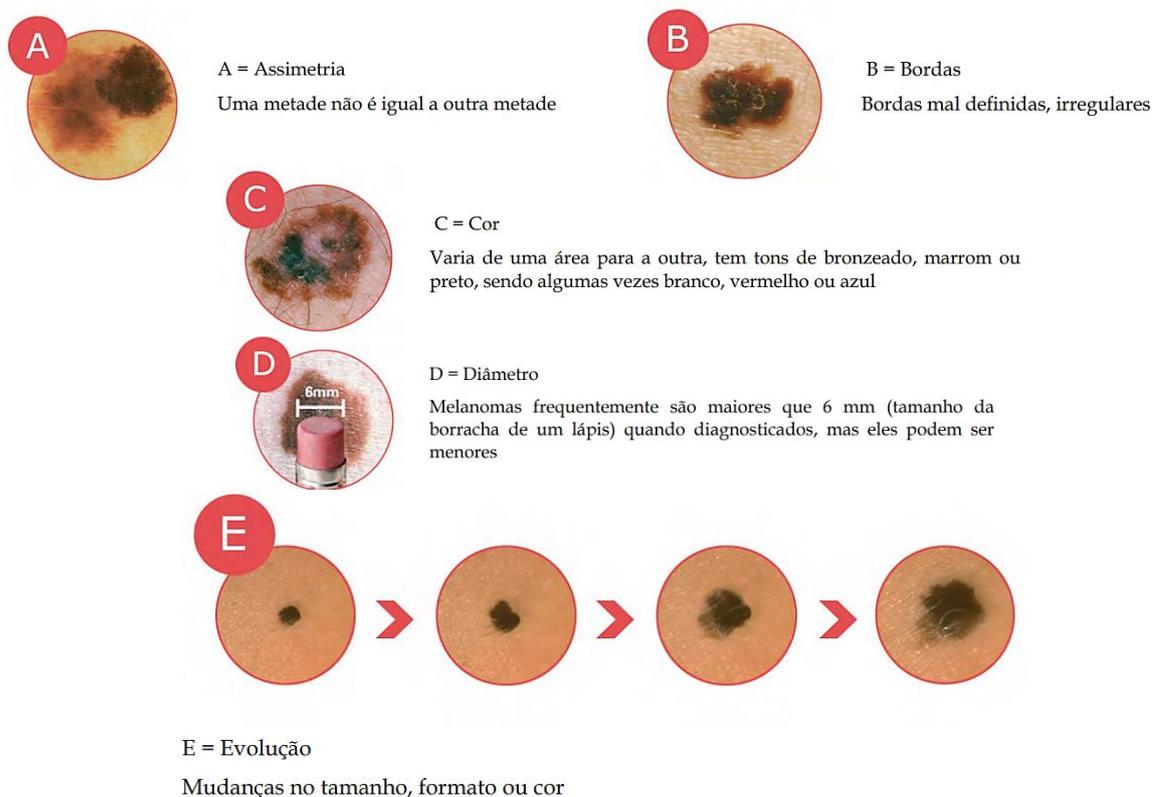
Fonte: Adaptado de Park *et al.*, 2023.

3.3 Melanoma

O câncer de pele melanoma tem origem nos melanócitos que são células produtoras de melanina. Esse câncer apesar da baixa incidência, é considerado o tipo de câncer de pele mais agressivo, pois possui uma alta capacidade de metástase (INCA, 2020; Guerra *et al.*, 2019). A incidência do câncer de pele melanoma está aumentando rapidamente em todo o mundo, o que resulta em problemas de saúde pública (Ahmed *et al.*, 2020).

Clinicamente os melanomas são classificados em quatro tipos: o extensivo superficial, o nodular, o lentiginoso acral e o lentigo maligno melanoma. Histopatologicamente, os estágios variam de 0 a 4, sendo o estágio 0 o menos agressivo, denominado melanoma “in situ”. Daí em diante classifica-se de 1 a 4 sendo este último o mais grave. O Instituto Nacional do Câncer direciona a avaliação de características de sinais e pintas na regra “ABCDE”: Assimetria, Bordas irregulares, Cor variável, Diâmetro e Evolução (INCA, 2022) (Figura 3).

Figura 4: Regra ABCDE para detecção do melanoma.



Fonte: Adaptado de *American Academy of Dermatology Ad Hoc Task Force for the Abcdes Of Melanoma et al.*, 2015.

O câncer de pele melanoma é mais comum em adultos brancos e se apresenta como pintas ou manchas que surgem na pele normal ou sobre uma lesão pigmentada preexistente, ocorrendo alterações em sua coloração, forma e aumento de tamanho, bem como bordas irregulares. Alguns melanomas podem apresentar cor rosa, bege ou branco (NICE, 2023; INCA, 2022).

Para todos os tipos de câncer de pele, a ocorrência é fortemente associada à radiação ultravioleta, que induz a lesões cumulativas no DNA, e aos fatores hereditários (INCA, 2022; GBM, 2023). Se tratando do câncer de pele melanoma, ainda podem ser citadas as radiações ultravioletas não naturais, como lâmpadas e camas solares (Wild *et al.*, 2020). Em relação ao câncer de pele não melanoma, alguns fatores associados são idade, já que acomete mais pessoas idosas, sexo e ocupação, como a produção e manuseio de óleo mineral não tratado, metalurgia, produção e manuseio de alcatrão de carvão, refinamento do petróleo, limpeza de chaminés e brigadas de incêndio (INCA, 2022; Wild *et al.*, 2020).

No Brasil, são estimados 101.920 novos casos em homens e 118.570 casos em mulheres de câncer de pele não melanoma, para cada ano do triênio de 2023 a 2025. Quanto ao câncer de pele melanoma, o número de casos novos estimados para cada ano do triênio de 2023 a 2025 é de 8.980, sendo 4.640 em homens e 4.340 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 4,37 novos casos a cada 100 mil homens e 3,90 a cada 100 mil mulheres. O câncer de pele melanoma é mais incidente na Região Sul do país, quando comparado com as demais regiões, para ambos os sexos (INCA, 2022).

No Nordeste são estimados 42.800 novos casos de câncer de pele não-melanoma e 1.220 novos casos de câncer de pele melanoma. A estimativa de novos casos por sexo é de 19.420 homens e 23.380 mulheres para o câncer de pele não-melanoma e 640 homens e 580 mulheres para o câncer de pele melanoma. Para o estado de Sergipe, são estimados 2.080 novos casos de câncer de pele não-melanoma (1.000 homens e 1.080 mulheres) e 50 casos de câncer de pele melanoma (30 homens e 20 mulheres) para cada ano do triênio de 2023 a 2025. O INCA estima para o mesmo período, que na capital Aracaju surjam 1.240 novos casos de câncer de pele não-melanoma e 20 novos casos de câncer de pele melanoma (INCA, 2022).

Para o diagnóstico do melanoma, a dermatoscopia vem se mostrando uma poderosa ferramenta. No entanto, precisa ser complementada com o exame histopatológico, que além de confirmar o diagnóstico aponta a indicação precisa do tratamento. Uma grande virtude da dermatoscopia é poupar alguns pacientes de um exame invasivo (biópsia), que deixaria uma cicatriz cirúrgica (INCA, 2022).

Se tratando do tratamento do melanoma não-metastático, a excisão cirúrgica é a modalidade mais indicada. A radioterapia e a quimioterapia também podem ser utilizadas dependendo do estágio do câncer. Já para melanoma metastático, que até alguns anos atrás somente eram oferecidos cuidados paliativos, tratamentos mais atuais como a imunoterapia, com interleucina 2 (IL-2), vêm alcançando altas taxas de sucesso (INCA, 2022; Ahmed *et al.*, 2020).

A estratégia de tratamento para o melanoma metastático tem como objetivo postergar a evolução da doença, oferecendo chance de sobrevida mais longa a pacientes que anteriormente tinham um mau prognóstico. Em menos de 10 anos, o tratamento do melanoma foi revolucionado com a aprovação de inibidores de tirosina quinase e inibidores de checkpoint imunológico, que também têm mostrado um impacto significativo no prognóstico de pacientes com melanoma (Leonardi *et al.*, 2018; INCA, 2022; Ahmed *et al.*, 2020).

Apesar dos avanços no tratamento do melanoma, alguns medicamentos ainda são amplamente utilizados, a exemplo da dacarbazina, fármaco que apresenta resposta parcial em apenas 25% dos melanomas, com resposta completa relatada em apenas 5%. Ensaios clínicos controlados e randomizados não demonstraram que a dacarbazina melhora a sobrevida dos pacientes com melanoma (Davey *et al.*, 2016). Ainda, é relatado no tratamento com a Dacarbazina efeitos adversos como alopecia, rubor facial e parestesia facial, principalmente. Tais desfechos corroboram para a necessidade de tratamentos mais específicos e eficazes para cânceres de pele, em especial o melanoma.

3.4 Câncer de pulmão

O câncer de pulmão é classificado em dois grandes grupos: os carcinomas de células pequenas e os carcinomas de células não-pequenas. Dentre os carcinomas

de células não-pequenas estão incluídos o adenocarcinoma, o carcinoma de células escamosas, o carcinoma de grandes células e os carcinomas neuroendócrinos. Os adenocarcinomas são de grande importância para a comunidade médica porque são o subtipo histológico mais comum de câncer de pulmão e um dos tumores mais fatais, com uma sobrevivência global de 5 anos (Pêgo-Fernandes *et al.*, 2021; Hutchinson *et al.*, 2019; Denisenko *et al.*, 2018).

O principal fator de risco para o câncer de pulmão é o tabagismo, se tratando tanto do fumante direto quanto a exposição passiva ao tabaco, responsáveis por cerca de 85% dos casos diagnosticados (INCA, 2021b). Outros fatores de risco importantes estão associados às exposições ocupacional e ambiental. A Organização Internacional do Trabalho (OIT) estima que 17 a 29% dos casos de câncer de pulmão estejam relacionados a exposição ocupacional. Cerca de 29 agentes foram reconhecidos como cancerígenos, como os presentes na produção de alumínio, no processo de gaseificação de carvão, na mineração de hematita, nas fundições de ferro e aço, na exposição a metais e poeiras. Além disso, a combustão de motores a diesel, a poluição do ar e as radiações também são fatores de risco para o câncer de pulmão. Muitos desses agentes têm um efeito sinérgico com o tabagismo (INCA, 2021a).

No Brasil, são estimados 32.560 novos casos de câncer de traqueia, brônquios e pulmão para cada ano do triênio de 2023 a 2025, sendo 18.020 casos entre os homens e 14.540 casos entre as mulheres. Sem considerar o câncer de pele não-melanoma, os cânceres de traqueia, brônquio e pulmão ocupam a quarta posição entre os tipos de câncer mais frequentes (INCA, 2022).

Na região Nordeste são estimados 6.570 novos casos de câncer de traqueia, brônquio e pulmão. Desses, 3.450 novos casos são para homens e 3.120 novos casos são estimados para mulheres. Para o estado de Sergipe são estimados 240 novos casos (130 homens e 110 mulheres) para cada ano do triênio de 2023 a 2025. O INCA estima para o mesmo período, que na capital Aracaju surjam 80 novos casos de câncer de traqueia, brônquios e pulmão (INCA, 2022).

A detecção precoce do câncer de pulmão pode ser feita por meio da investigação com exames clínicos, laboratoriais, endoscópios ou radiológicos de pessoas com sinais e sintomas sugestivos da doença ou de pessoas sem sinais ou sintomas que pertencem a grupos com maior chance de ter a doença. Essa detecção

precoce é possível em apenas parte dos casos já que na maioria das vezes o diagnóstico do câncer de pulmão se dá de forma tardia pois os sintomas iniciais são inespecíficos. Os sinais e sintomas mais comuns e que devem ser investigados são: tosse e rouquidão persistentes, sangramento pelas vias respiratórias, dor no peito, dificuldade de respirar, fraqueza e perda de peso sem causa aparente (Miranda-Filho *et al.*, 2021; INCA 2022; Novaes *et al.*, 2008).

A radiografia de tórax e a tomografia computadorizada de tórax são os exames iniciais feitos para avaliar um nódulo ou uma massa pulmonar. Quando confirmada a suspeita de neoplasia por médico especialista, alguns exames complementares são solicitados para avaliar a extensão da doença. Biópsia pulmonar guiada por exame de imagem é, na grande maioria, o procedimento de escolha para realizar a confirmação patológica, principalmente para lesões periféricas. A broncoscopia flexível é utilizada frequentemente para biópsias de lesões centrais e avaliação da árvore brônquica. Uma vez realizada a confirmação patológica e estadiamento com exames de imagem, é realizado o estadiamento da doença. O estadiamento é feito por meio de vários exames, como: tomografia de tórax e de abdome superior, ressonância do crânio, entre outros. Ao final, é definido se o paciente é apto para um tratamento cirúrgico ou sistêmico com quimioterapia (Barros *et al.*, 2006; Fernandez *et al.*, 2002, INCA, 2022).

A decisão do tratamento do câncer de pulmão depende do tipo histológico, do estadiamento tumoral e das condições clínicas do paciente, como explicitado anteriormente. Por exemplo, a prova de função respiratória pode trazer informações importantes em pacientes passíveis de tratamento com cirurgia ou com radioterapia (INCA, 2023). No geral, os tratamentos mais empregados no câncer de pulmão são a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia. Os cuidados paliativos é a estratégia de tratamento para a doença metastática avançada. Tais cuidados são fundamentais no alívio do sofrimento, da dor e nos casos de falta de ar e devem iniciar precocemente, a fim de assegurar melhor controle de sintomas e qualidade de vida (Mendes *et al.*, 2015; Alves *et al.*, 2019; INCA, 2022).

A cirurgia, nos casos possíveis, consiste na retirada do tumor com uma margem de segurança. A margem de segurança diz respeito à remoção dos linfonodos próximos ao pulmão e localizados no mediastino. Apesar de apenas 15% dos casos serem passíveis de tratamento cirúrgico, a cirurgia é o tratamento que proporciona melhores resultados e controle da doença (Pêgo-Fernandes *et al.*, 2021; INCA, 2022).

As cirurgias para tratamento do câncer de pulmão são a segmentectomia e ressecção em cunha, a lobectomia e a pneumectomia. Na segmentectomia e ressecção em cunha é feita a retirada somente do segmento ou parte do segmento que envolve o tumor. A lobectomia é a cirurgia “padrão-ouro” de escolha para o tratamento do câncer de pulmão. Nela, é feita a retirada de todo o lobo pulmonar onde o tumor está situado. É o mais adequado por remover toda a doença de forma anatômica. A pneumectomia é a retirada de um pulmão inteiro, suas indicações são limitadas e restritas pois o procedimento apresenta alta morbidade e não é tolerado por alguns pacientes (Pêgo-Fernandes *et al.*, 2021; INCA, 2022).

Na quimioterapia são administrados medicamentos por via endovenosa ou oral com o intuito de eliminar as células tumorais. A radioterapia pode ser utilizada após a cirurgia, de forma adjuvante nos carcinomas de células não-pequenas. Ela pode ser indicada ainda de forma associada à quimioterapia tanto nos estágios em que o câncer está localizado quanto em metástase. Apesar de eficaz no tratamento do câncer de pulmão, os pacientes geralmente apresentam efeitos adversos como pneumonite e esofagite (Faroni *et al.*, 2022; Carvalho, 2002; INCA, 2022).

3.5 Produtos naturais e sintéticos no tratamento do câncer

Desde a década de 80 um total de 174 novos compostos com indicação para o tratamento do câncer foram aprovados para comercialização, sendo que 53% são produtos naturais, derivados direto ou baseados neles (Newman & Cragg, 2020). Nos últimos anos, algumas substâncias orgânicas têm sido investigadas para o tratamento do câncer e algumas outras já são amplamente comercializadas como a doxorrubicina (Dias, 2018).

Diversos estudos mostram o potencial citotóxico de produtos naturais em linhagens tumorais. Por exemplo, Montalvão e colaboradores (2023) investigaram a citotoxicidade do óleo essencial de *Myrcia splendens* em linhagens tumorais. Os resultados mostraram que o óleo de *Myrcia splendens* apresenta alta atividade citotóxica nas linhagens tumorais THP-1, A549 e B16F10. Nesse mesmo estudo, Montalvão e colaboradores observaram que o tratamento com o óleo essencial da *Myrcia splendens* reduziu a formação de colônias, inibiu a capacidade migratória das

células e causou alterações morfológicas apoptóticas no núcleo e no citoplasma das células A549 (Montalvão *et al.*, 2023).

Em outro estudo, Farias e colaboradores (2022) avaliaram os efeitos proliferativos do isoflavonóide (+)-PTC sobre uma linhagem de câncer de próstata. Eles observaram que o isoflavonóide (+)-PTC exerce atividade antiproliferativa contra a linhagem de câncer de próstata regulando a progressão do ciclo celular com parada da mitose na prófase ou prometáfase. Além disso, foi possível verificar que o tratamento das células com este composto resultou na formação de centrossomos desorganizados e distribuições de γ -tubulina extensivamente interrompidas (Farias *et al.*, 2022).

Outros exemplos de estudos com produtos naturais e câncer são de Spera e colaboradores (2019), no qual foi possível inferir que o extrato hidroetanólico de sementes de *Hymenaea courbaril L.*, o Jatobá, apresenta atividade citotóxica contra células de melanoma B16F10 e de Ferraz e colaboradores (2013) no qual foi observado que o tratamento com óleo essencial da folha de *Lippia gracilis schauer* causou parada do ciclo celular no período G1 em células HepG2. Essa parada do ciclo celular em G1 foi acompanhada por fragmentação do DNA sem afetar a integridade da membrana celular. Além disso, na morfologia celular foi evidenciado o mecanismo de morte celular por apoptose com ativação da caspase-3 (Spera *et al.*, 2019; Ferraz *et al.*, 2013).

Modificações na estrutura de compostos naturais podem conferir melhores perfis de absorção, hidrossolubilidade, lipossolubilidade e reatividade, tornando-as mais citotóxicas às células tumorais e, podendo também, através dessas modificações, torná-las mais seletivas, menos tóxicas e mais potentes (Ottoni *et al.*, 2013).

Na literatura é relatada a atividade citotóxica de derivados de produtos naturais em linhagens de adenocarcinoma de pulmão, adenocarcinoma colorretal humano e linhagem celular de veia umbilical humana (Girek *et al.*, 2019). Dos Santos e colaboradores (2023) mostram uma redução na formação de colônias e inibição da migração da linhagem de adenocarcinoma de pulmão após tratamento com um composto derivado da *Lausona*. Nesse mesmo estudo, é relatada alterações

morfológicas e indução de apoptose nas células A549 tratadas com o composto (Dos Santos *et al.*, 2023).

De Franca e colaboradores (2021) relataram que compostos derivados da *Lausona* apresentaram alta atividade citotóxica em linhagens tumorais. Nesse mesmo trabalho, foi relatado que o composto foi capaz de reduzir a formação de colônias e a capacidade migratória de células de melanoma, além de induzir alterações morfológicas apoptóticas nas células de melanoma (De Franca *et al.*, 2021). Esses estudos revelam o caráter promissor destes compostos que são encontrados facilmente na natureza e podem ser sintetizados para diversos usos terapêuticos, inclusive no câncer.

3.5.1 Indol e derivados Indólicos

A estrutura do Indol foi identificada pela primeira vez em 1860 por Baeyer e colaboradores e ganhou imensa popularidade como uma molécula com numerosas condições farmacológicas (Alves, 2019). O Indol (Figura 5) é um composto heterocíclico constituinte de várias espécies de vegetais crucíferos, além de ser produzido por uma variedade de bactérias e organismos marinhos. Os metabólitos bacterianos derivados de Indol são o resultado da biossíntese via acoplamento de triptofano com outros aminoácidos (Birmann *et al.*, 2018; Karimabad *et al.*, 2017; Narsimha *et al.*, 2016; Shaikh *et al.*, 2018).

O arcabouço indólico é altamente visado na síntese de novos compostos por sua versatilidade e pela facilidade com a qual é encontrado na natureza. Além disso, o núcleo Indol é a base de diversas estruturas moleculares de drogas já conhecidas, como: sumatriptano, tadalafil, fluvastatina e mitomicina (Dadashpour *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2018).

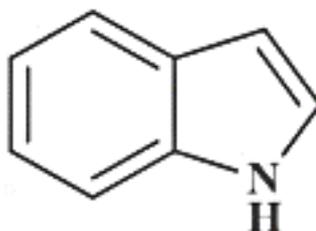
O Indol é capaz de induzir a morte celular apoptótica em células de câncer de cólon de forma concentração-dependente e promover a parada do ciclo celular na fase G2/M (Pedrosa, 2017). Na literatura também é demonstrado que o Indol é capaz de modular a montagem dos microtúbulos, seja pela inibição da polimerização da tubulina ou pelo bloqueio da desmontagem dos microtúbulos, principalmente em células de câncer de mama. Fármacos capazes de modular a montagem dos microtúbulos são de grande interesse na terapia antineoplásica (Kaur *et al.*, 2019; Patil *et al.*, 2012; Brancale *et al.*, 2007).

Estudos com derivados sintéticos do Indol mostram que a modificação química dessa molécula pode melhorar o seu potencial citotóxico em linhagens tumorais. Como reportado no trabalho de Andrade e colaboradores (2024), derivados sintéticos do Indol apresentaram efeito citotóxico em linhagens de adenocarcinoma de pulmão, melanoma e glioma. Nesse mesmo estudo, o composto diminuiu a formação de clones, inibiu a migração da linhagem de glioma e induziu alterações morfológicas características de apoptose, como condensação da cromatina e alterações no citoesqueleto (Andrade *et al.*, 2024). Também foi demonstrado que derivados do Indol possuem efeito citotóxico em linhagem de leucemia (Danisman-Kalindemirtas *et al.*, 2022) e de carcinoma colorretal (Hacioglu *et al.*, 2021).

Outros estudos sobre a avaliação do potencial antitumoral de derivados Indólicos são encontrados na literatura. Cury e colaboradores (2019) sintetizaram 21 novos compostos à base de Indol e estes foram testados em diversas linhagens tumorais. Eles observaram que um dos compostos apresentou citotoxicidade em células de leucemia linfoblástica aguda, com diminuição da proteína β -tubulina, levando à parada do ciclo celular em G2/M, danos ao DNA e morte por apoptose. Além disso, o composto induziu a despolimerização da rede de microtúbulos em células HeLa e revelou um perfil transcricional semelhante ao das células tratadas com prostaglandinas, aparentemente devido à indução da diferenciação celular pela expressão de marcadores CD11 e CD14A em células leucêmicas promielocíticas (Cury *et al.*, 2019). Em um estudo semelhante, Bhale e colaboradores (2017) avaliaram a atividade antitumoral *in vitro* de derivados sintéticos do Indol contra a linhagem celular MCF7. O estudo revelou que os compostos demonstraram excelente atividade contra o carcinoma mamário (Bhale *et al.*, 2017).

O potencial citotóxico do Indol e dos seus derivados sintéticos descritos na literatura, bem como os efeitos adversos associados ao tratamento com os antineoplásicos atuais revelam a importância e a necessidade da busca por novos compostos para o tratamento do câncer. Os resultados obtidos em trabalhos anteriores em nosso laboratório revela que o Indol e seus derivados apresenta efeito citotóxico em diferentes linhagens tumorais (Andrade *et al.*, 2024). Assim, esse trabalho se propõe a investigar o efeito do derivado indólico 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one na inibição do crescimento tumoral, na migração e o efeito na morte de células tumorais.

Figura 5. Estrutura química do Indol.



Fonte: Alves, 2019.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Insumos

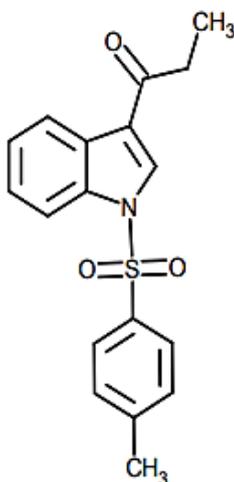
Para a realização dos experimentos foram usados Dulbeccos's Modified Eagle Medium (DMEM), Tripsina, EDTA, DMSO, DAPI, SRB, Triton X 100 e Faloidina-FITC da Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA); SFB, antibiótico (penicilina 10000 U/mL; estreptomicina 10000 mg/mL), Cloridrato de Doxorrubicina (Libbis, Embu das Artes, São Paulo, Brasil); Ácido tricloroacético (Neon, São Paulo, Brasil); Ácido acético (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil); TRIS-base (Inlab Confiança, Brasil); Trypan blue (Sigma); Anexina V / Iodeto de Propídeo (Thermo Fisher Scientific); Composto 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one.

4.2 Derivado sintético do Indol 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one

4.2.1 Preparo da amostra

O composto 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one foi sintetizado em colaboração com o Professor Dr. Sócrates Cabral de Holanda Cavalcanti do Laboratório de Química Farmacêutica (LQF) da Universidade Federal de Sergipe. Foi preparado e armazenado uma solução estoque do composto a 100.000 μM em DMSO. Essa solução foi diluída em *Dulbeccos's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de antibiótico (penicilina 10000 U/mL; estreptomicina 10000 mg/mL) (DMEM completo) para o preparo das soluções trabalho a 25 μM .

Figura 6. Composto sintético derivado do núcleo Indol 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one obtido do Laboratório de Química Farmacêutica da Universidade Federal de Sergipe.



Fonte: Andrade, 2021.

4.3 Cultivo e manutenção das linhagens tumorais

As linhagens A549, B16F10, MCF7 e PC-3 foram mantidas em garrafas de cultivo em meio DMEM completo e incubadas em estufa à 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ (tabela 1). Ao obter confluência suficiente para a realização dos experimentos, as células foram dissociadas da garrafa com solução Tripsina-EDTA (Tripsina 0,25%; EDTA 0,53 mM). 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 1200 RPM por 10 minutos à 4°C. O pellet de células formado após centrifugação foi ressuscitado em meio DMEM completo e uma alíquota de 10 µL foi usada para contagem em câmara de Neubauer. Foi realizado o ajuste da densidade de células para sub-cultivo e para os experimentos posteriores.

Tabela 1. Linhagens de células utilizadas nos experimentos.

| Linhagem | Descrição | Espécie |
|----------|---------------------|---------------------|
| B16F10 | Melanoma | <i>Mus musculus</i> |
| A549 | Carcinoma de pulmão | <i>Homo sapiens</i> |
| MCF7 | Mama | <i>Homo sapiens</i> |
| PC-3 | Próstata | <i>Homo sapiens</i> |

Fonte: autoria própria

4.4 Testes *in vitro*

4.4.1 Avaliação da viabilidade celular por Sulforodamina B

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). O ensaio de SRB tem sido uma escolha cada vez mais constante para o rastreamento de novos agentes anti câncer principalmente por sua acurácia, confiabilidade e reprodutibilidade (Shakil *et al.*, 2022). As linhagens A549, B16F10, MCF7 e PC-3 foram semeadas em placa de 96 poços (1×10^4 células/poço) em 200 μ L de meio DMEM completo. As células foram incubadas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ à 37°C por 24 horas para aderência. Após esse tempo, as células foram tratadas com 0,78, 1,56, 3,12, 6,25, 12,5 e 25 μ M do composto 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one por 72 horas. DMSO 0,02% e Cloridrato de Doxorrubicina ($1 \times Cl_{50}$) (Tabela 2) foram usados como controle negativo e controle positivo de morte, respectivamente. Ao completar as 72 horas, o meio contendo os tratamentos, controle negativo e controle positivo foram descartados e as células foram fixadas com ácido tricloroacético (30%) por 01 hora à 4°C. A placa foi lavada por 4 vezes com água da torneira e deixada a temperatura ambiente para secar. Um volume de 100 μ L da solução de SRB 0,057% (p/v) foi dissolvida em ácido acético (1%) e adicionada aos poços por 30 minutos também em temperatura ambiente. A placa foi lavada por 4 vezes com ácido acético (1%) para remoção do excesso de corante e deixada em bancada para secar. TRIS base (10 mM; pH 10,5) foi usada para diluição do SRB por 30 minutos e a placa foi lida em leitor de microplaca (*Synergy H1, Biotek, VT, EUA*) por espectrofotometria na região visível em comprimento de onda de 510 nanômetros. Os valores de absorbância foram convertidos a porcentagem de inibição do crescimento celular a partir da fórmula:

$$\% \text{Grau de Inibição} = 100 - \left(\left(\frac{\text{Células tratadas}}{\text{Células não tratadas}} \right) \times 100 \right)$$

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em quadruplicata em pelo menos três experimentos independentes. Análises e gráficos, assim como a Cl_{50} , foram

obtidos a partir do *software GraphPad prism* versão 9.0 (*GraphPad Software, USA*). A CI_{50} é a determinação da concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular (Andrade *et al.*, 2015).

4.4.2 Ensaio de formação de colônias

As linhagens A549 e B16F10 foram semeadas em placa de 6 poços (3×10^2 células em 2 mL de meio DMEM completo). As células foram incubadas em estufa com atmosfera de 5% CO_2 a 37°C por 24 horas para aderência. Após esse tempo, as células foram expostas às concentrações de $0,5 \times CI_{50}$, $1 \times CI_{50}$ e $2 \times CI_{50}$ do composto 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one nas linhagens A549 e B16F10 (Tabela 2) por 72 horas em estufa sob as mesmas condições. Dimetilsulfóxido 0,02% e Cloridrato de Doxorrubicina ($1 \times CI_{50}$) (Tabela 2) foram usados como controle negativo e controle positivo de morte, respectivamente. Após o tempo de tratamento os meios foram desprezados e novo meio DMEM completo foi adicionado aos poços e deixados em estufa com atmosfera de 5% CO_2 a 37°C por mais 05 dias. Após esse período, as células foram fixadas com metanol + ácido acético (3:1) por 5 minutos e coradas com cristal violeta 0,5% em água por 30 minutos. Após a coloração, os poços contendo as células foram lavados com água da torneira e a placa foi deixada na bancada para secar. Após isso, os poços foram fotografados e a formação de colônias foi analisada no *software ImageJ*.

4.4.3 Ensaio de migração celular *in vitro*

Para a análise da migração das linhagens A549 e B16F10 após o tratamento com o composto 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one, as células foram semeadas na densidade de 3×10^5 células por poço em 1mL de meio DMEM completo em placa de 12 poços. As células foram incubadas em estufa com atmosfera de 5% CO_2 a 37°C por 24 horas para aderência e após esse tempo uma risca foi feita na porção central de cada poço com uma ponteira amarela de 200 μ L, removendo as células desta região. Os poços foram lavados 02 vezes com tampão fosfato-salino (PBS 1 \times) para remover as células que se soltaram. Neste ensaio o meio de cultura DMEM foi suplementado com soro a 2% para reduzir a proliferação e possibilitar avaliar somente a migração celular (Grada *et al.*, 2017). Em seguida, as células foram expostas às concentrações de $0,5 \times CI_{50}$, $1 \times CI_{50}$ e $2 \times CI_{50}$ do composto 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one nas linhagens A549 e B16F10 (Tabela 2) e incubadas por 48h. DMSO

0,02% e Cloridrato de Doxorrubicina ($1 \times \text{Cl}_{50}$) (Tabela 2) foram usados, respectivamente, como controle negativo e controle positivo de morte. Durante o período de incubação, a área da risca foi fotografada em microscópio óptico invertido (*Olympus*, IX81) em aumento de $40 \times$ a fim de observar o fechamento da risca. Fotos foram capturadas nos tempos 0, 24 e 48 horas de tratamento. A área de fechamento foi medida com o auxílio do *software ImageJ*, e a porcentagem de fechamento foi calculada comparando os dados dos tempos 24 e 48 horas com o tempo 0, utilizando a fórmula previamente descrita (Yarrow *et al.*, 2004).

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

Onde:

$A_{t=0h}$ - área medida imediatamente após realizar a risca (tempo zero).

$A_{t=h}$ - área medida 24 ou 48 horas após realizar a risca.

4.4.4 Ensaio de alterações morfológicas com Dapi/Phalloidina-FITC

As linhagens A549 e B16F10 foram semeadas em placa de 24 poços, em meio DMEM completo (2×10^4 células por poço em 500 μL). As células foram incubadas em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 à 37°C por 24 horas para aderência. Ao completar esse tempo, as células foram expostas ao composto 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one nas concentrações de $0,5 \times \text{Cl}_{50}$, $1 \times \text{Cl}_{50}$ e $2 \times \text{Cl}_{50}$ nas linhagens A549 e B16F10 (Tabela 2) por 24 horas. Dimetilsulfóxido 0,02% e Cloridrato de Doxorrubicina ($1 \times \text{Cl}_{50}$) (Tabela 2) foram usados como controle negativo e controle positivo de morte, respectivamente. O meio contendo os tratamentos, controle negativo e controle positivo de morte foram descartados e as células foram lavadas com tampão PBS ($1 \times$) por 02 vezes e fixadas com Formaldeído (4%) por 15 minutos. Após fixação, foi realizada a lavagem dos poços com PBS ($1 \times$). A permeabilização celular foi realizada com solução Triton X-100 a 0,2% em PBS por 15 minutos. Em seguida, foi realizada a lavagem dos poços com PBS ($1 \times$). O citoesqueleto das células foi corado com Faloidina conjugada ao fluorocromo FITC (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 30 minutos no escuro, e os poços foram lavados com PBS ($1 \times$). O núcleo celular foi contra corado com DAPI (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 10 minutos no escuro e adicionado PBS ($1 \times$) aos poços. Foram realizadas fotografias utilizando microscópio de fluorescência

(*Olympus IX81*) e estas foram analisadas no *software ImageJ* onde foram avaliadas alterações nos componentes do citoesqueleto e ácido desoxirribonucleico (DNA).

4.4.5 Detecção de células apoptóticas e necróticas por Anexina V / Iodeto de Propídeo

Para o ensaio de detecção de células apoptóticas e necróticas foram utilizados os marcadores Anexina V e Iodeto de Propídeo (PI). As linhagens A549 e B16F10 foram semeadas em placas de 12 poços em 1 mL de meio DMEM completo com densidade de 2×10^5 células por poço e incubadas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C por 24 horas para aderência das células à placa. Após esse tempo as células foram tratadas com o composto 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one nas concentrações de $0,5 \times Cl_{50}$, $1 \times Cl_{50}$ e $2 \times Cl_{50}$ nas linhagens A549 e B16F10 (Tabela 2) e deixadas na estufa por 24 horas sob mesmas condições descritas anteriormente. Dimetilsulfóxido 0,02% e Cloridrato de Doxorrubicina (10 µM) foram usados como controle negativo e controle positivo de morte, respectivamente. Após o tempo de tratamento, o sobrenadante com os tratamentos foram transferidos para tubos Falcon de 15mL e mais 1 mL de meio foi adicionado aos poços para uma pré-lavagem. Após a pré-lavagem, o meio foi transferido para os mesmos tubos falcon. Os poços foram lavados com PBS (1 x) por 02 vezes e as células foram dissociadas com 300 µL da solução de Tripsina/EDTA (Tripsina 0,25%; EDTA 0,53 Mm) em estufa à 37°C. A dissolução das células foi acompanhada a cada 2 minutos e quando as células apresentaram aparência mais arredondada (de desprendimento) foi adicionado 3mL de DMEM completo aos poços para inativação da solução de tripsina. Foi realizada uma última lavagem dos poços de forma leve e todo o conteúdo foi transferido para o seu respectivo tubo Falcon e centrifugadas a 1200 RPM por 10 min a 4°C. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em 1 mL de PBS (1 x). Todo o conteúdo foi transferido para tubos Eppendorf e recentrifugados a 3000 RPM por 05 minutos a 4°C. Após recentrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em 100 µL de tampão de ligação de Anexina (1 x) e coradas com Anexina V/FITC por 15 minutos e com PI por 10 minutos no escuro a temperatura ambiente, segundo recomendação do fabricante. Ao final dos 15 minutos foram adicionados 300 µL do tampão de ligação e as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (BD FACSCanto™ II).

A Anexina V/FITC se liga às células apoptóticas por meio da interação com a fosfatidilserina externalizada na membrana das células em processo de morte por

apoptose. O PI é um indicador de células necróticas, por se ligar ao DNA de células com integridade da membrana alterada. Os resultados foram analisados de acordo com o perfil de marcação da Anexina V/FITC e PI às células. Células sem marcação foram consideradas viáveis, células Anexina V/FITC positivo e PI negativo foram consideradas em estágio inicial de apoptose, células Anexina V/FITC e PI positivos foram consideradas em estágio tardio de apoptose, e as células PI positivas e Anexina V/FITC negativas foram consideradas células necróticas (Rieger *et al.*, 2011).

4.5 Teste *ex vivo*

4.5.1 Citotoxicidade em eritrócitos – Teste de Hemólise

A avaliação da atividade hemolítica do composto 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one foi realizada em eritrócitos humanos e de camundongos C57BL/6. Neste ensaio é avaliado o potencial da substância teste em causar lesões na membrana plasmática da célula, seja pela formação de poros ou pela sua ruptura total (Sousa *et al.*, 2023).

O estudo com eritrócitos humanos foi realizado de acordo com a Declaração de Helsinque, seguindo as diretrizes e normas da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Sergipe (UFS) – Hospital Universitário, Aracaju, Sergipe, Brasil (CEPA 55240821.7.0000.5546) (Anexo 2).

O estudo com eritrócitos de camundongos foi realizado de acordo com os princípios éticos de experimentação animal do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFS (CEUA 5248200923) (Anexo 1).

Os eritrócitos humanos foram obtidos de voluntários saudáveis por meio de punção venosa na região cubital média e os eritrócitos de camundongos C57BL/6 foram obtidos de 03 camundongos que foram submetidos a anestesia com isoflurano (1,5% via inalatória) e foi feita a coleta do sangue através de um capilar introduzido na região orbicular.

Após a coleta de aproximadamente 2 mL de sangue total, esse foi diluído em 10 mL de solução salina (NaCl 0,85% + CaCl₂ 10 mM) e toda a solução foi

centrifugada a 1500 RPM por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi ressuspensionado em solução salina, esse procedimento foi repetido por mais 02 vezes. Após a última centrifugação os eritrócitos foram ressuspensionados para a obtenção da solução de eritrócitos a 2%. Para o ensaio foi utilizada uma placa de 96 poços, fundo em U, em quadruplicata. Para cada 4 poços foram adicionados 100 µL da suspensão de eritrócitos. Em seguida, para cada quadruplicata foram adicionados 100 µL de solução salina (controle), 100 µL de Triton X-100 a 1% (controle positivo de hemólise), 100, 50, 25 e 12,5 × a CI₅₀ das linhagens A549 e B16F10 (Tabela 2). A placa foi incubada por 60 minutos sob agitação a uma temperatura de 25°C. Após o período transcorrido a placa foi centrifugada a 1500 RPM por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi cuidadosamente retirado e transferido para outra placa. A quantificação da hemoglobina foi avaliada através da absorbância do sobrenadante em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 510 nanômetros e todos os valores foram convertidos para percentual de hemólise através da fórmula:

$$\% \text{Hemólise} = \frac{(T - CN)}{CP - CN} \times 100$$

onde:

T = teste,

CN = controle negativo e

CP = controle positivo

4.6 Análise estatística

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em quadruplicata. Todos os testes biológicos foram realizados em três experimentos independentes e os resultados estão representados como média e intervalos de confiança de 95%. Para análise de comparação entre grupos foi utilizado ANOVA seguida de pós teste de *Dunnett*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos estatisticamente. Análises e gráficos foram obtidos através da utilização do programa *GraphPad prism* versão 9.0. O programa *Imaje J* foi utilizado para análise das imagens e de áreas.

5 RESULTADOS

5.1 Inibição do crescimento celular em linhagens tumorais pelo 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one

Podemos observar uma alta atividade de inibição nas linhagens PC-3 e A549 no tratamento com o derivado sintético do Indol na concentração de 25 μM . Após tratamento com o composto, uma atividade moderada do crescimento celular foi observada na linhagem A549 (3,12 – 12,5 μM), PC-3 (6,25 μM), MCF7 (25 μM) e B16F10 (12,5 μM) (Figura 7).

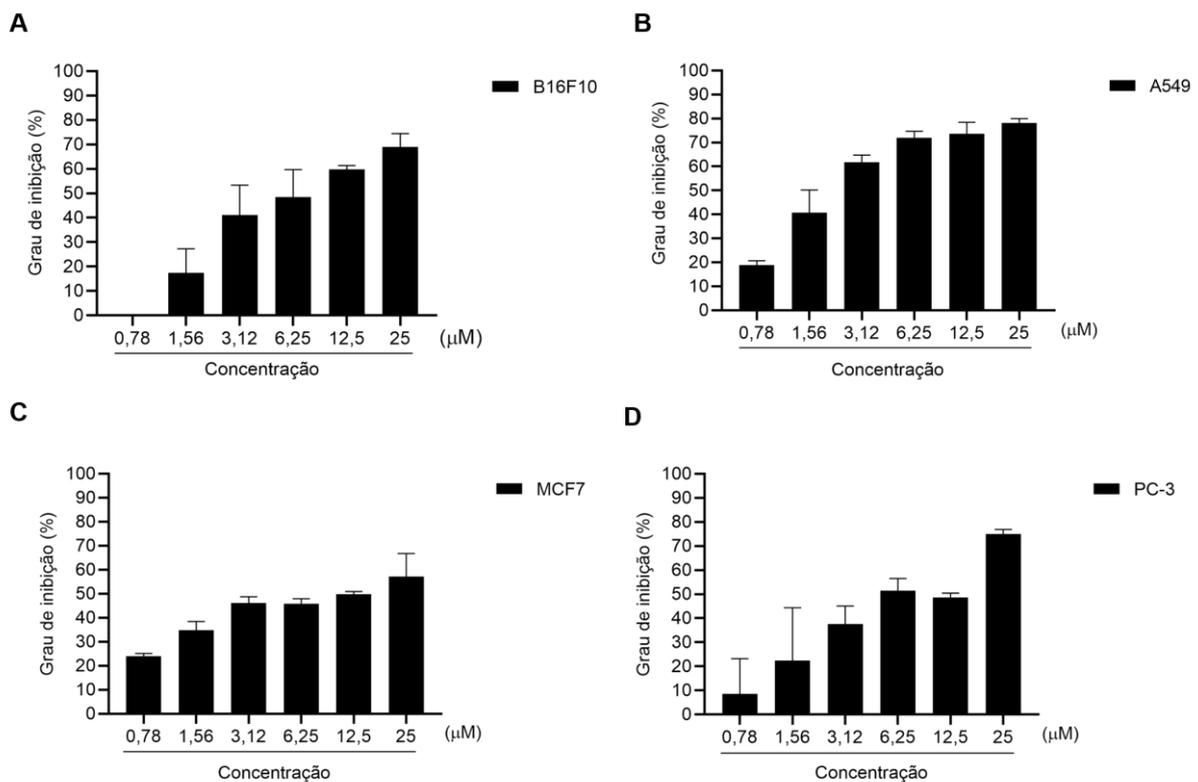


Figura 7. Porcentagem de inibição do crescimento das linhagens B16F10 (A), A549 (B), MCF7 (C) e PC-3 (D). Ensaio de citotoxicidade por sulforodamina B. As células foram tratadas com o derivado do Indol 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one. Os dados representam a média \pm DP de três experimentos independentes.

Os resultados de grau de inibição da Figura 7 foram utilizados para calcular a CI_{50} das linhagens tumorais descritas na tabela 2. Em todas as linhagens tumorais podemos observar que a CI_{50} foi abaixo ou igual a 10 μM . Na linhagem A549 a CI_{50} foi aproximadamente 3 vezes menor do que na linhagem B16F10 e PC-3 e aproximadamente 4 vezes menor do que na linhagem MCF7.

Tabela 2. Valores de CI_{50} determinados para o derivado do Indol 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one.

| Composto (μM) | Linhagem Celular | | | |
|--|------------------|-----------------|-------------------|------------------|
| | B16F10 | A549 | MCF7 | PC-3 |
| 1-(1-tosyl-1 <i>H</i> -indol-3-yl)propan-1-one | 7,6 (5,6 – 10,4) | 2,6 (2,0 – 3,3) | 10,0 (7,1 – 16,1) | 7,8 (5,4 – 11,9) |
| Doxorrubicina | 1,07 (1,0 – 1,5) | 1,4 (1,2 – 2,3) | 2,8 (2,2 – 3,7) | 5,0 (4,1 – 6,2) |

Valores expressos em média e intervalo de confiança de 95% de pelo menos três experimentos independentes após tratamento com o derivado do Indol 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one.

Em todas as linhagens foi possível observar uma alta atividade citotóxica no tratamento com o 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one, classificadas com base no valor de CI_{50} . As linhagens A549 e B16F10 foram selecionadas para outras análises biológicas por apresentarem menor CI_{50} e pela relevância desses cânceres. O câncer de pulmão apresenta o maior índice de mortalidade no Brasil e no mundo e o câncer de pele melanoma é o tipo de câncer de pele com maior letalidade e possibilidade de causar metástases.

5.2 Inibição da formação de colônias em células A549 e B16F10 pelo 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one

Na imagem representativa do ensaio clonogênico da linhagem A549 foi possível observar redução no número de colônias com o aumento da concentração do 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one (Figura 8A). Na análise do percentual do número de colônias, houve uma redução de 97% na maior concentração do composto quando comparado ao controle. O fármaco doxorrubicina reduziu em 95% o número de colônias da linhagem A549 (Figura 8B) em relação ao controle.

Na imagem representativa do ensaio clonogênico da linhagem B16F10 não foi possível observar formação de colônias nos diferentes tratamentos (Figura 8C). Na análise do percentual do número de colônias, o derivado indólico inibiu totalmente a formação de colônias nas três concentrações testadas quando comparado ao controle. A doxorrubicina reduziu em 46% o número de colônias da linhagem B16F10 (Figura 8D) em relação ao controle.

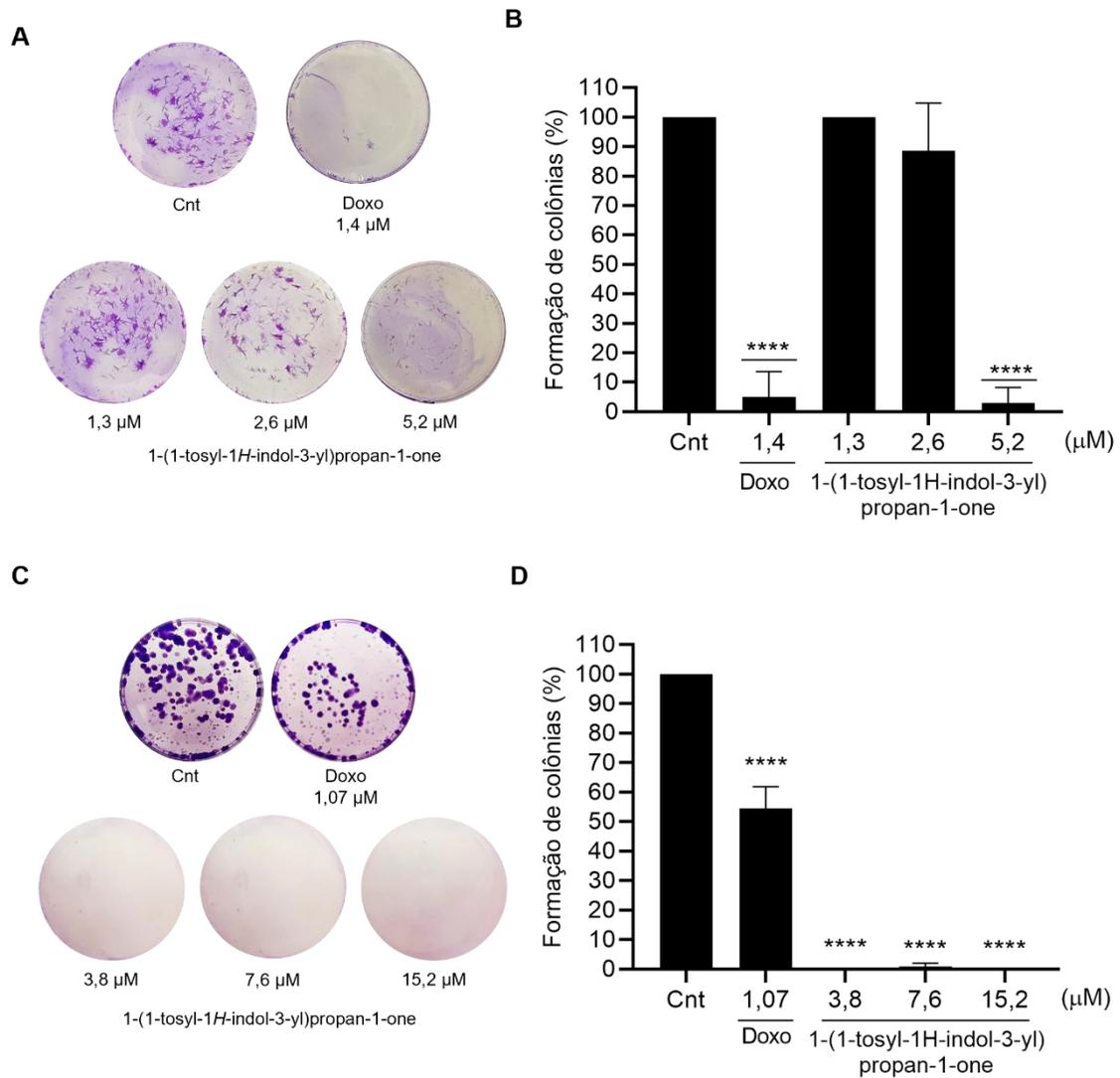


Figura 8. Efeito inibitório do 1-(1-tosyl-1H-indol-3-yl)propan-1-one na formação de colônias. Imagem representativa da formação de colônias após 72 horas de tratamento e 10 dias de crescimento celular nas linhagens A549 (A) e B16F10 (C). Análise do percentual da formação de colônias nas linhagens A549 (B) e B16F10 (D) após tratamento com 1-(1-tosyl-1H-indol-3-yl)propan-1-one, doxorubicina (Doxo) e controle negativo sem tratamento (Cnt). A análise de diferença entre tratamentos e controle foi realizada pelo *Anova*, seguido de pós-teste *Dunnnett* (****) $p < 0,0001$.

5.3 Inibição da migração das células A549 e B16F10 pelo 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one

Na análise representativa da migração na linhagem A549 foi possível observar uma inibição do fechamento da risca nas maiores concentrações do composto 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one (Figura 9A). Na análise do percentual de fechamento da risca, o composto (5,2 μM) inibiu em 97% após 24 horas e 94% em 48 horas a migração de células de câncer de pulmão. Na concentração de 2,6 μM , o composto inibiu a migração celular em 87% após 24 horas e 69% após 48 horas de tratamento. Na concentração de 1,3 μM o composto foi capaz de inibir em 33% a migração celular após 48 horas de tratamento. Todas as comparações foram feitas com o controle negativo sem tratamento, nos mesmos tempos (Figura 9B). O fármaco doxorrubicina foi capaz de inibir a migração de células de câncer de pulmão em 59% após 48 horas de tratamento, quando comparada com o controle negativo sem tratamento, no mesmo tempo (Figura 9B).

Na análise representativa da migração na linhagem B16F10 foi possível observar uma inibição do fechamento da risca nas maiores concentrações do composto (Figura 9C). Na análise do percentual de fechamento da risca, o composto a 15,2 μM inibiu em 46% após 24 horas e 42% após 48 horas a migração das células de melanoma. Todas as comparações foram feitas com o controle negativo sem tratamento, nos mesmos tempos (Figura 9D).

O composto na concentração de 7,6 μM inibiu a migração de células de melanoma em 38% após 24 horas e 28% após 48 horas de tratamento. Na concentração de 3,8 μM o composto inibiu em 26% a migração das células de melanoma após 24 horas de tratamento. O fármaco doxorrubicina inibiu a migração de células de melanoma em 30% após 24 horas de tratamento (Figura 9D). Todas as comparações foram feitas com o controle negativo sem tratamento, no mesmo tempo.

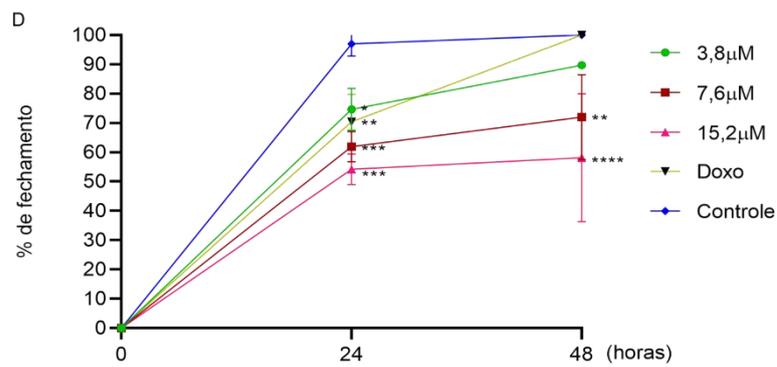
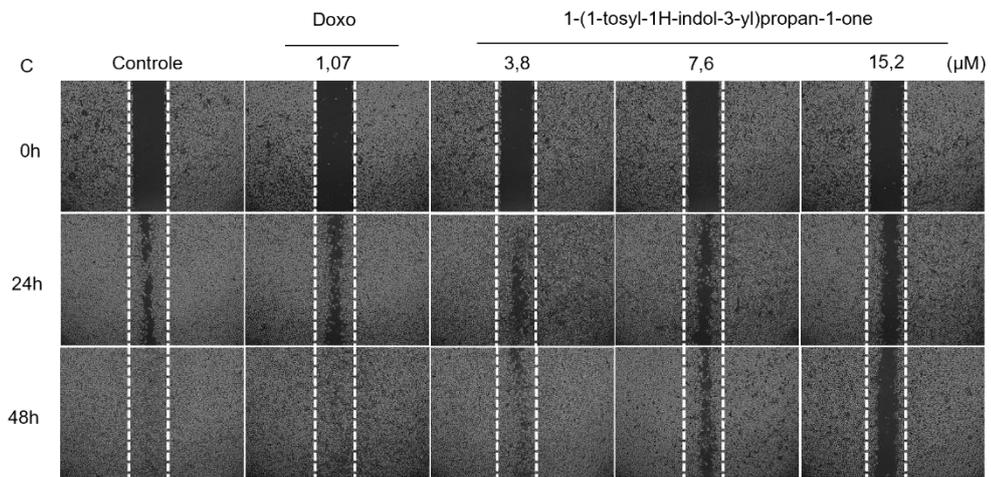
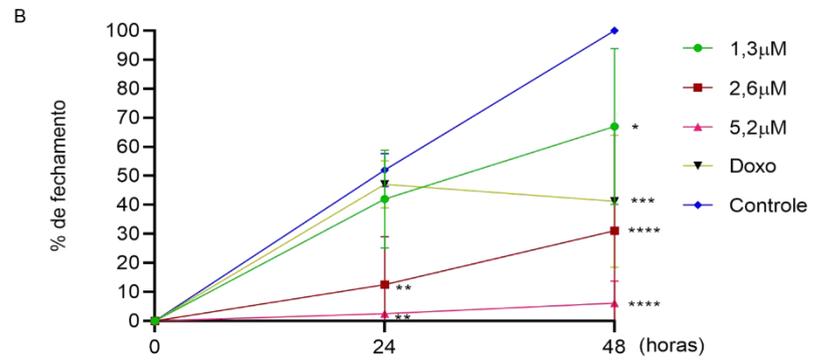
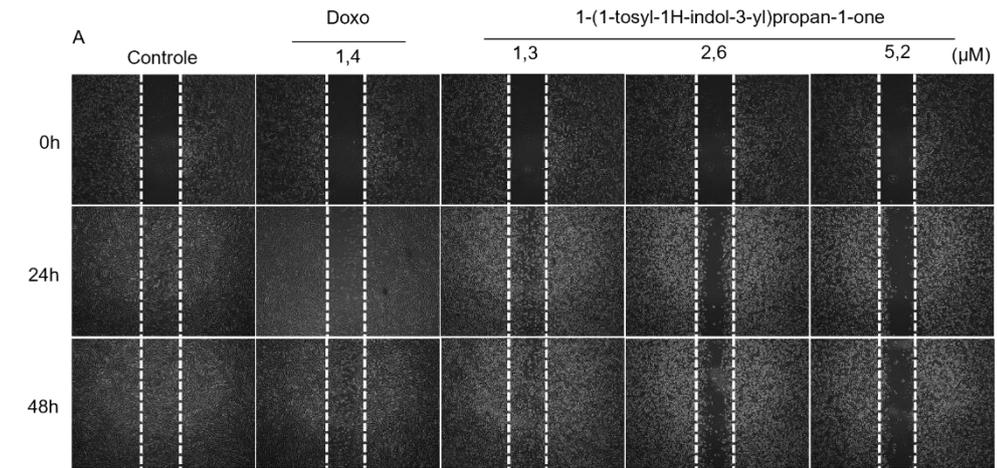


Figura 9. Efeito inibitório do 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one na migração celular. Imagem representativa da migração celular após 72 horas de tratamento com o composto 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one nas linhagens A549 (**A**) e B16F10 (**C**). Análise do percentual do fechamento da risca nas linhagens A549 (**B**) e B16F10 (**D**) após tratamento com 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one, doxorubicina (Doxo) e controle negativo sem tratamento (Cnt). Os dados mostram média e desvio padrão de três experimentos independentes. A análise de diferença entre tratamentos e controle foi realizada pelo *Two-way anova*, seguido de pós-teste *Dunnett*. (*) $P < 0,05$; (**) $P < 0,01$; (***) $P < 0,001$ e (****) $P < 0,0001$.

5.4 Indução de alterações morfológicas em células A549 e B16F10 pelo 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one

Na análise da morfologia das células de câncer de pulmão após tratamento com o composto 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one, foi possível observar feixes de estresse dos filamentos de F-actina, perda do volume citoplasmático e projeções apoptóticas no citoesqueleto. Essas alterações morfológicas foram observadas em todas as concentrações do composto. No núcleo, foi possível observar fragmentação do DNA. Na concentração de 2,6 μM foi possível observar a presença de células arredondadas, formato não característico da linhagem A549. Nas células tratadas com a doxorubicina, foi possível observar perda do volume citoplasmático e projeções apoptóticas no citoplasma (Figura 10).

Na análise da morfologia das células de melanoma foi possível observar fragmentação da membrana plasmática em todas as concentrações do composto 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one. Na concentração de 3,8 μM foi possível observar perda do volume citoplasmático. A doxorubicina provocou feixes de estresse nos filamentos de actina das células de melanoma, feixes estes que se dispõem de maneira desorganizada. Além disso, foi possível observar perda do volume citoplasmático e projeções apoptóticas do citoplasma (Figura 11).

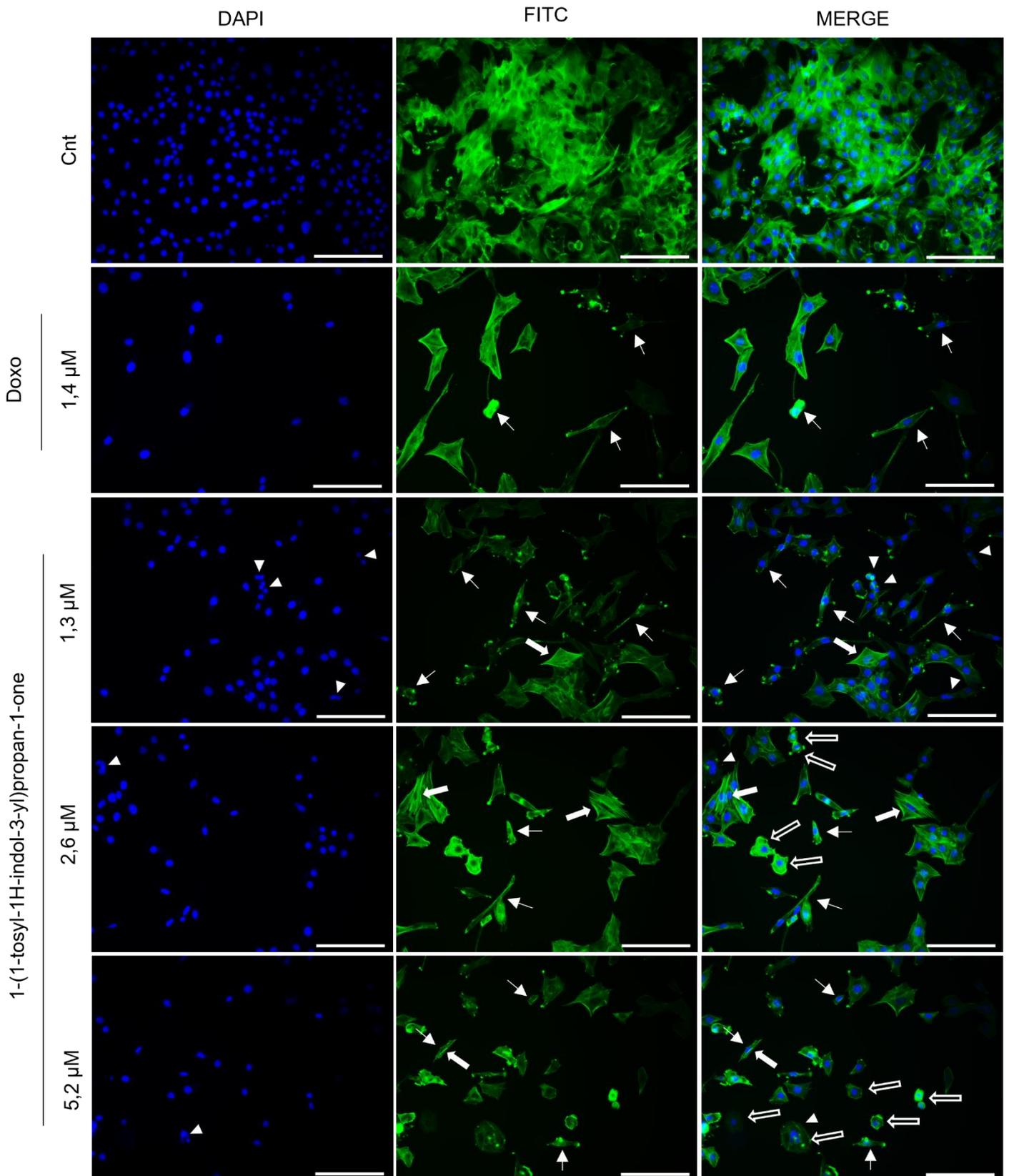


Figura 10. Alterações morfológicas em células de câncer de pulmão. Imagens representativas das alterações morfológicas após tratamento com o composto 1-(1-tosyl-1H-indol-3-yl)propan-1-one por 24 horas e coradas com DAPI e Faloidina/FITC. Doxorubicina (doxo) foi usada como controle positivo de morte e células não tratadas como controle negativo (Cnt). Setas cheias apontam estresse dos filamentos de F-actina (\Rightarrow), setas finas perda do volume citoplasmático e projeções apoptóticas do citoplasma (\rightarrow), cabeças de seta fragmentação de DNA (\blacktriangleright), seta vazada arredondamento celular (\Rightarrow). Barra: 100 μ m.

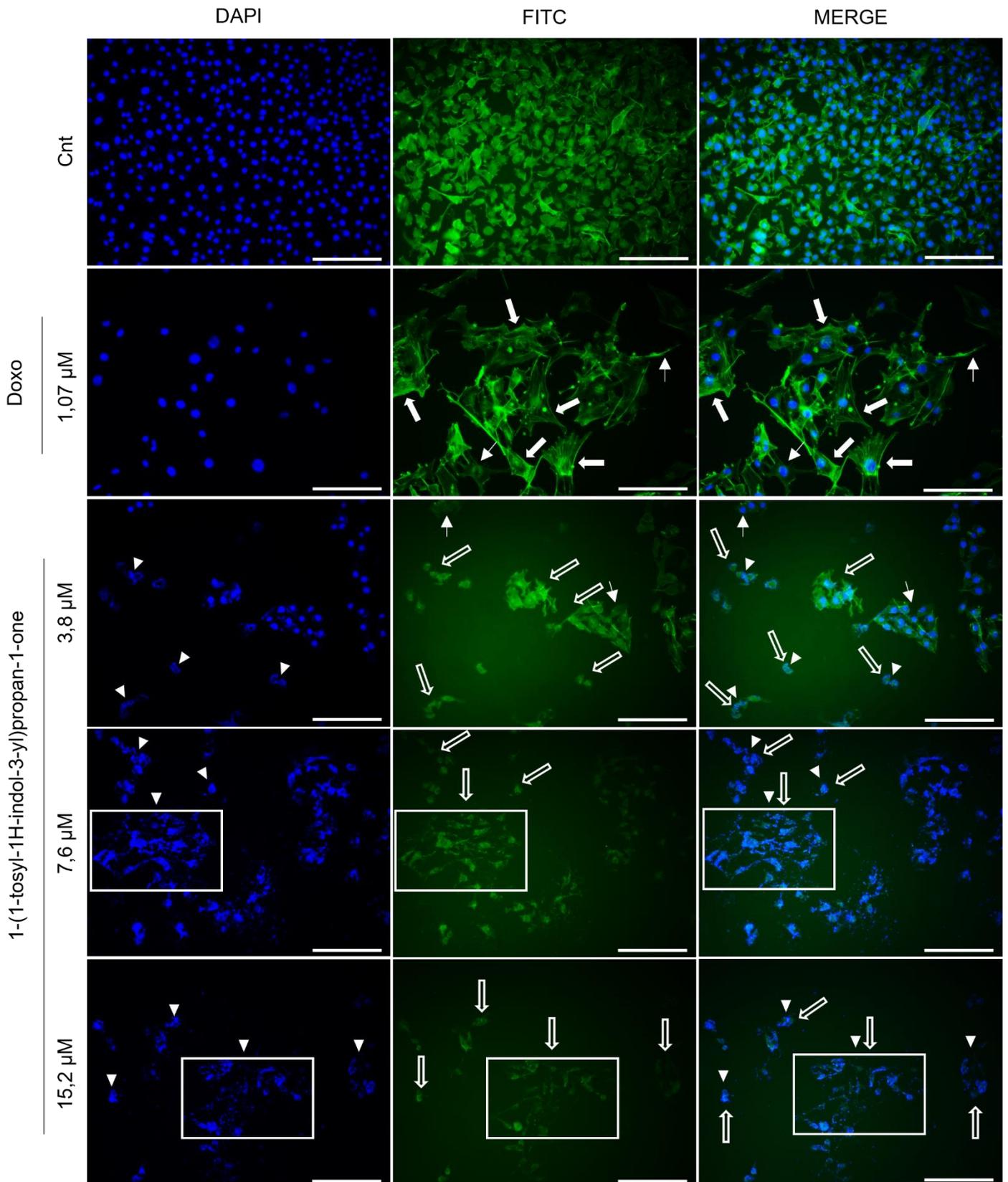


Figura 11. Alterações morfológicas em células de melanoma. Imagens representativas das alterações morfológicas após tratamento com o composto 1-(1-tosyl-1H-indol-3-yl)propan-1-one por 24 horas e coradas com DAPI e Faloidina/FITC. Doxorrubicina (doxo) foi usada como controle positivo de morte e células não tratadas como controle negativo (Cnt). Setas cheias apontam estresse dos filamentos de F-actina (\blackrightarrow), setas finas perda do volume citoplasmático e projeções apoptóticas do citoplasma (\rightarrow), cabeças de seta fragmentação de DNA (\blacktriangleright), seta vazada fragmentação da membrana plasmática (\Rightarrow). Barra: 100 μm.

5.5 Indução de apoptose em células A549 e B16F10 pelo 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one

As figuras 12A e 12C ilustram um experimento representativo com gráficos dot plot obtidos em experimento de citometria de fluxo nas linhagens A549 (Figura 12A) e B16F10 (Figura 12C), indicando células viáveis (Anexina V-/PI-), em apoptose inicial (Anexina V+/PI-), apoptose tardia (Anexina V+/PI+) e necrose (Anexina V-/PI+).

Na figura 12B foi possível observar que o tratamento das células de câncer de pulmão com o composto 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one nas maiores concentrações (2,6 e 5,2 μM) induziu um alto percentual de células em apoptose inicial quando comparados ao controle. A doxorrubicina (10 μM) também induziu morte por apoptose inicial nas células de câncer de pulmão. Não foram observados os eventos de apoptose tardia e necrose nas células de câncer de pulmão.

Na figura 12D foi possível observar que o tratamento com o composto na concentração de 7,6 μM induziu apoptose tardia nas células de melanoma quando comparados ao controle. A doxorrubicina (10 μM) também induziu morte por apoptose tardia nas células de melanoma. Não foram observados os eventos de apoptose inicial e necrose nas células de melanoma.

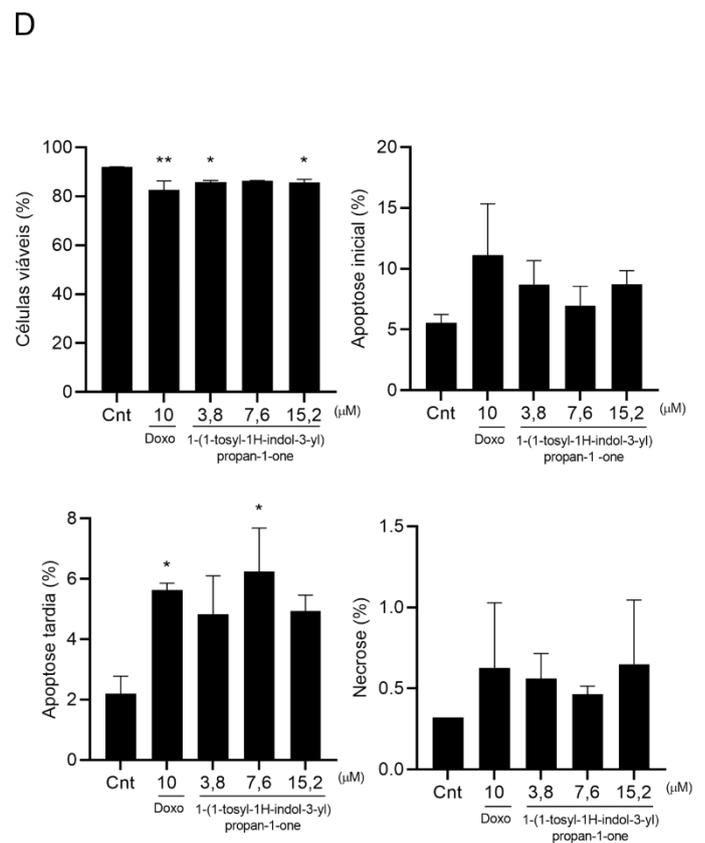
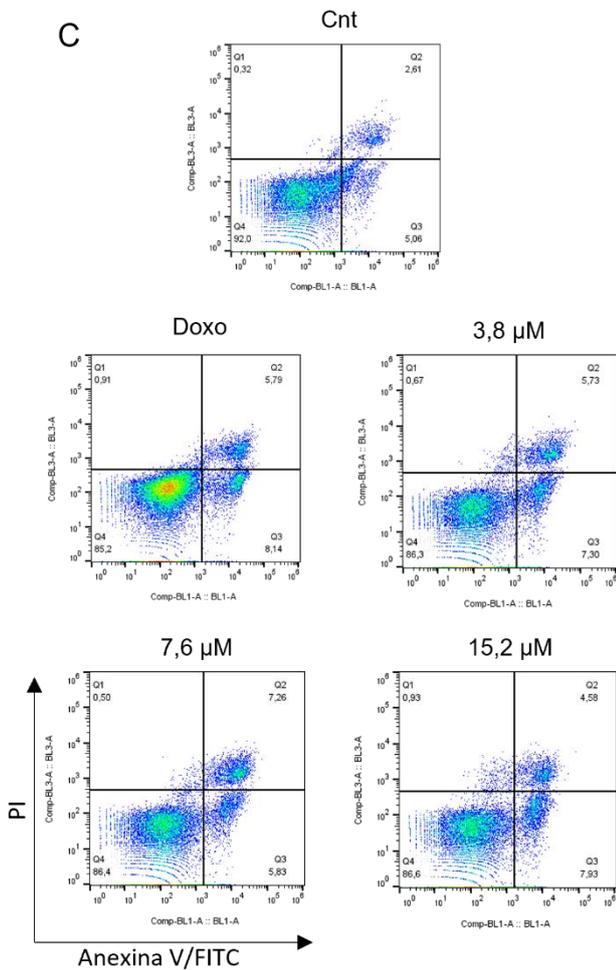
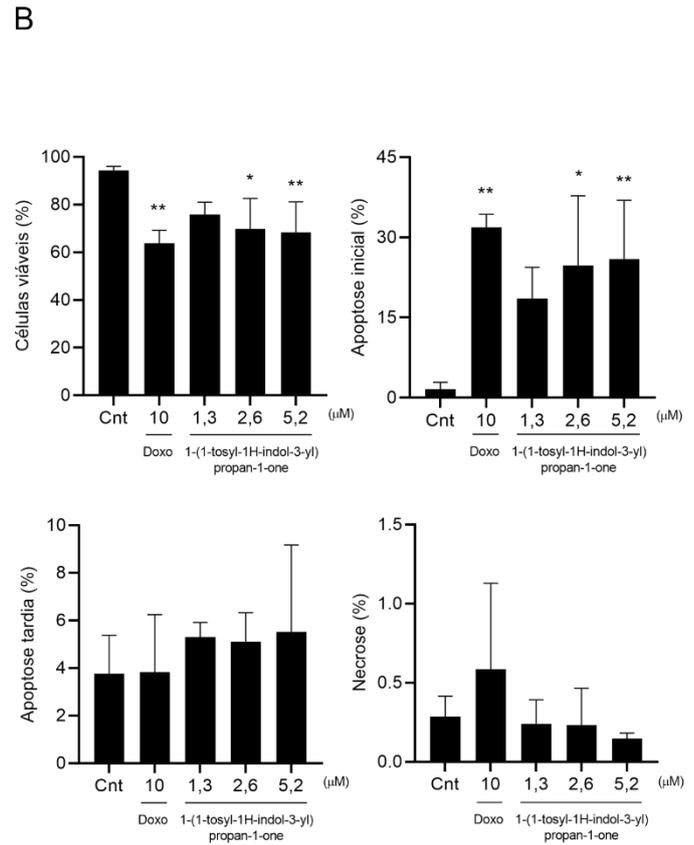
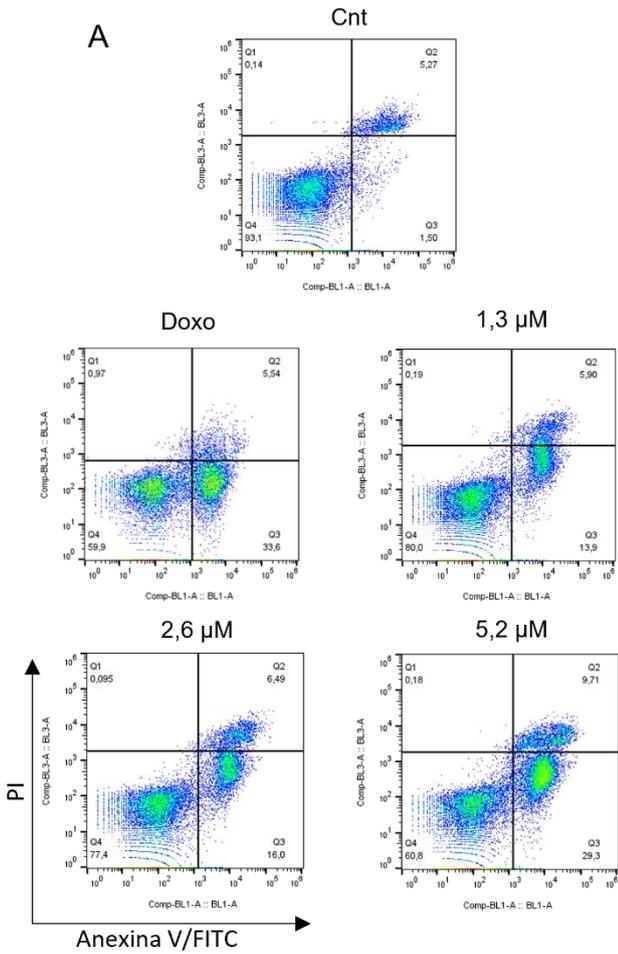


Figura 12. Análise de citometria de fluxo após tratamento com o composto 1-(1-tosyl-1H-indol-3-yl)propan-1-one por 24 horas. Imagem representativa dos gráficos de citometria (*Dot plot*) divididos em quatro quadrantes: Células viáveis (Anexina V-/PI-), apoptose inicial (Anexina V+/PI-), apoptose tardia (Anexina V+/PI+) e necrose (Anexina V-/PI+), do tratamento com o composto 1-(1-tosyl-1H-indol-3-yl)propan-1-one na linhagem A549 (**A**) e B16F10 (**C**). Análise quantitativa do percentual de células viáveis, apoptose inicial e tardia e necrose na linhagem A549 (**B**) e B16F10 (**D**). O fármaco doxorrubicina (Doxo) (10 μ M) foi usado como controle positivo e DMSO (0,02%) foi usado como controle negativo (Cnt). As análises entre os grupos foram realizadas com ANOVA, seguida do pós-teste de *Dunnet* (*) $P < 0,01$; (**) $P < 0,001$; entre tratamentos e controle. Os dados representam a média \pm DP de três experimentos independentes.

5.6 Avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos pelo 1-(1-tosyl-1H-indol-3-yl)propan-1-one

Para avaliar a atividade hemolítica em eritrócitos após exposição ao composto 1-(1-tosyl-1H-indol-3-yl)propan-1-one foi utilizada uma concentração de até $100 \times$ a Cl_{50} . O intuito foi averiguar a citotoxicidade do composto em concentrações elevadas em eritrócitos humanos e murino. Como resultados, o composto derivado do indol não apresentou efeito hemolítico em eritrócitos humanos e murino nas concentrações testadas quando comparadas com o controle positivo de hemólise (Triton X 100). O Triton \times 100, por sua vez, apresentou 100% de atividade hemolítica (Figura 13).

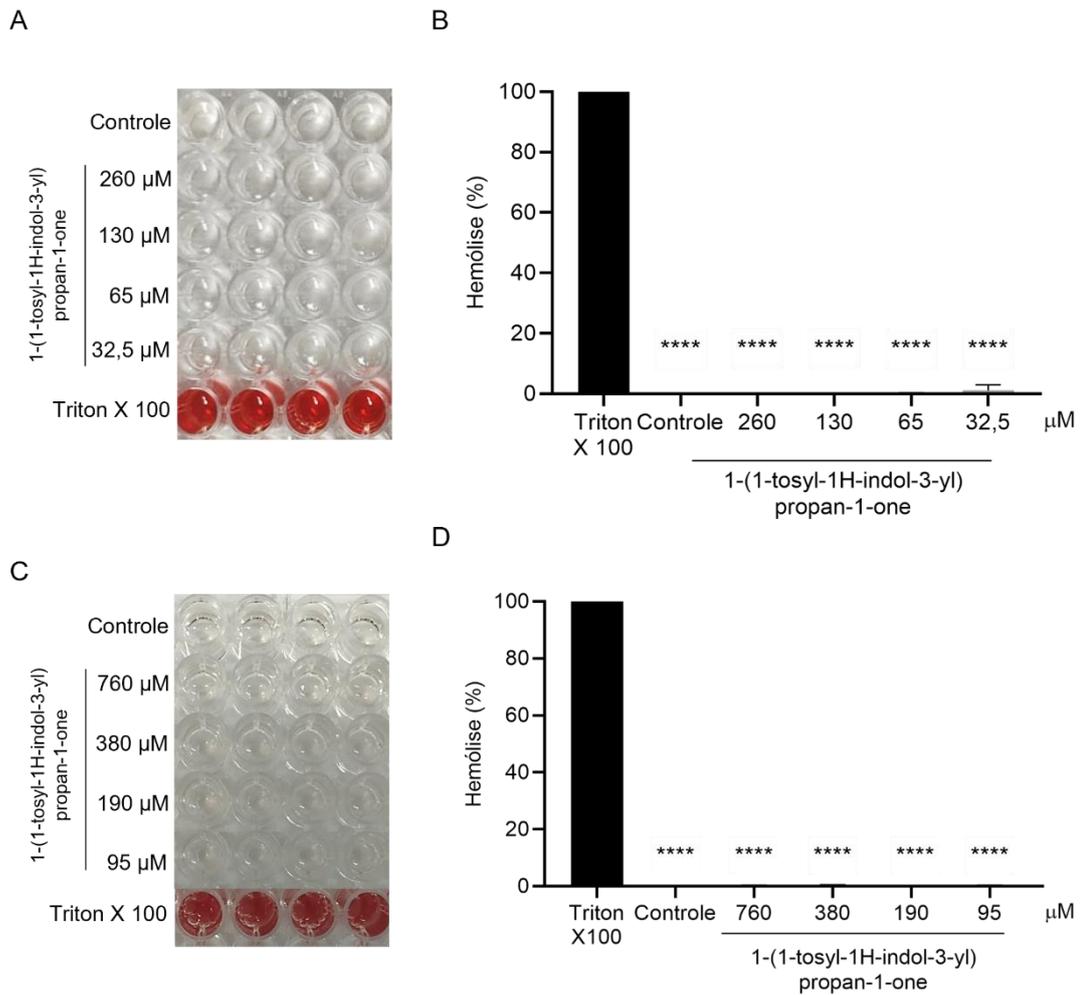


Figura 13. Ensaio de hemólise em eritrócitos. Fotografia de um experimento representativo em eritrócitos humanos (**A**) e de camundongos C57BL/6 (**C**). Triton X 100 (1%) foi utilizado como controle positivo de hemólise. Gráfico da porcentagem de hemólise em eritrócitos humanos (**B**) e de camundongos C57BL/6 (**D**). As análises entre os grupos foram realizadas com ANOVA, seguida do pós-teste de *Dunnet* (****) $p < 0,0001$ em relação ao controle. Os dados representam a média \pm DP de três experimentos independentes realizados em quadruplicata.

6 DISCUSSÃO

O Indol está incluído no grupo dos glucosinolatos, que são metabólitos liberados e convertidos em isotiocianatos pela enzima mirosinase quando as células vegetais são danificadas em processos de estresse biológico (Shapiro *et al.*, 1998). Dentre os mecanismos de ação dos glucosinolatos, pode-se destacar a inibição da expressão do fator de necrose tumoral- α (TNF α) e interleucina-1 β (IL- β), indução da apoptose, indução de ROS, interrupção da via das caspases, STAT1 / STAT2. Além disso, os glucosinolatos inibem a angiogênese, regulando as células de defesa do organismo, aumentando a expressão de p53, p21, caspases 3 e 9 e modulando o NF- κ B em câncer de mama, cólon, pâncreas, ovário, próstata e carcinoma espinocelular (Orouji *et al.*, 2023; Soudararajan *et al.*, 2018; Shapiro *et al.*, 1998). Na literatura já se encontra descrita as ações dos glucosinolatos em linhagens de câncer de mama, cérebro, leucemias, osso, cólon, gástrico, fígado, pulmão, oral, pâncreas, próstata, neuroblastoma humano, células do túbulo proximal do epitélio renal e células do músculo liso da aorta (Soudararajan *et al.*, 2018; Hecht *et al.*, 2000; Guerrero-Beltrán *et al.*, 2012).

O Indol apresenta atividade antiproliferativa contra linhagens de HeLa, HT29, MCF7, HL-60 e U-937, uma linhagem de leucemia mieloide humana, linfomas e glioma (C6) (Prete *et al.*, 2018; Danisman-Kalindermirtas *et al.*, 2022; Andrade *et al.*, 2024). No presente estudo foi avaliado o efeito citotóxico do derivado sintético do Indol 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one nas linhagens tumorais B16F10, A549, MCF7 e PC-3. Nas quatro linhagens estudadas a CI_{50} ficou abaixo ou igual a 10 μ M após tratamento com o composto 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one. Corroborando com os nossos resultados, Andrade e colaboradores (2024) observaram que o indol e seus derivados foram capazes de inibir o crescimento das linhagens C6, B16F10 e A549 com uma CI_{50} abaixo de 10 μ M após 72 horas de tratamento (Andrade *et al.*, 2024). Em células de carcinoma: pâncreas BxPC-3, próstata LNCaP, próstata C4-2B, próstata PC-3 e o carcinoma de mama triplo-negativo MDA-MB-231, Ahmad e colaboradores (2019) identificaram um efeito citotóxico duas a cinco vezes maior no tratamento com os derivados sintéticos do Indol quando comparados ao Indol (Ahmad *et al.*, 2019). Segundo Kuete e colaboradores (2014), para que um composto seja considerado um poderoso agente antitumoral, seus valores de CI_{50} devem ser inferiores a 10 μ M após 72 horas de tratamento (Kuete *et al.*, 2014).

O alto efeito citotóxico do derivado do Indol 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one pode ser explicado pela adição do radical aril no anel benzênico ligado à molécula de oxigênio e à cadeia carbônica, que tanto aumenta o tamanho da molécula quanto contribui para diminuir a interação com a água. Essas modificações podem ter contribuído para a velocidade da absorção, a ligação com proteínas plasmáticas, a metabolização do composto e, conseqüentemente, a citotoxicidade em células tumorais.

O ensaio clonogênico consiste em avaliar a viabilidade proliferativa e a capacidade de formação de colônias por uma única célula após um período de incubação, no qual as células são mantidas em condições favoráveis de crescimento (Franken *et al.*, 2006). Nesse trabalho observamos que o composto 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one inibiu a formação de colônias nas linhagens A549 e B16F10 em comparação com o controle sem tratamento. Outros trabalhos mostram a redução do número de colônias de células de glioma (C6) após tratamento com compostos heterocíclicos, grupo no qual o Indol está inserido (Ramirez *et al.*, 2020; Andrade *et al.*, 2024). Sabol e colaboradores (2000) comprovaram que fitoalexinas indólicas apresentaram efeito antiproliferativo nas linhagens B16 e L1210 (Sabol *et al.*, 2000).

Células tumorais são capazes de se desprender da massa tumoral e migrar para novos tecidos e órgãos. A busca por novos compostos que possam inibir a capacidade de migração celular pode inibir a invasividade de células tumorais contribuindo para um prognóstico positivo da doença (Motta *et al.*, 2024). Nossos resultados mostram que o tratamento com o composto 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one inibiu a migração de células de câncer de pulmão e células de melanoma. Corroborando com os resultados encontrados nesta pesquisa, Andrade e colaboradores (2024) observaram que derivados Indólicos inibiram a migração em linhagem de glioma (Andrade *et al.*, 2024). Ma e colaboradores (2017) observaram que o tratamento com o composto desoxiarbutina, derivado de produto natural, foi capaz de inibir a metástase tumoral *in vitro* e *in vivo* em melanoma, através de uma via apoptótica associada a mitocôndrias mediadas por p38 (Ma *et al.*, 2017).

A perda da capacidade da migração celular pode estar associada a alterações funcionais do citoesqueleto. O citoesqueleto é formado por uma rede de proteínas que dão forma à célula. Ele fornece o suporte estrutural celular e proporciona a mobilidade

de organelas intracelulares, fatores importantes para a movimentação e consequentemente migração celular (Linartevichi *et al.*, 2021).

Nesse trabalho observamos alterações na morfologia das células de câncer de pulmão e células de melanoma após marcação com a sonda Faloidina/FITC. Esse corante se liga aos filamentos de actina que formam o citoesqueleto das células. Foi possível visualizar perda do volume citoplasmático, fragmentação do citoplasma, projeções apoptóticas do citoplasma além de redução no número de células com o aumento da concentração do composto 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one. No núcleo das células, corados com o DAPI, foi possível observar principalmente fragmentação do DNA. O DAPI é um corante fluorescente que se liga fortemente ao DNA das células. Estas alterações mostram que o composto 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one tanto reduz a capacidade migratória e a proliferação de células cancerígenas quanto dão sinais de apoptose celular (Obeng *et al.*, 2021).

A morte de células tumorais por apoptose é menos prejudicial por se tratar de uma morte celular amplamente regulada, na qual não há extravasamento do material citoplasmático e nuclear das células, reduzindo ou evitando um processo inflamatório (Chen *et al.*, 2018). Nossos resultados mostram que a linhagem A549 apresentou um alto percentual de células em apoptose inicial após tratamento com as maiores concentrações do composto 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one. Nas células de melanoma foi observado um estágio mais tardio da apoptose após tratamento com a maior concentração do composto 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one.

A evasão das células à apoptose, tanto pela via intrínseca quanto pela via extrínseca, é um dos fatores responsáveis não somente pelo surgimento, desenvolvimento e progressão tumoral, mas também pela resistência das células tumorais às terapias atuais (Pistrino *et al.*, 2016). Encontrar compostos bioativos com capacidade de estimular a morte celular por apoptose em células tumorais é de extrema relevância para o tratamento oncológico. Grande parte das drogas anticâncer testadas atualmente explora justamente as vias de sinalização da apoptose como uma forma de buscar drogas com menos efeitos tóxicos às células não-tumorais (Pistrino *et al.*, 2016; Newton *et al.*, 2024).

Na literatura são encontrados estudos que associam o aumento da marcação com Anexina V em células de câncer de pulmão e melanoma após tratamento com a

maior concentração de derivados sintéticos de produtos naturais ao mecanismo de morte celular por apoptose (Dos Santos *et al.*, 2023; De Franca *et al.*, 2022). Preti e colaboradores (2018) analisou a atividade antiproliferativa de Chalconas à base de Indol, nas quais um dos anéis arila foi substituído por um Indol em linhagens HeLa, HT29, MCF7 e U-937. No trabalho foi observada a superexpressão de Bcl-2 (U-937/Bcl-2) via parada do ciclo celular nas fases G2 e M e indução de apoptose nestas linhagens (Preti *et al.*, 2018).

Outra análise realizada neste estudo foi a toxicidade do composto 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one em eritrócitos humanos e de camundongos C57BL/6 por meio do ensaio de hemólise. O ensaio de hemólise é utilizado para avaliar a toxicidade de compostos em células não tumorais (Andrade *et al.*, 2024). A membrana dos eritrócitos é delicada e pode sofrer alterações após a exposição a compostos, incluindo a possibilidade de ruptura da membrana dessa célula (Evans *et al.*, 2013). No nosso trabalho não foi observada hemólise em eritrócitos humanos e de camundongos C57BL/6 após exposição ao composto 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one, mesmo na concentração mais elevada, de 100 vezes a CI_{50} do composto 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one nas linhagens A549 e B16F10. Andrade e colaboradores (2024) avaliaram a atividade hemolítica do composto derivado do Indol Phenyl(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)methanone (**9**) e não foi observada hemólise em eritrócitos humanos. Dos Santos e colaboradores (2023) também não observaram atividade hemolítica em eritrócitos humanos expostos ao derivado sintético de produto natural O-propargyllawsone (Andrade *et al.*, 2024; Dos Santos *et al.*, 2023).

Os resultados do teste de hemólise em conjunto com os resultados de inibição da formação de colônias, inibição da migração e análise dos mecanismos de morte celular mostram que o composto 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one possui citotoxicidade em células tumorais e não possui efeito tóxico em células saudáveis.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, foi possível concluir que o derivado do Indol 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one apresenta um alto grau de inibição *in vitro* nas linhagens A549, B16F10, MCF7 e PC-3, com as maiores inibições nas linhagens A549 e B16F10. O composto 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one inibiu a formação de colônias e a migração das linhagens A549 e B16F10. Além disso, o composto 1-(1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)propan-1-one induz alterações morfológicas e apoptose nas linhagens A549 e B16F10 e não apresenta atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos C57BL/6 e eritrócitos humanos. Os resultados mostram que o composto avaliado tem efeitos citotóxicos nas células tumorais e não tem efeitos tóxicos nas células saudáveis. Esse trabalho possibilita a continuidade dos estudos sobre o mecanismo de ação do composto proposto para caracterizar e analisar completamente o seu potencial antitumoral *in vitro* e *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ADAMO, P.; LADOMERY, M. R. The oncogene ERG: a key factor in prostate cancer. **Oncogene**, v. 35, n. 4, p. 403–414, 28 jan. 2016.
- AHMAD, A. *et al.* Pentafluorophenyl Substitution of Natural Di(indol-3-yl)methane Strongly Enhances Growth Inhibition and Apoptosis Induction in Various Cancer Cell Lines. **Chemistry & Biodiversity**, v. 16, n. 4, 19 abr. 2019.
- AHMED, B.; QADIR, M. I.; GHAFOOR, S. Malignant Melanoma: Skin Cancer-Diagnosis, Prevention, and Treatment. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, v. 30, n. 4, p. 291–297, 2020.
- ALVES, J. E. F. Estudos de interação com o DNA e a albumina sérica bovina de novos derivados indol-tiazólicos. 2019.
- ALVES, R. S. F. *et al.* Cuidados Paliativos: Alternativa para o Cuidado Essencial no Fim da Vida. **Psicologia: Ciência e Profissão**, v. 39, 2019.
- ANDRADE, A. K. de S. Avaliação do potencial antitumoral in vitro dos derivados sintéticos do indol. 2021. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2021.
- ANDRADE, A. K. DE S. *et al.* Anti-migratory and cytotoxic effect of indole derivative in C6 glioma cells. **Toxicology in Vitro**, v. 96, p. 105786, abr. 2024.
- ANDRADE, L. *et al.* Evaluation of the Cytotoxicity of Structurally Correlated p-Menthane Derivatives. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13264–13280, 21 jul. 2015.
- ANDRADE, M. DE; SILVA, S. R. DA. Administração de quimioterápicos: uma proposta de protocolo de enfermagem. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 60, n. 3, p. 331–335, jun. 2007.
- ASHKENAZI, A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 6, p. 420–430, 1 jun. 2002.
- BARROS, J. A. *et al.* Diagnóstico precoce do câncer de pulmão: o grande desafio. Variáveis epidemiológicas e clínicas, estadiamento e tratamento. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 3, p. 221–227, jun. 2006.
- BERGHE, T. VANDEN *et al.* Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 2, p. 135–147, 23 fev. 2014.
- BHALE, P. S. *et al.* Synthesis of extended conjugated indolyl chalcones as potent anti-breast cancer, anti-inflammatory and antioxidant agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 7, p. 1502–1507, abr. 2017.
- BIRMANN, P. T. *et al.* 3-(4-Chlorophenylselanyl)-1-methyl-1 H -indole, a new selenium compound elicits an antinociceptive and anti-inflammatory effect in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 827, p. 71–79, maio 2018.

BISWAL, S. *et al.* Indole: the molecule of diverse biological activities. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 5, p. 1-6, 2012.

BONASSA E. M. A. Conceitos gerais em quimioterapia antineoplásica. In: BONASSA E. M. A. *et al.* Enfermagem em terapêutica oncológica. São Paulo (SP): Atheneu; 2005. p. 3-19.

BRANCALE, A.; SILVESTRI, R. Indole, a core nucleus for potent inhibitors of tubulin polymerization. **Medicinal Research Reviews**, v. 27, n. 2, p. 209–238, 20 mar. 2007.

BRUMATTI, G.; SALMANIDIS, M.; EKERT, P. G. Crossing paths: interactions between the cell death machinery and growth factor survival signals. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 10, p. 1619–1630, 16 maio 2010.

CARVALHO, H. D. A. Radioterapia no câncer de pulmão. **Jornal de Pneumologia**, v. 28, n. 6, p. 345–350, nov. 2002.

CHEN, Q.; KANG, J.; FU, C. The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 3, n. 1, p. 18, 1 jul. 2018.

Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. **Nature**, v. 487, n. 7407, p. 330–337, 19 jul. 2012.

CORDON-CARDO, C. Mutations of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. **The American journal of pathology**, v. 147, n. 3, p. 545–60, set. 1995.

CURY, N. M. *et al.* Synthesis and evaluation of 2-carboxy indole derivatives as potent and selective anti-leukemic agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 181, p. 111570, nov. 2019.

CZABOTAR, P. E. *et al.* Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 1, p. 49–63, 20 jan. 2014.

DADASHPOUR, S.; EMAMI, S. Indole in the target-based design of anticancer agents: A versatile scaffold with diverse mechanisms. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 150, p. 9–29, abr. 2018.

DANIŞMAN-KALINDEMIRTAŞ, F. *et al.* Selective Cytotoxic Effects of 5-Trifluoromethoxy-1H-indole-2,3-dione 3-Thiosemicarbazone Derivatives on Lymphoid-originated Cells. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 2, p. 349–355, jan. 2022.

DAVEY, R. J.; WESTHUIZEN, A. VAN DER; BOWDEN, N. A. Metastatic melanoma treatment: Combining old and new therapies. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 98, p. 242–253, fev. 2016.

DE ANDRADE CARVALHO, H.; VILLAR, R. C. Radiotherapy and immune response: the systemic effects of a local treatment. **Clinics**, v. 73, p. e557s, 2018.

- DE FRANCA, M. N. F. *et al.* Anti-proliferative and pro-apoptotic activity of glycosidic derivatives of lawsone in melanoma cancer cell. **BMC Cancer**, v. 21, n. 1, p. 662, 2 dez. 2021.
- DE FRANCISCO, A. L. M. *et al.* Onco-Nefrología: cáncer, quimioterapia y riñón. **Nefrología**, v. 39, n. 5, p. 473–481, set. 2019.
- DENISENKO, T. V.; BUDKEVICH, I. N.; ZHIVOTOVSKY, B. Cell death-based treatment of lung adenocarcinoma. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 2, p. 117, 25 jan. 2018.
- DIAS, Denis Willian de Oliveira. Cardiotoxicidade em mulheres com câncer de mama que utilizaram doxorrubicina: uma revisão integrativa. 2018. 41 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Enfermagem) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.
- DIORI KARIDIO, I.; SANLIER, S. H. Reviewing cancer's biology: an eclectic approach. **Journal of the Egyptian National Cancer Institute**, v. 33, n. 1, p. 32, 1 dez. 2021.
- DOS SANTOS, E. W. P. *et al.* Inhibitory effect of O-propargyllawsone in A549 lung adenocarcinoma cells. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 23, n. 1, p. 333, 20 set. 2023.
- EVANS, B. C. *et al.* Ex Vivo Red Blood Cell Hemolysis Assay for the Evaluation of pH-responsive Endosomolytic Agents for Cytosolic Delivery of Biomacromolecular Drugs. **Journal of Visualized Experiments**, n. 73, 9 mar. 2013.
- FARONI, L. *et al.* Role of Stereotactic Radiation Therapy in Operable and Inoperable Early-Stage Non-small Cell Lung Cancer. **Current Treatment Options in Oncology**, v. 23, n. 9, p. 1185–1200, 15 set. 2022.
- FERRAZ, R. P. C. *et al.* Cytotoxic effect of leaf essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae). **Phytomedicine**, v. 20, n. 7, p. 615–621, maio 2013.
- FERNANDES, A. R. *et al.* # 1. Citotoxicidade de materiais indicados em proteções pulpares diretas - estudo in vitro. **Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial**, v. 55, p. e1, out. 2014.
- FERNANDEZ, A.; JATENE, F. B.; ZAMBONI, M. Diagnóstico e estadiamento do câncer de pulmão. **Jornal de Pneumologia**, v. 28, n. 4, p. 219–228, jul. 2002.
- FLORES, E. R. *et al.* Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: Evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family. **Cancer Cell**, v. 7, n. 4, p. 363–373, abr. 2005.
- FONSECA S. M. *et al.* Protocolo de intervenções de enfermagem frente às reações adversas aos quimioterápicos antineoplásicos. In: FONSECA S. M. *et al.* Manual de quimioterapia antineoplásica. Rio de Janeiro (RJ): Reichmann e Affonso; 2000. p. 28–54.
- FRANKEN, N. A. P. *et al.* Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, 21 dez. 2006a.

FRANKEN, N. A. P. *et al.* Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, 21 dez. 2006b.

GABRIEL, G. *et al.* DEFINIÇÕES E MECANISMOS MOLECULARES EM MORTE CELULAR. **Enciclopédia Biosfera**, v. 14, n. 26, p. 214–234, 5 dez. 2017.

GALLUZZI, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, n. 3, p. 486–541, 23 mar. 2018.

GIACINTI, C.; GIORDANO, A. RB and cell cycle progression. **Oncogene**, v. 25, n. 38, p. 5220–5227, 28 ago. 2006.

GIREK, M. *et al.* Novel tetrahydroacridine derivatives with iodobenzoic moieties induce G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis in A549 non-small lung cancer and HT-29 colorectal cancer cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 460, n. 1–2, p. 123–150, 16 out. 2019.

GOLSTEIN, P.; KROEMER, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 1, p. 37–43, jan. 2007.

GRADA, A. *et al.* Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 137, n. 2, p. e11–e16, fev. 2017.

GRUPO BRASILEIRO DE MELANOMA (GBM). Disponível em: <<https://gbm.org.br/o-melanoma/>>. Acesso em 31 de agosto de 2023.

GUERRA, R. L. *et al.* Cost Utility of Target Therapies Compared to Dacarbazine for First-Line Treatment of Advanced Non-Surgical and Metastatic Melanoma in the Brazilian National Health System. **Value in Health Regional Issues**, v. 20, p. 103–109, dez. 2019.

GUERRERO-BELTRÁN, C. E. *et al.* Protective effect of sulforaphane against oxidative stress: Recent advances. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, n. 5, p. 503–508, jul. 2012.

Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Human Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. [s.l.] OECD, 2002.

HACIOGLU, C. *et al.* Bexarotene inhibits cell proliferation by inducing oxidative stress, DNA damage and apoptosis via PPAR γ / NF- κ B signaling pathway in C6 glioma cells. **Medical Oncology**, v. 38, n. 3, p. 31, 18 mar. 2021.

HÄGGLÖF, C. *et al.* TMPRSS2-ERG Expression Predicts Prostate Cancer Survival and Associates with Stromal Biomarkers. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e86824, 5 fev. 2014.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, mar. 2011.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, jan. 2000.

HECHT, S. S. INHIBITION OF CARCINOGENESIS BY ISOTHIOCYANATES*. **Drug Metabolism Reviews**, v. 32, n. 3–4, p. 395–411, 10 jan. 2000.

HUTCHINSON, B. D. *et al.* Spectrum of Lung Adenocarcinoma. **Seminars in Ultrasound, CT and MRI**, v. 40, n. 3, p. 255–264, jun. 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Disponível em: [INCA - Instituto Nacional de Câncer](#) |. Acesso em 11 de janeiro de 2023.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Detecção precoce do câncer. Rio de Janeiro, 2021b. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/deteccao-precoce-do-cancer>. Acesso em 11 de janeiro de 2023.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Ambiente, trabalho e câncer: aspectos epidemiológicos, toxicológicos e regulatórios. Rio de Janeiro, 2021a. Disponível em: [Ambiente, Trabalho e Câncer: Aspectos Epidemiológicos, Toxicológicos e Regulatórios | INCA - Instituto Nacional de Câncer](#). Acesso em 11 de janeiro de 2023.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **World Health Organization**. Disponível em: [IARC – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER \(who.int\)](#). Acesso em 11 de Janeiro de 2023.

KARIMABAD, M. N. *et al.* The novel Indole-3-formaldehyde (2-AITFEI-3-F) is involved in processes of apoptosis induction? **Life Sciences**, v. 181, p. 31–44, jul. 2017.

KAUR, K.; JAITAK, V. Recent Development in Indole Derivatives as Anticancer Agents for Breast Cancer. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 8, p. 962–983, 21 ago. 2019.

KELLY, P. M. *et al.* Synthesis, antiproliferative and pro-apoptotic activity of 2-phenylindoles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 18, p. 4075–4099, set. 2016.

KHALID, N.; AZIMPOURAN, M. **Necrosis**. [s.l: s.n.].

KLUCK, R. M. *et al.* The Release of Cytochrome c from Mitochondria: A Primary Site for Bcl-2 Regulation of Apoptosis. **Science**, v. 275, n. 5303, p. 1132–1136, 21 fev. 1997.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 1, p. 99–163, jan. 2007.

KUETE, V. *et al.* Cytotoxicity of four Aframomum species (*A. arundinaceum*, *A. alboviolaceum*, *A. kayserianum* and *A. polyanthum*) towards multi-factorial drug resistant cancer cell lines. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 340, 19 dez. 2014.

LEONARDI, G. *et al.* Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). **International Journal of Oncology**, 27 fev. 2018.

LEVINE, A. J. p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. **Cell**, v. 88, n. 3, p. 323–331, fev. 1997.

LEVINE, A. J. Spontaneous and inherited TP53 genetic alterations. **Oncogene**, v. 40, n. 41, p. 5975–5983, 14 out. 2021.

LINARTEVICH, V. F. *et al.* Patogenia das doenças relacionadas ao citoesqueleto: uma revisão da literatura/ Pathogenics of cytoskeleton-related diseases: a review. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 6, p. 60578–60593, 18 jun. 2021.

LOCKSLEY, R. M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M. J. The TNF and TNF Receptor Superfamilies. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 487–501, fev. 2001.

MA, L. *et al.* Deoxyarbutin displays antitumour activity against melanoma in vitro and in vivo through a p38-mediated mitochondria associated apoptotic pathway. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 7197, 3 ago. 2017.

MACHADO R. C. L. *et al.* Quimioterápicos antineoplásicos. In: FONSECA S. M. *et al.* Manual de quimioterapia antineoplásica. Rio de Janeiro (RJ): Reichmann e Affonso; 2000. p. 8-13.

MAHMOUD, T. S. *et al.* In vitro cytotoxic activity of Brazilian Middle West plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 3, p. 456–464, jun. 2011.

MARTINS, T. C. DE F. *et al.* Transição da morbimortalidade no Brasil: um desafio aos 30 anos de SUS. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 26, n. 10, p. 4483–4496, out. 2021.

MCGAVIN, M. D; ZACHARY, J. F. Bases da patologia em veterinária. 4ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009. 1476p.

MENDES, E. C.; VASCONCELLOS, L. C. F. DE. Cuidados paliativos no câncer e os princípios doutrinários do SUS. **Saúde em Debate**, v. 39, n. 106, p. 881–892, set. 2015.

MIRANDA-FILHO, A. *et al.* A modeling analysis to compare eligibility strategies for lung cancer screening in Brazil. **eClinicalMedicine**, v. 42, p. 101176, dez. 2021.

MONTALVÃO, M. M. *et al.* Cytotoxic activity of essential oil from Leaves of *Myrcia splendens* against A549 Lung Cancer cells. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 23, n. 1, p. 139, 2 maio 2023.

MOTTA, J. M. *et al.* A low-anticoagulant heparin suppresses metastatic dissemination through the inhibition of tumor cell-platelets association. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 171, p. 116108, fev. 2024.

NARSIMHA, S. *et al.* Indole-2-carboxylic acid derived mono and bis 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles: Synthesis, characterization and evaluation of anticancer, antibacterial, and DNA-cleavage activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 6, p. 1639–1644, mar. 2016.

NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CARE EXCELLENCE. **NICE Guideline Suspected cancer: recognition and referral**. 24 ago. 2023. Disponível

em: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng12/chapter/Recommendations-organised-by-site-of-cancer#skin-cancers>. Acesso em 10 fev. 2024.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 27 mar. 2020.

NEWTON, K. *et al.* Cell death. **Cell**, v. 187, n. 2, p. 235–256, jan. 2024.

NOVAES, F. T. *et al.* Câncer de pulmão: histologia, estágio, tratamento e sobrevida. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 34, n. 8, p. 595–600, ago. 2008.

NOVAES, Mateus Cherulli. Análise tridimensional do osso submetido à radioterapia oncológica. 2018. 22 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

OBENG, E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, n. 4, p. 1133–1143, dez. 2021.

OLIVEIRA, D. E. de. Infecção pelo vírus de Epstein-Barr (EBV) e vírus do papiloma humano (HPV), expressão da proteína p53 e proliferação celular em carcinomas de nasofaringe e laringe. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu. São Paulo. 2002.

OLIVEIRA, P. A. *et al.* Chemical carcinogenesis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 4, p. 593–616, dez. 2007.

OROUJI, N. *et al.* Glucosinolates in cancer prevention and treatment: experimental and clinical evidence. **Medical Oncology**, v. 40, n. 12, p. 344, 3 nov. 2023.

OTTONI, M. F. *et al.* Síntese e avaliação preliminar da atividade citotóxica de 2-O-(2acetamido-3, 4, 6-tri-O-acetil-2-desoxi- β -Dglicopiranosil)lapachol. **Sociedade Brasileira de Química, 36ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2013.

OW, Y.-L. P. *et al.* Cytochrome c: functions beyond respiration. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 7, p. 532–542, jul. 2008.

PARK, W. *et al.* Diversity and complexity of cell death: a historical review. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 55, n. 8, p. 1573–1594, 23 ago. 2023.

PATIL, S. A.; PATIL, R.; MILLER, D. D. Indole Molecules As Inhibitors Of Tubulin Polymerization: Potential New Anticancer Agents. **Future Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 16, p. 2085–2115, 16 out. 2012.

PEDROSA, S. C. B. d. L. Síntese, caracterização estrutural e estudos do mecanismo de ação antitumoral de derivados indólicos. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco. Pernambuco. 2017.

PÊGO-FERNANDES, P. M. *et al.* The role of the surgeon in treating patients with lung cancer. An updating article. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 139, n. 3, p. 293–300, jun. 2021.

PISTRITTO, G. *et al.* Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. **Aging**, v. 8, n. 4, p. 603–619, 27 mar. 2016.

PRADO, B. B. F. DO. Influência dos hábitos de vida no desenvolvimento do câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 1, p. 21–24, 2014.

PRETI, D. *et al.* Design, synthesis, *in vitro* antiproliferative activity and apoptosis-inducing studies of 1-(3',4',5'-trimethoxyphenyl)-3-(2'-alkoxycarbonylindolyl)-2-propen-1-one derivatives obtained by a molecular hybridisation approach. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 33, n. 1, p. 1225–1238, 1 jan. 2018.

RAJARATNAM, V. *et al.* Glioblastoma: Pathogenesis and Current Status of Chemotherapy and Other Novel Treatments. **Cancers**, v. 12, n. 4, p. 937, 10 abr. 2020.

RIEDL, S. J.; SHI, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 11, p. 897–907, nov. 2004.

RIEGER, A. M. *et al.* Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. **Journal of Visualized Experiments**, n. 50, 24 abr. 2011.

ROOS, W. P.; THOMAS, A. D.; KAINA, B. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 1, p. 20–33, 18 jan. 2016.

SABOL, M. *et al.* Cytotoxic effect of cruciferous phytoalexins against murine L1210 leukemia and B16 melanoma. **Biologia** 2000, 55, 701–707, 2000.

SHAIKH, I. *et al.* Study of Antimicrobial and Antifungal Activity of the Bis- Indole Derivatives of 2-Phenyl-1-H-Indole. **International Journal of Scientific Research in Science, Engineering and Technology**, v. 4, n. 3, p. 34–37, 2018.

SHAKIL, MD. S. *et al.* Key considerations when using the sulforhodamine B assay for screening novel anticancer agents. **Anti-Cancer Drugs**, v. 33, n. 1, p. 6–10, 12 jan. 2022.

SHAPIRO, T. A. *et al.* Human metabolism and excretion of cancer chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of cruciferous vegetables. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 7, n. 12, p. 1091–100, dez. 1998.

SHERR, C. J.; MCCORMICK, F. The RB and p53 pathways in cancer. **Cancer Cell**, v. 2, n. 2, p. 103–112, ago. 2002.

SILVA, L. V. B. *et al.* Efeitos adversos e qualidade de vida em pacientes que fazem quimioterapia e radioterapia / Adverse effects and quality of life in patients under chemotherapy and radiotherapy. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 4, p. 32544–32549, 29 abr. 2022.

SINGH, T. P.; SINGH, O. M. Recent Progress in Biological Activities of Indole and Indole Alkaloids. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 1, 8 dez. 2017.

SOUNDARARAJAN, P.; KIM, J. S. Anti-Carcinogenic Glucosinolates in Cruciferous Vegetables and Their Antagonistic Effects on Prevention of Cancers. **Molecules**, v. 23, n. 11, p. 2983, 15 nov. 2018.

SOUSA, I. J. O. *et al.* Estudo fitoquímico, avaliação da capacidade hemolítica e antimicrobiana de um extrato bruto da casca do caule de *Ziziphus joazeiro* Mart. (*Rhamnaceae*). **BIOFARM - Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 208–225, 2023. Disponível em: <https://revista.uepb.edu.br/BIOFARM/article/view/2135>.

SOUSSI, T.; DEHOUCHE, K.; BÉROUD, C. p53 Website and analysis of p53 gene mutations in human cancer: Forging a link between epidemiology and carcinogenesis. **Human Mutation**, v. 15, n. 1, p. 105–113, jan. 2000.

SPERA, K. D. *et al.* Genotoxicity, anti-melanoma and antioxidant activities of *Hymenaea courbaril* L. seed extract. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 4, 2019.

TEIXEIRA, I. N. D. O.; GUARIENTO, M. E. Biologia do envelhecimento: teorias, mecanismos e perspectivas. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, n. 6, p. 2845–2857, set. 2010.

TOMLINS, S. A. *et al.* Role of the TMPRSS2-ERG Gene Fusion in Prostate Cancer. **Neoplasia**, v. 10, n. 2, p. 177-IN9, fev. 2008.

TSAO, H. *et al.* Early detection of melanoma: Reviewing the ABCDEs. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 72, n. 4, p. 717–723, abr. 2015.

VAN HOOGSTRATEN, L. M. C. *et al.* Global trends in the epidemiology of bladder cancer: challenges for public health and clinical practice. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 20, n. 5, p. 287–304, 13 maio 2023.

VOSKARIDES, K.; GIANNOPOULOU, N. The Role of TP53 in Adaptation and Evolution. **Cells**, v. 12, n. 3, p. 512, 3 fev. 2023.

WAJANT, H. The Fas Signaling Pathway: More Than a Paradigm. **Science**, v. 296, n. 5573, p. 1635–1636, 31 maio 2002.

WEINSTEIN, J. N. *et al.* The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. **Nature Genetics**, v. 45, n. 10, p. 1113–1120, 26 out. 2013.

WILD, C. P. *et al.* World cancer report: cancer research for cancer prevention. **Lyon, France: International Agency for Research on Cancer**, 2020. Disponível em: <http://publications.iarc.fr/586>.

YARROW, J. C. *et al.* Um ensaio de migração de células de alto rendimento usando a cicatrização de feridas de risco, uma comparação dos métodos de leitura baseados em imagem. **BMC Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 21, 2004.

Anexo 1 – Comitê de Ética no Uso de Animais da UFS



Universidade
Federal de
Sergipe

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do potencial antineoplásico do derivado sintético do Indol em modelos in vitro e in vivo de câncer de pele do tipo melanoma.", protocolada sob o CEUA nº 5248200923 (ID 000794), sob a responsabilidade de **Cristiane Bani Corrêa e equipe; João Henrique Oliveira Bonifácio; RICARDO GUIMARÃES AMARAL** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Sergipe (CEUA/UFS) na reunião de 21/12/2023.

We certify that the proposal "Evaluation of the antineoplastic potential of synthetic indole derivative in in vitro and in vivo models of melanoma skin cancer.", utilizing 60 Isogenics mice (60 males), protocol number CEUA 5248200923 (ID 000794), under the responsibility of **Cristiane Bani Corrêa and team; João Henrique Oliveira Bonifácio; RICARDO GUIMARÃES AMARAL** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sergipe (CEUA/UFS) in the meeting of 12/21/2023.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [11/2023](#) a [12/2026](#) Área: [Ciências Biológicas](#)

| | | | |
|-----------|---|--------|-----------------------------|
| Origem: | Biotério da Universidade Federal de Sergipe | | |
| Espécie: | Camundongos isogênicos | sexo: | Machos |
| Linhagem: | C57BL6 | idade: | 3 a 3 meses |
| | | Peso: | 25 a 30 g |
| | | N: | 60 |

Local do experimento: Biotério de Modelos Biológicos Aplicados, do Departamento de Morfologia - UFS; Laboratório de Biologia e Imunologia de Câncer e Leishmania, do Departamento de Morfologia - UFS.

São Cristóvão, 31 de julho de 2024

Prof. Dr. Josemar Sena Batista
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Sergipe

Prof. Dr. Anderson Carlos Marçal
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Sergipe

Anexo 2 - Comitê de Ética em Pesquisa da UFS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: POTENCIAL CITOTÓXICO IN VITRO DE DERIVADOS DE LAPACHOL, LAUSONA, INDOL E CHALCONAS EM CÉLULAS TUMORAIS E ERITRÓCITOS HUMANOS

Pesquisador: CRISTIANE BANI CORREA

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 55240821.7.0000.5546

Instituição Proponente: Universidade Federal de Sergipe

Patrocinador Principal: FUNDACAO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.532.401

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo "Informações Básicas da Pesquisa" (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1810644..pdf) e do "Projeto Detalhado / Brochura Investigador" (projetcitotoxicidade.docx), postados em 21/06/2022 e 06/04/2022, respectivamente.

Introdução:

O câncer é uma doença crônica não transmissível que afeta milhares de pessoas ao redor do mundo. São conhecidos mais de 100 tipos de cânceres que podem afetar os mais diversos tecidos do organismo (INCA, 2020). O estabelecimento e desenvolvimento do câncer estão ligados a diversos fatores, tais como, alterações genéticas hereditárias ou adquiridas, que levam a proliferação desordenada e ilimitada de células mutadas, possibilitando a formação de massas tumorais, e a evasão da ação do sistema imunológico, angiogênese e outros fatores que possibilitam o seu desenvolvimento (HANAHAH; WEINBERG, 2011). Segundo o Global Cancer Observatory (GLOBOCAN) a prevalência do câncer no mundo para os últimos cinco anos é de 50,5 milhões de casos e a incidência de 19 milhões de casos em 2020. Embora, seja uma doença

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº

Bairro: Sanatório

CEP: 49.060-110

UF: SE

Município: ARACAJU

Telefone: (79)3194-7208

E-mail: cep@academico.ufs.br



Continuação do Parecer: 5.532.401

amplamente estudada e diversos tratamentos estejam disponíveis para o câncer, tais como, quimioterapia, radioterapia, cirurgia e imunoterapia, esta ainda é a segunda doença que mais causa óbitos no mundo com 9,9 milhões casos no último ano (SUNG et al., 2021; WANG; LEI; HAN, 2018). No Brasil, a estimativa para o triênio 2020-2022 é de 625 mil novos casos de câncer sendo os cânceres de pele não melanoma, mama e próstata, cólon e reto, pulmão e estômago os mais incidentes. O impacto global causado pelo câncer e seus altos índices de incidência e prevalência, além da heterogeneidade da doença e a resistência celular ao tratamento com quimioterápicos revelam a importância dos estudos com novos compostos biologicamente ativos (SUNG et al., 2021; YELDAG; RICE; DEL RÍO HERNÁNDEZ, 2018). Produtos de origem natural representam uma importante fonte de moléculas com potencial atividade para tratamento de diversas enfermidades, inclusive o câncer. Cerca de 40% dos fármacos utilizados atualmente e aproximadamente 65% dos fármacos antineoplásicos são oriundos de fontes naturais (NEWMAN; CRAGG, 2020). Uma gama de compostos pode ser sintetizada a partir de outros compostos de origem natural e estudos mostram que estes compostos sintéticos podem ser potenciais fonte de substâncias antitumorais por apresentarem atividade citotóxica em células tumorais (ANDRADE et al., 2015; DE FRANCA et al., 2021). Newman e Cragg (2020) evidenciaram que cinquenta e oito compostos utilizados no tratamento do câncer entre 1981 e 2019 são oriundos de modificações estruturais de compostos já existentes. No entanto, é importante que os novos compostos sintetizados apresentem baixa citotoxicidade em células não tumorais, para reduzir danos às células normais do organismo. Além disso, a baixa citotoxicidade em células nas tumorais podem auxiliar na seleção de compostos promissores. Assim, a proposta desse trabalho é selecionar cerca de 40 compostos sintéticos derivados de lapachol, lausona, chalcona e indol com alto potencial antitumoral e que tenham baixa toxicidade em células normais. O intuito é formar um banco de compostos antitumorais que serão armazenados no Laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Morfologia da UFS, para novos estudos que visem estudar o mecanismo de ação desses compostos.

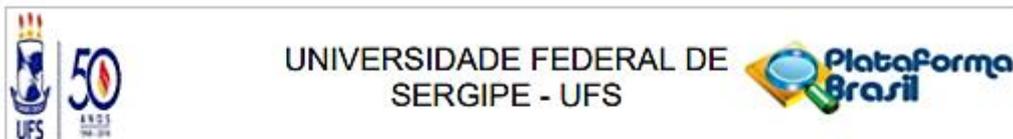
Hipótese:

Derivados sintéticos de lapachol, lausona, chalconas e indol possuem alta atividade citotóxica em células tumorais e baixa toxicidade em células não tumorais

Metodologia Proposta:

ENSAIO DE CITOTOXIDADE – SULFORODAMINA BAs células das linhagens de carcinoma de pulmão (A549), melanoma (B16-F10), glioma (C6), mama (MCF-7) e próstata (PC-3) serão semeadas em

| | |
|---|-------------------------------------|
| Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº | CEP: 49.060-110 |
| Bairro: Sanatório | |
| UF: SE | Município: ARACAJU |
| Telefone: (79)3194-7208 | E-mail: cep@academico.ufs.br |



Continuação do Parecer: 5.532.401

placas de 96 poços contendo meio DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal de Bovino (SBF) e 1% de antibiótico (penicilina 10000 U/mL; estreptomicina 10000 mg/mL) com concentração igual a 1×10^4 células/poço. As células serão incubadas em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 à 37°C por 24 h para aderência. Após esse tempo as células serão tratadas com $25 \mu\text{M}$ dos derivados do lapachol, lausona, indol e chalcona a serem avaliados por 72 h. Dimetilsulfóxido 0,1% e Cloridrato de Doxorrubicina serão usados como

controle negativo e controle positivo de morte, respectivamente. Ao completar o tempo, o meio contendo os tratamentos, controle negativo e controle positivo de morte serão descartados e as células serão fixadas com ácido tricloroacético (30%) por uma hora à 4°C . A placa será lavada por 4 vezes com água destilada e seca. Um volume final de $100 \mu\text{L}$ da solução de Sulforodamina B (SRB) 0,057% (p/v) dissolvida em ácido acético (1%) será

adicionado aos poços por 30 min em temperatura ambiente (TA). A placa será lavada por 4 vezes com ácido acético para remoção do excesso de corante e seca. TRIS base (10 mM; pH 10,5) será usado para diluição do SRB por 30 min e então a placa será lida em leitor de microplaca (Synergy H1, Biotek, VT, EUA) por espectrofotometria com comprimento de onda de 510 nm. O 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). Os valores de absorvância serão convertidos a porcentagem de inibição do crescimento celular a partir da fórmula: % Inibição do crescimento = $\{100 - [(Abs \text{ (células tratadas)} / Abs. \text{ (controle)}) \times 100]\}$ Para os derivados do lapachol, lausona, indol e chalcona que causarem maior inibição no crescimento das células será determinada metade da concentração inibitória máxima (IC50). Será utilizada a mesma metodologia descrita anteriormente neste item modificando-se apenas as concentrações avaliadas que irão de 0 a $25 \mu\text{M}$ para identificação do(s) composto(s) mais potente(s). Os derivados sintéticos de lapachol, lausona, indol e chalcona com IC50 menor ou igual a $10 \mu\text{M}$ serão considerados promissores e avaliados nos testes posteriores (KUETE et al., 2014). 1.2. ENSAIO DE HEMÓLISE ensaio de hemólise é amplamente utilizado para avaliação da atividade citotóxica in vitro em eritrócitos pela análise de danos causados a membrana destas células pelos compostos em teste (SHARMAN P., SHARMA J. D., 2001). Por isso, será avaliada a toxicidade de compostos derivados de lapachol (10 compostos), lausona (10 compostos), indol (10 compostos) e chalcona (10 compostos) em eritrócitos humanos. As coletas de sangue serão realizadas de abril a junho de 2022, janeiro a março de 2023 e janeiro a março

e outubro a dezembro de 2024 e serão convocados 30 voluntários no decorrer desse período. A

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº

Bairro: Sanatório

CEP: 49.060-110

UF: SE

Município: ARACAJU

Telefone: (79)3194-7208

E-mail: cep@academico.ufs.br



Continuação do Parecer: 5.532.401

amostra de 30 voluntários foi determinada a partir de estudos que sugerem um n amostral de 2 a 3 indivíduos para cada composto (ROSA et al., 2015; MESDAGHINIA et al., 2019). Alunos de graduação, técnicos do departamento de morfologia e alunos de pós-graduação da Universidade Federal de Sergipe serão convidados a participar como voluntários da presente pesquisa. Os critérios de inclusão para os voluntários serão: maiores de 18 anos, não fumantes (últimos 6 meses), não esteja em uso de medicação regular e aqueles que assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Não serão incluídos na pesquisa mulheres grávidas e indivíduos que não puderem doar o mínimo de amostra biológica necessária. As coletas de sangue serão realizadas no Laboratório de Biologia e Imunologia do Câncer e Leishmania por profissionais capacitados e seguirão os protocolos de biossegurança e de boas práticas laboratoriais. O estudo será conduzido de acordo com os p

Critério de Inclusão:

Serão incluídos homens e mulheres maiores de 18 anos.

Critério de Exclusão:

Serão excluídos menores de 18 anos, mulheres grávidas e indivíduos que não puderem doar o mínimo de amostra biológica necessária.

Metodologia de Análise de Dados:

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 CCs50 serão obtidos através da utilização do programa GraphPadPrism 8.

Desfecho Primário:

Identificar compostos derivados de lapachol, lausonas, chalconas e indol que tenham atividade citotóxica em células tumorais e baixa atividade citotóxica em células não tumorais.

Desfecho Secundário:

Obter compostos promissores para o tratamento do câncer.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar o efeito citotóxico dos derivados de lapachol, lausona, indol e chalcona nas células

Endereço: Rua Cláudio Batista s/n°
 Bairro: Sanatório CEP: 49.060-110
 UF: SE Município: ARACAJU
 Telefone: (79)3194-7208 E-mail: cep@academico.ufs.br



Continuação do Parecer: 5.532.401

tumorais de carcinoma de pulmão, melanoma, glioma, câncer de mama e próstata e a toxicidade em eritrócitos humanos.

Objetivo Secundário:

Avaliar a citotoxicidade de 40 compostos derivados de lapachol, lausona, indol e chalcona em células tumorais.

Determinar a IC50 dos compostos mais citotóxicos de lapachol, lausona, indol e chalcona em células tumorais.

Avaliar a citotoxicidade dos compostos derivados de lapachol, lausona, indol e chalcona em eritrócitos humanos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

As coletas de sangue seguirão os protocolos de biossegurança e de boas práticas laboratoriais, sendo realizada por profissional qualificado e habilitado. O estudo será conduzido de acordo com os princípios da Declaração de Helsinkí e os riscos para os indivíduos serão mínimos, já que é a coleta de sangue é um procedimento minimamente invasivo.

Benefícios:

Os derivados do lapachol e da lausona podem ser uma importante fonte de novos fármacos com atividade antitumoral.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Em um primeiro momento, serão cultivadas e mantidas in vitro as linhagens de células tumorais de adenocarcinoma de pulmão (A549), melanoma (B16-F10), glioma (C6), mama (MCF-7) e próstata (PC-3). Será realizado o teste de citotoxicidade por SRB dos derivados sintéticos de lapachol, lausona, chalcona e indol sobre essas linhagens. Após seleção dos derivados com potencial antitumoral, será determinada a IC50 destes, também pelo ensaio de SRB. Em seguida, serão realizados os experimentos para avaliar a toxicidade em eritrócitos humanos dos compostos mais promissores.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de inadequações"

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº
Bairro: Sanatório **CEP:** 49.060-110
UF: SE **Município:** ARACAJU
Telefone: (79)3194-7208 **E-mail:** cep@academico.ufs.br



Continuação do Parecer: 5.532.401

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Análise das respostas (arquivo: "CARTARESPPOSTASPENDENCIASCEPUFS2.pdf", postado na Plataforma Brasil em 21/06/2022) ao Parecer Consubstanciado nº 5.437.724 emitido em 30/05/2022

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Sergipe, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 510 de 2016, na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme Resolução CNS 466/2012, itens X.1.- 3.b. e XI.2.d, e Resolução CNS 510/2016, Art. 28, inc. V, os pesquisadores responsáveis deverão apresentar relatórios parcial semestral e final do projeto de pesquisa, contados a partir da data de aprovação do protocolo de pesquisa inicial.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|---|------------------------|--------------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1810644.pdf | 21/06/2022 21:58:18 | | Aceito |
| Outros | CARTARESPPOSTASPENDENCIASCEPUFS2.pdf | 21/06/2022 21:57:04 | MARIANA NOBRE FARIAS DE FRANCA | Aceito |
| Outros | CARTARESPPOSTASPENDENCIASCEPUFS.pdf | 06/04/2022 17:32:26 | MARIANA NOBRE FARIAS DE FRANCA | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | projetcitotoxicidade.docx | 06/04/2022 17:25:51 | MARIANA NOBRE FARIAS DE FRANCA | Aceito |
| Outros | Termo_de_compromisso_e_confidencialidade.pdf | 24/01/2022 08:12:40 | MARIANA NOBRE FARIAS DE FRANCA | Aceito |
| Outros | Termodeanuenciaderivados.pdf | 21/11/2021 21:26:23 | MARIANA NOBRE FARIAS DE FRANCA | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE.docx | 21/11/2021 21:21:18 | MARIANA NOBRE FARIAS DE FRANCA | Aceito |
| Folha de Rosto | folhaDeRostoProjeterivados.pdf | 21/11/2021 21:20:56 | MARIANA NOBRE FARIAS DE FRANCA | Aceito |

Situação do Parecer:

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº
 Bairro: Sanatório CEP: 49.060-110
 UF: SE Município: ARACAJU
 Telefone: (79)3194-7208 E-mail: cep@academico.ufs.br



Continuação do Parecer: 5.532.401

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARACAJU, 18 de Julho de 2022

Assinado por:
FRANCISCO DE ASSIS PEREIRA
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº

Bairro: Sanatório

CEP: 49.060-110

UF: SE

Município: ARACAJU

Telefone: (79)3194-7208

E-mail: cep@academico.ufs.br