

Laura Otto Walter

**AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DE UMA ORTO-  
QUINONA ISOLADA DA ALGA PARDA STYPOPODIUM  
ZONALE SOBRE CÉLULAS DE LINHAGEM DE MIELOMA  
MÚLTIPLO**

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós-Graduação em Farmácia da  
Universidade Federal de Santa Catarina  
para a obtenção do título de Mestre em  
Farmácia  
Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Claudia  
Santos da Silva

Florianópolis  
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Walter, Laura Otto

Avaliação do efeito citotóxico de uma orto-quinona isolada da alga parda *Styopodium zonale* sobre células de linhagem de mieloma múltiplo / Laura Otto Walter ; orientadora, Maria Cláudia Santos da Silva, 2019.  
126 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Mieloma múltiplo. 3. Citotoxicidade. 4. Quinona. 5. Apoptose. I. Santos da Silva, Maria Cláudia. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.





## **FINANCIAMENTO**

Este trabalho foi financiado pelo programa de bolsas da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e realizado no Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH) da Universidade Federal de Santa Catarina, coordenado pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cláudia Santos da Silva.



## AGRADECIMENTOS

Escrever os agradecimentos após o término de um projeto é um momento muito importante e especial, pois nenhuma destas páginas existiriam sem o auxílio e o apoio de todas as pessoas abaixo citadas. Este trabalho faz parte da minha construção pessoal e profissional, é mais um passo que me aproxima dos meus sonhos, dos planos que tenho desde muitos anos atrás.

Agradeço primeiramente a Deus e à minha família: meus pais, **Josselene** e **Silvio**, minha irmã, **Ana Carolina**, meu cunhado **André** e ao meu noivo, que já faz parte dessa família, **Gustavo**. Eu não tenho palavras para descrever o quanto vocês são especiais para mim, o quanto me motivam a ser uma pessoa melhor e o quanto eu os amo.

Agradeço a todos os meus colegas do LOEH: **Íris**, que me ensinou praticamente todas as metodologias presentes neste trabalho, enquanto eu fazia iniciação científica, e foi uma professora maravilhosa, exemplo de dedicação e competência, **Sandro**, **Bruna D.**, **Patrícia**, **Natália**, **Carol**, **Chandra**, **Camila**, **Vitória**, **Amanda**, **Lisandra**, **Douglas**, **Dani**, **Manu**, **Prof.<sup>a</sup> Ana Carolina**, **Tanara**, **Bruna J** e **Prof.<sup>a</sup> Ana Carolina**. Todos vocês tornaram o laboratório um dos meus locais favoritos, fizeram meus dias mais alegres e contribuíram com cada passo do desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço também à **Prof.<sup>a</sup> Miriam de Barcellos Falkenberg**, da Universidade Federal de Santa Catarina, à **Prof.<sup>a</sup> Winklet Gallimore** e ao aluno de doutorado **Sanjay Campbell**, da Universidade das Índias Ocidentais, que me disponibilizaram o composto utilizado no neste trabalho.

Agradeço ao **PGFAR**, à **CAPES** e ao **CNPQ** por me permitirem realizar este mestrado, por investirem e acreditarem na ciência, no conhecimento, que engrandece tanto cada um de nós.

Por fim, agradeço à duas pessoas muito especiais e que foram essenciais para a conclusão deste trabalho. Agradeço à **Prof.<sup>a</sup> Maria Cláudia**, minha orientadora, que desde o início demonstrou confiança em mim, me incentivou. Com você aprendi muito, e como nossa caminhada ainda não acaba por aqui, sei que ainda aprenderei muito mais. Serei

eternamente grata pela oportunidade que você me ofereceu, de conhecer esse mundo maravilhoso da hematologia, de aprender com uma profissional tão competente e determinada. Agradeço também à **Mariana**, que sempre me escutou com tanta paciência, e fez com que eu me apaixonasse ainda mais pela pesquisa. És uma pessoa incrível, uma pesquisadora incrível, tenho certeza que tens um futuro maravilhoso pela frente. Vocês duas são os meus exemplos diários do quanto a nossa profissão é engrandecedora e alimentam a minha vontade de lecionar e de continuar na pesquisa.

Agradeço a todos vocês, que de alguma forma contribuíram com este trabalho.

Muito obrigada!

## RESUMO

O mieloma múltiplo (MM) é uma doença maligna clonal de células plasmocitárias que permanece incurável na atualidade. Assim, o objetivo deste estudo é investigar o efeito citotóxico da *o*-quinona stypoldiona, isolada da alga parda *Styopodium zonale*, sobre células de linhagem de MM. O efeito citotóxico da stypoldiona foi avaliado pelo método do MTT em células MM1.S e células mononucleadas (CM) de sangue periférico. A stypoldiona apresentou, em células MM1.S,  $CI_{50}$  de  $5,38 \pm 0,38 \mu\text{M}$ ,  $2,49 \pm 0,44 \mu\text{M}$  e  $2,55 \pm 0,53 \mu\text{M}$  em 24, 48 e 72 h, respectivamente, e  $CI_{50}$  de 24 h de  $12,19 \pm 0,41 \mu\text{M}$  em CM. A capacidade hemolítica da stypoldiona foi avaliada na concentração de até 10 x o valor de sua  $CI_{50}$  e não foi observada hemólise significativa. A morte por apoptose foi confirmada pela alteração da morfologia celular e pela exposição dos resíduos de fosfatidilserina por citometria de fluxo. Os resultados mostram que o mecanismo envolvido na morte celular induzida pela stypoldiona está relacionado a apoptose intrínseca e extrínseca, pois houve aumento da relação Bax/Bcl-2, perda do  $\Delta\psi_m$ , aumento de AIF e FasR e ativação de caspase-3. Além disso, o tratamento com o composto aumentou a expressão de Ki-67 e survivina e causou um aumento na formação de EROs. A stypoldiona também reduziu a expressão de NF- $\kappa$ B, Akt e pAkt, o que sugere o seu envolvimento na modulação dessas duas vias. O conjunto de resultados apresentados sugere que a stypoldiona é um bom candidato para o desenvolvimento de novos fármacos para a terapia contra o MM.

**Palavras-chave:** Mieloma múltiplo. Citotoxicidade. Apoptose. Quinona. Stypoldiona.



## ABSTRACT

Multiple myeloma (MM) is a clonal plasma cells malignancy that remains incurable at present. Thus, the objective of this study is to investigate the cytotoxic effect of stypoldione compound, isolated from brown alga *Stypodium zonale*, on MM lineage cells. The cytotoxic effect of stypoldione was evaluated by the MTT method in MM1.S cells and PBMCs. Stypoldione presented, in MM1.S cells,  $IC_{50}$  of  $5.38 \pm 0.38 \mu\text{M}$ ,  $2.49 \pm 0.44 \mu\text{M}$  and  $2.55 \pm 0.53 \mu\text{M}$  in 24, 48 and 72 h, respectively, and 24 h  $IC_{50}$  of  $12.19 \pm 0.41 \mu\text{M}$  in CM. The hemolytic capacity of stypoldione was evaluated at the concentration of up to 10 x the value of its  $IC_{50}$  and no significant hemolysis was observed. Death by apoptosis was confirmed by alteration of cell morphology and exposure of phosphatidylserine residues by flow cytometry. Results show that the mechanism involved in stypoldione-induced cell death is related to intrinsic and extrinsic apoptosis, since there was an increase in Bax/Bcl-2 ratio, loss of  $\Delta\psi_m$ , increase in AIF and FasR and activation of caspase-3. In addition, treatment with the compound increased Ki-67 and survivin expression and caused an increase in the formation of ROS. Stypoldione also reduced the expression of NF- $\kappa$ B, Akt and pAkt, which suggests its involvement in modulation of these two pathways. The results suggest that stypoldione is a good candidate for the development of new drugs for therapy against MM.

**Keywords:** Multiple myeloma. Cytotoxicity. Apoptosis. Quinone. Stypoldione.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 As características do câncer .....	20
Figura 2 O desenvolvimento do mieloma múltiplo .....	21
Figura 3 Mecanismo de morte celular: apoptose, autofagia e necrose. .	26
Figura 4 Mecanismo da apoptose intrínseca .....	29
Figura 5 Apoptose extrínseca ativada pelo receptor Fas. ....	30
Figura 6 O ciclo celular e suas proteínas regulatórias. ....	32
Figura 7 Via clássica e alternativa do fator de transcrição NF- $\kappa$ B. ....	34
Figura 8 O papel do NF- $\kappa$ B na patogênese do câncer. ....	35
Figura 9 A via PI3K/AKT/mTOR e sua correlação com a via do fator de transcrição NF- $\kappa$ B .....	37
Figura 10 Estrutura química da stypoldiona e stypotriol.....	40
Figura 11 Redução das quinonas e a formação de EROs. ....	41
Figura 12 Predição <i>in silico</i> da biodisponibilidade oral da stypoldiona.	56
Figura 13 Efeito citotóxico da stypoldiona em células MM1.S .....	60
Figura 14 Efeito citotóxico da stypoldiona em células mononucleadas isoladas de SP.....	61
Figura 15 Efeito da stypoldiona sobre eritrócitos de SP. ....	62
Figura 16 Efeito da stypoldiona na progressão do ciclo celular das células MM1.S. ....	63
Figura 17 Alterações morfológicas induzidas pela stypoldiona em células MM1.S. ....	65
Figura 18 Efeito da stypoldiona na exposição dos resíduos de fosfatidilserina em células MM1.S pelo método da Anexina V conjugada a FITC. ....	66
Figura 19 Efeito da stypoldiona no $\Delta\Psi_m$ de células MM1.S após 24 h de incubação.....	67
Figura 20 Efeito da stypoldiona na expressão das proteínas Bcl-2 e Bax em células MM1.S.....	68
Figura 21 Efeito da stypoldiona na expressão da proteína AIF em células MM1.S. ....	69
Figura 22 Efeito da stypoldiona na expressão do receptor Fas. ....	70
Figura 23 Efeito da stypoldiona na expressão de caspase-3 ativada em células MM1.S. ....	71
Figura 24 Efeito da stypoldiona na expressão da proteína survivina em células MM1.s.....	72
Figura 25 Efeito da stypoldiona na expressão da proteína Ki-67 em células MM1.S. ....	73

Figura 26 Efeito da stypoldiona sobre a formação de EROs .....	74
Figura 27 Efeito da stypoldiona sobre o NF- $\kappa$ B, Akt e pAkt.....	75
Figura 28 Esquema ilustrativo do mecanismo de ação da stypoldiona em células MM1.S .....	93

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Anticorpos utilizados na avaliação por WB. ....	54
Quadro 2 Predição <i>in silico</i> das características físico-químicas, farmacocinéticas e farmacológicas da stypoldiona. ....	57
Quadro 3 Resultados obtidos na predição <i>in silico</i> pelo SWISStargetprediction.....	58



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Valores de CI50 calculados nas células MM1.S após 24, 48 e 72 h de incubação com a stypoldiona.....	60
Tabela 2 Taxa de hemólise (%) provocada pela stypoldiona em diferentes concentrações. ....	62
Tabela 3 Efeito da stypoldiona nas diferentes fases do ciclo celular das células MM1.S. ....	63



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ADME</b> excreção	Absorção, distribuição, metabolismo e
<b>AIF</b>	Fator indutor de apoptose
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>APAF-1</b>	Fator indutor de apoptose 1
<b>BAFF</b>	Fator de ativação de células B
<b>BCA</b>	Ácido bicinonínico
<b>BE</b>	Brometo de etídio
<b>BH</b>	Domínios de homologia com Bcl-2
<b>BHE</b>	Barreira hematoencefálica
<b>BSA</b>	Albumina do soro bovino
<b>CDKs</b>	Quinases dependentes de ciclinas
<b>CEPSH</b> Humanos	Comitê de Ética de Pesquisa em Seres
<b>CF</b>	Citometria de fluxo
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentração inibitória de 50%
<b>CTH</b>	Células-tronco hematopoéticas
<b>CYP</b>	Citocromo P450
<b>DAMPs</b> <i>patterns</i>	Do inglês, <i>damage-associated molecular</i>
<b>DISC</b>	Complexo sinalizador indutor de apoptose
<b>DCC</b>	Receptor DCC netrina 1
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido

<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EDTA</b>	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
<b>EPM</b>	Erro padrão da média
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>FasR</b>	Receptor Fas
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>FSC</b>	Do inglês, <i>forward scatter</i>
<b>HEPES</b> etanosulfônico]	N-[2-hidroxietyl]piperazina-N'[2-
<b>IAP</b>	Proteínas inibidoras da apoptose
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>IKK</b>	IκB quinase
<b>IL-6</b>	Interleucina-6
<b>IMWG</b> <i>Group</i>	Do inglês, <i>International Myeloma Working</i>
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>IκB</b>	Inibidor do complexo κB
<b>LA</b>	Laranja de acridina
<b>LOEH</b> Hemopatias	Laboratório de Oncologia Experimental e
<b>MAPK</b>	Proteína quinase ativada por mitógeno
<b>MGUS</b> indeterminado	Gamopatia monoclonal de significado
<b>MM</b>	Mieloma múltiplo
<b>MO</b>	Medula óssea

<b>MTT</b> difenil-2H-tetrazólio	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-
<b>NF-κB</b>	Fator nuclear kappa B
<b>NIK</b>	Quinase indutora de NF-κB
<b>NTN1</b>	Receptor netrina 1
<b>PAINS</b> <i>compounds</i>	Do inglês, <i>Pan assay interference</i>
<b>PBMCs</b> <i>cell</i>	Do inglês, <i>peripheral blood mononuclear</i>
<b>PBS</b>	Tampão fosfato-salino
<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>PercP</b>	Complexo proteína peridina-clorofila
<b>P-gp</b>	Glicoproteína-P
<b>PI</b>	Iodeto de propídio
<b>PI3K</b>	Fosfoinositol-3-quinase
<b>PIP2</b>	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
<b>PIP3</b>	Fosfatidilinositol 1,4,5-trifosfato
<b>PTEN</b>	Do inglês, <i>phosphatase and tensin homolog</i>
<b>RCD</b>	Do inglês, <i>regulated cell death</i>
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>RIPA</b> <i>Assay</i>	Do inglês, <i>Radioimmunoprecipitation</i>
<b>RNase</b>	Ribonuclease
<b>RNM</b>	Ressonância magnética nuclear
<b>RPMI</b>	Do inglês, <i>Roswell Park Memorial Institute</i>

<b>SBF</b>	Soro fetal bovino
<b>SDS</b>	Docetil Sulfato de Sódio
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SP</b>	Sangue periférico
<b>TCLE</b> Esclarecido	Termo de Consentimento Livre e
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>UFSC</b>	Universidade Federal de Santa Catarina
<b>UNC5A</b>	Receptor netrina unc-5
<b>WB</b>	Western Blotting
<b><math>\Delta\Psi_m</math></b>	Potencial de membrana mitocondrial

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>19</b>
3.1	CÂNCER .....	19
<b>3.1.1</b>	<b>Mieloma Múltiplo (MM).....</b>	<b>20</b>
3.2	INDUÇÃO DA MORTE CELULAR COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA .....	23
<b>3.2.1</b>	<b>Apoptose intrínseca.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Apoptose extrínseca .....</b>	<b>29</b>
3.3	CICLO CELULAR .....	31
3.4	A VIA DE SINALIZAÇÃO PI3K/AKT/mTOR E DO FATOR NF- $\kappa$ B COMO ALVO PARA O TRATAMENTO DO MM.....	33
3.5	O ESTRESSE OXIDATIVO E A TUMORIGÊNESE .....	37
3.6	COMPOSTOS NATURAIS PARA O TRATAMENTO DE NEOPLASIAS MALIGNAS .....	39
<b>3.6.1</b>	<b>Stypoldiona .....</b>	<b>40</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>43</b>
4.1	EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DO COMPOSTO .....	43
4.2	PREDIÇÃO <i>IN SILICO</i> DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS .....	43
4.3	CULTIVO CELULAR.....	44
4.4	DETERMINAÇÃO DAS CURVAS DE CONCENTRAÇÃO E TEMPO RESPOSTA (MÉTODO DO MTT) .....	45
4.5	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA STYPOLDIONA SOBRE CÉLULAS DE SP .....	46
<b>4.5.1</b>	<b>Efeito citotóxico em células mononucleadas de SP.....</b>	<b>46</b>
<b>4.5.2</b>	<b>Teste de hemólise.....</b>	<b>47</b>

4.6	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA STYPOLDIONA NO CICLO CELULAR DAS CÉLULAS MM1.S.....	48
4.7	AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DA APOPTOSE.....	48
<b>4.7.1</b>	<b>Microscopia de fluorescência com BE/LA .....</b>	<b>49</b>
<b>4.7.2</b>	<b>Avaliação da exposição dos resíduos de fosfatidilserina pelo método da Anexina V-FITC.....</b>	<b>50</b>
4.8	AVALIAÇÃO DO COMPROMETIMENTO DO POTENCIAL MITOCONDRIAL ( $\Delta\Psi$ M).....	50
4.9	AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NOS MECANISMOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE (KI-67, BCL-2, BAX, AIF, FASR, CASPASE-3 ATIVADA E SURVIVINA).....	51
4.10	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE NF-KB, AKT E pAKT POR WESTERN BLOTTING (WB).....	52
4.11	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EROS.....	54
4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	55
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>56</b>
5.1	PREDIÇÃO <i>IN SILICO</i> DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS .....	56
5.2	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA STYPOLDIONA SOBRE CÉLULAS MM1.S .....	59
5.3	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA STYPOLDIONA EM CÉLULAS DE SP.....	60
<b>5.3.1</b>	<b>Efeito citotóxico em células mononucleadas de SP .....</b>	<b>60</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Avaliação do efeito hemolítico induzido pela stypoldiona em eritrócitos humanos.....</b>	<b>61</b>
5.4	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA STYPOLDIONA NO CICLO CELULAR DE CÉLULAS MM1.S.....	62
5.5	AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DA APOPTOSE.....	64
<b>5.5.1</b>	<b>Microscopia de fluorescência com BE/LA .....</b>	<b>64</b>
<b>5.5.2</b>	<b>Avaliação da exposição dos resíduos de fosfatidilserina pelo método da Anexina V-FITC.....</b>	<b>66</b>

5.6	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA STYPOLDIONA NO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ( $\Delta\Psi$ M) .....	66
5.7	AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NOS MECANISMOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE ...	67
5.7.1	<b>Investigação do efeito da stypoldiona sobre proteínas da família Bcl-2.....</b>	<b>68</b>
5.7.2	<b>Investigação do efeito da stypoldiona sobre o fator indutor da apoptose (AIF).....</b>	<b>69</b>
5.7.3	<b>Investigação do efeito da stypoldiona sobre o receptor Faz.....</b>	<b>70</b>
5.7.4	<b>Investigação do efeito da stypoldiona sobre a caspase-3 ativada.....</b>	<b>70</b>
5.7.5	<b>Efeito da stypoldiona sobre a proteína antiapoptótica survivina.....</b>	<b>71</b>
5.8	EFEITO DA STYPOLDIONA SOBRE A PROTEÍNA KI-67.....	72
5.9	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA STYPOLDIONA NA GERAÇÃO DE EROS .....	73
5.10	EFEITO DA STYPOLDIONA SOBRE A EXPRESSÃO DE NF- $\kappa$ B, AKT E pAKT.....	74
6	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>76</b>
7	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>92</b>
8	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>94</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>95</b>
	<b>ANEXO A – Parecer do CEPESH da UFSC. ....</b>	<b>105</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O mieloma múltiplo (MM) é uma doença maligna de células plasmocitárias que se acumulam na medula óssea (MO) e levam à destruição óssea e à insuficiência medular. Trata-se da segunda neoplasia hematológica mais comum no mundo e representa cerca de 1,8% do total de neoplasias malignas (SWERDLOW et al., 2017). Nos Estados Unidos, o MM representa próximo a 17% de todas as neoplasias hematológicas e estimou-se, para o ano de 2018, cerca de 30.770 novos casos da doença e 12.770 óbitos relacionados à mesma no país. A incidência de MM na Europa é de 4,5-6,0 casos a cada 100.000 habitantes por ano, com 4,1 mortes anuais a cada 100.000 habitantes (PALUMBO et al., 2011; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018).

No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima-se para o biênio 2018-2019 a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer para cada ano. As neoplasias hematológicas estão entre os dez tipos de cânceres mais incidentes no Brasil, porém, não existem dados epidemiológicos a respeito do MM em âmbito nacional (INCA, 2019). No entanto, em estudos realizados pelo Grupo de Onco-Hematologia do Vale do Paraíba (GOHV), estimou-se, dentro da região, a incidência e prevalência de, respectivamente, 0,7 e 5,7 casos de MM a cada 100.000 habitantes, com sobrevida média de cerca de 38 meses (CALLERA, et al., 2011; CALLERA, et al., 2012). Outro estudo, realizado na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) estimou uma sobrevida média de cerca de 66,52 meses após o diagnóstico, ao realizar um estudo de coorte com 101 pacientes portadores de MM (SILVA et al., 2009).

Além do baixo número de estudos sobre essa doença no Brasil, o MM permanece uma doença incurável e o objetivo dos tratamentos disponíveis atualmente é apenas aumentar a sobrevida e a qualidade de vida dos pacientes (KUMAR et al., 2017a; PALUMBO et al., 2011). O tratamento atual do MM consiste no transplante de células-tronco hematopoéticas (CTH) e na terapia farmacológica, como quimioterapia, imunomoduladores e inibidores de proteossoma. No entanto, sabe-se que o transplante de CTH é contraindicado para pacientes acima de 65 anos de idade, os quais correspondem a dois terços do total de pacientes com

MM. Além disso, os quimioterápicos disponíveis atualmente apresentam inúmeros efeitos adversos severos, o que diminui a qualidade de vida dos pacientes (BERGSAGEL, 2014; BRINGHEN; DE WIT; DIMOPOULOS, 2017; GUGLIELMI et al., 2017; PALUMBO et al., 2009).

Apesar da melhora significativa na sobrevida dos pacientes portadores de MM nos últimos anos devido a introdução de novos fármacos, a heterogeneidade genética da doença resulta em falhas terapêuticas e aponta a necessidade da pesquisa por novas opções de tratamento para essa neoplasia maligna (BERGSAGEL, 2014). Nesse contexto, torna-se evidente a importância de estudos que busquem novos compostos com atividade antineoplásica para o tratamento do MM, com maior eficiência na indução de morte celular das células tumorais e com o mínimo de efeitos adversos para o paciente.

Segundo a literatura, substâncias orgânicas originadas de produtos naturais são utilizadas desde a antiguidade para o tratamento de diversas enfermidades, e inúmeros medicamentos utilizados na atualidade são derivados de vegetais, micro-organismos e organismos marinhos, entre outras fontes naturais. A partir da década de 1950, muitos pesquisadores começaram a se dedicar à pesquisa de produtos naturais para o desenvolvimento de novos fármacos, principalmente para o tratamento de neoplasias malignas, o que culminou na descoberta inúmeros fármacos utilizados até os dias atuais. Dentre eles, destaca-se a descoberta do efeito citotóxico da vincristina e da vimblastina, isolados da *Vinca rosea*, em 1958, e do paclitaxel, isolado da *Taxus brevifolia* em 1967 (BISHAYEE & SETHI, 2016; CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2009; MANN, 2002).

Diante do fato de que mais da metade dos medicamentos utilizados contra o câncer atualmente serem derivados de forma direta ou indireta de produtos naturais e também pelo MM tratar-se de uma neoplasia ainda sem cura, o presente trabalho tem como finalidade avaliar o efeito citotóxico de uma *o*-quinona, a stypoldiona, isolado da alga parda *Styopodium zonale* em células de linhagem de MM. Neste estudo, pretende-se também avaliar a atividade da stypoldiona em relação às vias de sinalização fosfoinositol-3-quinase (PI3K)/AKT/mTOR e do fator nuclear kappa B (NF-κB), as quais se encontram ativadas de forma constitutiva em pacientes com MM e auxiliam na sobrevivência e

proliferação das células tumorais (DI MARZO, et al., 2016; ROY; SARKAR; BASAK, 2018).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito citotóxico do composto natural stypoldiona, uma *o*-quinona isolada da alga parda *Stypopodium zonale*, sobre células de linhagem de mieloma múltiplo (MM1.S) e suas principais vias de indução de morte celular.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito citotóxico da stypoldiona sobre as células de linhagem de mieloma múltiplo MM.1S e determinar sua resposta em relação à concentração e ao tempo de incubação, bem como calcular sua concentração inibitória 50% (CI<sub>50</sub>).

- Investigar o efeito citotóxico da stypoldiona sobre células de sangue periférico de indivíduos considerados saudáveis e também o seu potencial hemolítico.

- Verificar se o composto causa morte celular por apoptose nas células de linhagem de mieloma múltiplo MM.1S.

- Analisar o efeito da stypoldiona no ciclo celular das células MM.1S e sobre o marcador de proliferação celular KI-67.

- Analisar o efeito do composto sobre o potencial mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) das células MM1.S.

- Investigar o efeito da stypoldiona na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) através da avaliação da produção de superóxido mitocondrial em células MM1.S.

- Investigar o efeito da stypoldiona sobre os seguintes fatores reguladores de apoptose: proteína antiapoptótica Bcl-2, proteína pró-apoptótica Bax, fator indutor de apoptose (AIF), receptor Fas, caspase-3 ativada e survivina em células MM1.S.

- Analisar o efeito do composto sobre a atividade do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), além de proteínas das vias PI3K/Akt/mTOR (Akt e pAkt) em células MM.1S.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 CÂNCER

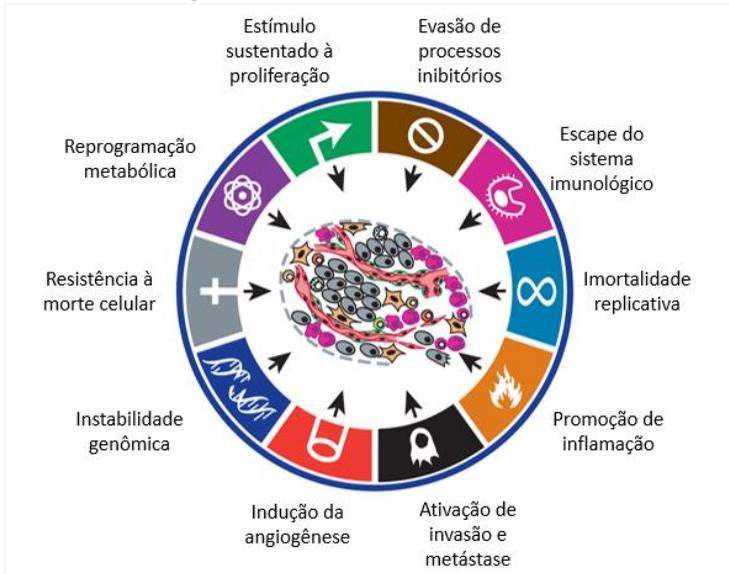
O termo neoplasia é originado do grego antigo e significa “novo crescimento”, ou seja, é definido como uma proliferação anormal e descontrolada de um determinado tecido do organismo. As neoplasias também são descritas como tumores, os quais podem ser divididos em malignos ou benignos de acordo com o seu comportamento clínico. Os tumores são considerados benignos quando apresentam características pouco agressivas, como crescimento lento, localizado e de morfologia semelhante ao tecido de origem. Tumores malignos, por sua vez, possuem crescimento rápido, alta capacidade de invasão e baixo grau de diferenciação. Os tumores malignos são coletivamente denominados cânceres (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2018b).

O câncer é uma condição heterogênea que compreende mais de 100 doenças decorrentes de desordens genéticas causadas por, na maior parte das vezes, mutações no DNA adquiridas de forma espontânea ou induzidas por agressões ambientais. Essas alterações genéticas e epigenéticas alteram a expressão ou a função de genes-chaves que contribuem para a proliferação e sobrevivência das células neoplásicas e para o processo de carcinogênese, onde a expansão clonal de uma única célula progenitora dá origem a inúmeras células filhas que carregam as mesmas mutações (DEBERARDINIS; CHANDEL, 2016; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2018b).

O acúmulo de mutações presentes nas células neoplásicas confere a elas inúmeras características que são essenciais para a sua sobrevivência. Essas características foram denominadas por HANAHAN & WEIBERG, em 2000, como “as características do câncer” e, com o passar dos anos, passaram de seis para dez. São elas: (1) estímulo constante à proliferação; (2) evasão dos processos inibitórios; (3) escape do sistema imunológico; (4) possibilidade de imortalidade replicativa; (5) promoção de inflamação; (6) ativação de invasão e metástase; (7) indução da angiogênese; (8) instabilidade genômica; (9) resistência à morte celular e (10) reprogramação metabólica (Figura 1). Dessa forma, as

células tumorais conseguem se adaptar a inúmeras condições e criar um microambiente tumoral propício para seu desenvolvimento e proliferação (HANAHAN; WEIBERG, 2000; HANAHAN; WEIBERG, 2011; PAVLOVA & THOMPSON, 2016).

Figura 1 As características do câncer



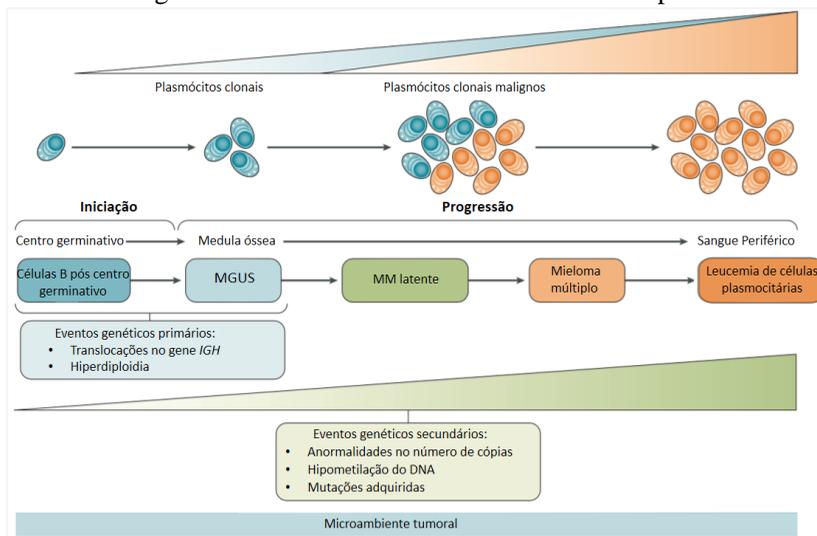
Fonte: Adaptado de HANAHAN; WEIBERG, 2011.

### 3.1.1 Mieloma Múltiplo (MM)

Dentro das mais de cem doenças que compõem o câncer encontra-se o MM, uma neoplasia maligna caracterizada pela expansão clonal de células plasmocitárias que infiltram a MO e levam à destruição óssea, uma das principais características dessa neoplasia. A patogênese do MM tem início com uma translocação no *locus* de uma das cadeias de imunoglobulina (Ig), o que leva à instabilidade genética e dá origem a gamopatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS – do inglês *monoclonal gammopathy of undetermined significance*). Essa condição assintomática pode evoluir para um estágio intermediário, conhecido como MM latente e, após sucessivas mutações nos precursores linfóides

B, dão origem aos plasmócitos tumorais maduros, que possuem capacidade de proliferar sem depender de estímulos estromais e são resistentes à apoptose (Figura 2). Esses eventos resultam na infiltração da MO e no surgimento das lesões líticas (FAIRFIELD et al., 2016; KUEHL; BERGSAGEL, 2002; SWERDLOW et al., 2017). As células malignas infiltradas na MO também são encontradas em locais extramedulares, como no sangue periférico, tecidos moles e órgãos, especialmente no estágio tardio da doença (GONSALVES et al., 2014; KUMAR et al., 2017a).

Figura 2 O desenvolvimento do mieloma múltiplo



O MM, no geral, tem seu início como uma gamopatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS) e seu desenvolvimento é um processo de várias etapas, com evolução para MM latente que, após a progressão da doença e proliferação dos plasmócitos clonais malignos, chega ao estágio de MM. As células clonais podem infiltrar o sangue periférico e, em alguns casos, levar à leucemia de células plasmocitárias. Fonte: Adaptado de KUMAR et al., 2017a.

Na maioria dos pacientes com MM ocorre a secreção de uma Ig monoclonal, conhecida como proteína M ou proteína monoclonal, pelas células plasmocitárias neoplásicas no soro e/ou na urina e esse achado contribui para o diagnóstico da doença. Os critérios estabelecidos pelo *International Myeloma Working Group* (IMWG) em 2014 para o diagnóstico do MM são os mais bem aceitos em todo o mundo e incluem a presença de  $\geq 10\%$  de plasmócitos clonais na MO, biópsia óssea ou plasmocitoma extramedular e a presença de um ou mais dos seguintes achados: lesões em órgãos alvo, como hipercalemia, insuficiência renal, anemia e lesões ósseas líticas; porcentagem de células plasmocitárias clonais na MO  $\geq 60\%$ ; relação entre a cadeia leve livre alterada e não alterada  $\geq 100$ ; e presença de mais de uma lesão focal por ressonância magnética nuclear (RNM) (RAJKUMAR et al., 2014).

O MM permanece uma doença incurável e seu tratamento ainda é um desafio devido à heterogeneidade genética da doença (KUMAR et al., 2017a). O tratamento atual do MM baseia-se no transplante autólogo e na terapia farmacológica. Diversos fatores determinam a estratégia que será abordada para o tratamento de cada paciente, inclusive se o mesmo é elegível ou não ao transplante autólogo. Em geral, o mesmo é recomendado somente aos pacientes abaixo de 65 anos de idade, porém cerca de 90% dos diagnósticos ocorrem em pacientes acima de 50 anos, com mediana de 70 anos de idade. Outros fatores a serem considerados são as comorbidades presentes, como problemas cardíacos e renais, devido à alta toxicidade do tratamento (ATTAL; HAROUSSEAU, 1997; CHILD et al., 2003; KUMAR et al., 2017a; SWERDLOW et al., 2017).

Para a terapia farmacológica, no geral utiliza-se a combinação de dois ou mais fármacos de diversas classes (poliquimioterapia) como, por exemplo, inibidores de proteossoma, imunomoduladores, inibidores de histona deacetilase, anticorpos monoclonais, agentes alquilantes e esteroides, os quais são escolhidos de acordo com o quadro clínico e comorbidades de cada paciente (KUMAR et al., 2018). A combinação de diversos medicamentos trouxe um aumento à qualidade de vida dos pacientes pela diminuição dos efeitos colaterais causados, por exemplo, pelas altas doses de corticoesteroides como a dexametasona (RAJKUMAR et al., 2010). O regime mais recomendado em âmbito mundial para o tratamento inicial de pacientes com MM é a combinação de bortezomibe, lenalidomida e dexametasona (combinação conhecida

como VRd) (DURIE et al., 2017). No Brasil, a portaria nº 708/2015 do Ministério da Saúde recomenda como poliquimioterapia de primeira linha os seguintes medicamentos, em diferentes combinações: bortezomibe, ciclofosfamida, cisplatina, dexametasona, doxorubicina, doxorubicina lipossomal, etoposido, melfalano, vincristina e talidomida (BRASIL, 2015).

Apesar do aumento da sobrevida global dos pacientes com MM nos últimos anos, por se tratar de uma doença ainda incurável, a recidiva é inevitável e muitos pacientes ainda sofrem com os efeitos adversos da terapia, como a ocorrência de infecções e neuropatias (ATTAL et al., 2012; MCCARTHY et al., 2012; MCCARTHY et al., 2017). Além disso, cerca de um quarto dos pacientes com MM demonstram curta duração de resposta ao tratamento mesmo diante dos regimes mais efetivos, e possuem uma mediana de sobrevida global de cerca de 3 anos (KUMAR et al., 2012; KUMAR et al., 2017b). Dessa forma, torna-se essencial o estudo de novos compostos para o tratamento do MM que possam vir a se tornar fármacos mais seletivos para as células neoplásicas, o que resultaria em menos efeitos adversos e, também, em uma estratégia para contornar a resistência demonstrada aos medicamentos já existentes. Dentro das diversas estratégias presentes na literatura para tratamentos antineoplásicos estão a capacidade de modulação do ciclo celular e a indução de morte celular programada (OTTO; SICINSKI, 2017; WONG, 2011).

### 3.2 INDUÇÃO DA MORTE CELULAR COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA

A homeostase tecidual é mantida por um balanço delicado entre a proliferação e a morte celular. A morte celular pode ocorrer de forma regulada com a finalidade de eliminar células danificadas e/ou potencialmente perigosas, ou ainda como resultado de perturbações intra ou extracelulares. Esse processo altamente coordenado é denominado de morte celular regulada (RCD, *regulated cell death*). Quando a RCD ocorre de forma fisiológica e sem a presença de estímulos exógenos, por exemplo, devido ao *turnover* tecidual ao eliminar células envelhecidas, o

processo passa a ser denominado morte celular programada (PCD, *programmed cell death*). Alterações dentro desse equilíbrio podem propiciar o desenvolvimento de doenças como o câncer, onde as células malignas se multiplicam de forma mais rápida do que morrem. Do ponto de vista morfológico, o processo de morte celular é classificado historicamente em três tipos principais: apoptose, necrose e autofagia (FUCHS; STELLER, 2011; GALLUZZI et al., 2018).

A apoptose, também conhecida como morte celular tipo I, inicia-se com a diminuição do volume celular, etapa em que o citoplasma se torna mais denso e as organelas mais empacotadas, seguida de condensação da cromatina. Após essa etapa, são observadas a presença de pregas na membrana plasmática (*blebbings*), o que leva à formação de corpos apoptóticos, externalização de resíduos de fosfatidilserina e perda de adesão com as células vizinhas e com a matriz extracelular. Os corpos apoptóticos são, então, reconhecidos por células fagocitárias circulantes que engolfam a célula apoptótica e a degradam em fagolisossomas (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2018a). A fagocitose dos corpos apoptóticos, além de reaproveitar componentes presentes nas células que sofreram morte celular, evita uma intensa reação inflamatória (Figura 3).

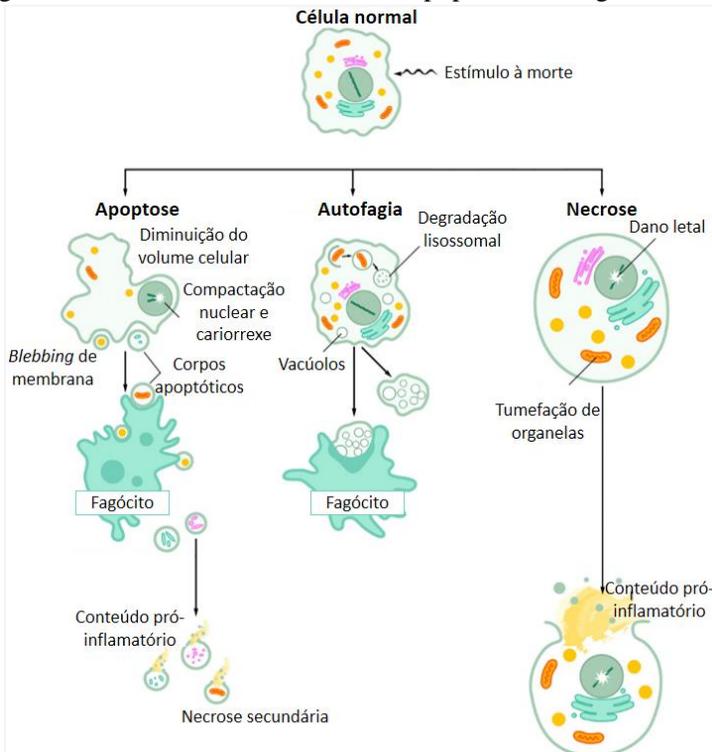
Vale ressaltar que nem sempre a apoptose é um tipo de morte celular ausente de resposta imunológica. Isso ocorre devido à capacidade das células que sofreram morte celular de emitirem “sinais de perigo”, que alertam o organismo diante de uma possível ameaça. Esses sinais de perigo são comumente referidos como padrões moleculares associados a danos (DAMPs - *damage-associated molecular patterns*), os quais podem gerar uma resposta imune que tem como alvo a destruição das células afetadas (GALLUZZI et al., 2018; GREEN et al., 2009; YATIM et al., 2017). Além disso, ao avaliar a morfologia dos processos de morte celular, é importante salientar que as células cultivadas *in vitro*, após finalizarem o processo de apoptose, adquirem a morfologia de células necróticas (necrose secundária) devido à ausência de células fagocitárias (ROGERS et al., 2017).

A autofagia, ou morte celular tipo II, refere-se à digestão lisossômica dos componentes da própria célula. Trata-se de—um mecanismo desencadeado em situações de estresse, mais relatado na literatura como uma resposta citoprotetora do que citotóxica, e que pode levar a uma resposta adaptativa ou culminar em morte celular. A morte

celular autofágica manifesta-se por extensa vacuolização do citoplasma devido à formação de vesículas que sequestram as organelas celulares e fundem-se aos lisossomos. Assim como a apoptose, a morte celular autofágica culmina com a captação fagocitária e consequente degradação dos lisossomos (Figura 3) (GALLUZZI et al., 2015; LEVY et al., 2017).

Por fim, a morte celular tipo III ou necrose, é um processo onde há a ruptura da membrana celular e, como consequência, a evasão do conteúdo intracelular, o que culmina na dissolução das células devido à ação de enzimas degradativas. A necrose se inicia com o aumento do volume celular e de suas organelas, seguido da ruptura da membrana nuclear, plasmática e de organelas, desorganização do citoplasma e extravasamento dos componentes intracelulares. De forma geral, o processo necrótico estimula uma reação local inflamatória, com o intuito de eliminar as células mortas e iniciar o processo de reparo subsequente (Figura 3) (GALLUZZI et al., 2007; GALLUZZI et al., 2018; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2018a).

Figura 3 Mecanismo de morte celular: apoptose, autofagia e necrose.



Fonte: Adaptado de FINK; COOKSON, 2005.

Devido à grande quantidade de informações presentes a respeito de vias de sinalização, aspectos genéticos, bioquímicos, farmacológicos e funcionais das células, o Comitê de Nomenclatura em Morte Celular classificou em âmbito molecular as formas de morte celular como: apoptose intrínseca, apoptose extrínseca, necrose de transição de permeabilidade mitocondrial, necroptose, ferroptose, piroptose, partanatos, morte celular entóxica, morte celular netóxica, morte celular dependente de lisossomos, morte celular dependente de autofagia, morte celular imunogênica e também processos não classificados como RCD como, por exemplo, senescência celular e catástrofe mitótica (GALLUZZI et al., 2018). Tais conhecimentos a respeito de cada

processo, possibilitam a criação de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de neoplasias malignas.

Entre todas as formas de morte celular relatadas na literatura, a apoptose é a mais bem elucidada e investigada até o momento. A indução da apoptose é o foco de diversos tratamentos para as neoplasias malignas em razão da maior sensibilidade das células tumorais a esse tipo de morte celular em relação às células não-neoplásicas, devido ao estresse gerado no microambiente tumoral diante da privação de nutrientes e hipóxia. Além disso, como a apoptose costuma ser não imunogênica, tê-la como alvo pode diminuir a frequência e a intensidade dos efeitos adversos ao tratamento. Finalmente, como a indução da apoptose consiste em uma abordagem não específica ao tipo de neoplasia, ela oferece a possibilidade de aplicar o mesmo tratamento em diversos subtipos de doenças (LOPEZ; TAIT, 2015; PFEFFER; SINGH, 2018).

### **3.2.1 Apoptose intrínseca**

A apoptose intrínseca ou mitocondrial ocorre diante de perturbações no microambiente intra ou extracelular, como danos ao DNA, estresse no retículo endoplasmático (RE), altas concentrações de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou defeitos mitóticos. Ela é regulada por diversas proteínas membros da família Bcl-2, a qual é composta por proteínas pró e antiapoptóticas que possuem de um a quatro domínios de homologia com Bcl-2 (BH). Entre os membros pró-apoptóticos estão as proteínas Bax, Bak e Bok, que possuem quatro domínios BH, e as proteínas Bad, Bid, Puma e Noxa, que possuem apenas um domínio BH3 (BH3-*only*). Os membros antiapoptóticos incluem as proteínas Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w e Mcl-1, todas com quatro domínios BH (MOLDOVEANU et al., 2014; SHAMAS-DIN et al., 2013).

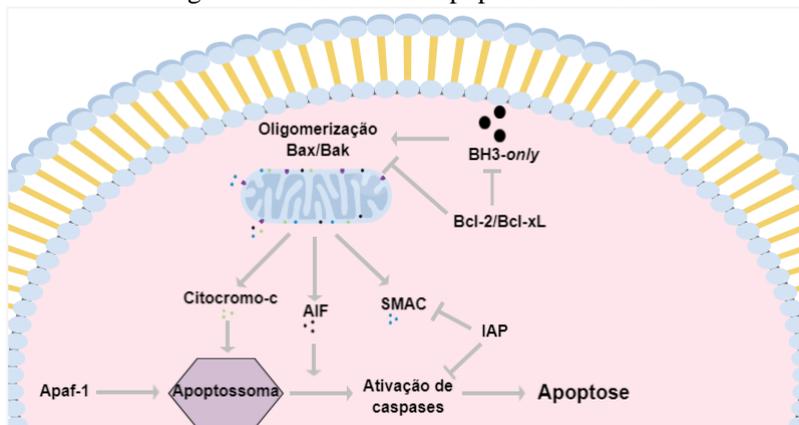
A apoptose intrínseca ocorre quando há um desequilíbrio entre a concentração dessas proteínas a favor dos membros pró-apoptóticos da família Bcl-2. Porém, em diversas neoplasias malignas, as células tumorais desenvolvem mecanismos de sobrevivência como estratégia de evasão da apoptose, como a superexpressão de membros antiapoptóticos da família Bcl-2. Isso ocorre, por exemplo, em pacientes portadores de

MM com a translocação t(11;14), q qual está associada à alta expressão da proteína Bcl-2 (BODET et al., 2011; TOUZEAU et al., 2018). A superexpressão da proteína Mcl-1 também é relatada em pacientes com MM e está relacionada com a alta resistência desses pacientes ao tratamento (GONG et al., 2016).

Em situações em que há um estímulo à morte celular, as proteínas *BH3-only*, conhecidas como ativadoras da apoptose, estimulam a ativação e oligomerização das proteínas pró-apoptóticas multi-domínio Bax e Bak, o que resulta na permeabilização da membrana mitocondrial externa (Figura 4). A mitocôndria é uma organela revestida por duas membranas, uma externa e outra interna, e o espaço intermembrana é controlado pelo potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) (CZABOTAR et al., 2014; SONG et al., 2015). A formação de poros na membrana externa da mitocôndria, além de ocasionar a perda do  $\Delta\Psi_m$ , leva à liberação de componentes que transitam pelo espaço intermembrana, como o citocromo-c, o AIF (fator indutor de apoptose) e a proteína SMAC/Diablo. As proteínas *BH3-only* podem desencadear a apoptose tanto pela ativação direta de proteínas pró-apoptóticas quanto pela inativação de proteínas anti-apoptóticas (GALLUZZI et al., 2018).

O citocromo-c, uma vez liberado pela mitocôndria, se liga ao fator-1 ativador de protease apoptótica (APAF-1) e à pró-caspase-9, o que leva a formação de um complexo denominado apoptossoma. O apoptossoma é responsável pela ativação da caspase-9 e pela consequente clivagem proteolítica das caspases-3 e -7, também conhecidas como caspases efetoras. Após ativadas, as caspases efetoras são responsáveis por diversos eventos que levam à mudança na morfologia das células em apoptose, como o *blebbing* de membrana, a fragmentação do DNA, a exposição dos resíduos de fosfatidilserina e a formação de corpos apoptóticos (JULIEN; WELLS, 2017; LI et al., 1997;). O AIF liberado no citosol atua de forma independente da ativação de caspases, enquanto que a proteína SMAC é responsável por bloquear os membros da família de inibidores da apoptose (IAP), o que evita a inibição das caspases (BANO; PHEHN, 2018; SANTOS et al., 1999; VERHAGEN et al., 2000).

Figura 4 Mecanismo da apoptose intrínseca



A apoptose intrínseca ocorre por um desequilíbrio na concentração de proteínas pró e antiapoptóticas a favor das proteínas pró-apoptóticas, o que leva à formação de poros na membrana mitocondrial externa e culmina na liberação de moléculas capazes de levarem à ativação das caspases efetoras, o que resulta na apoptose. Fonte: A AUTORA

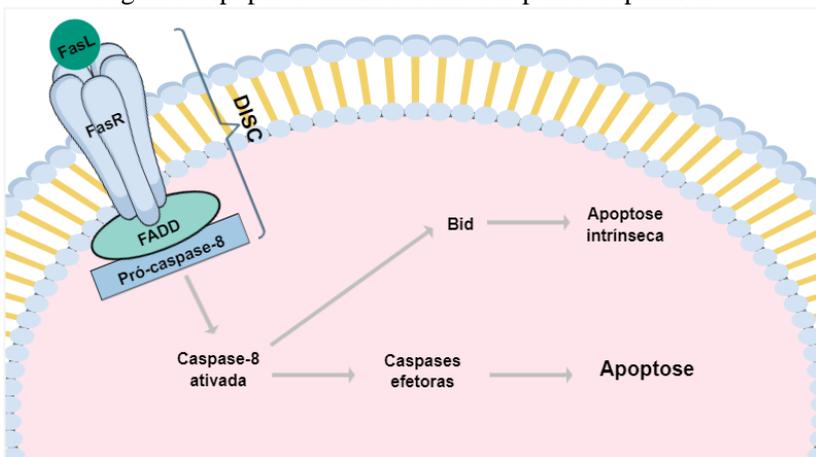
### 3.2.2 Apoptose extrínseca

A apoptose extrínseca é uma forma de RCD que se inicia por perturbações no microambiente extracelular e que é detectada a partir de receptores transmembranares. Nessa via estão envolvidos os receptores de morte, os quais podem ser ativados por seus ligantes específicos; e os receptores de dependência, que são ativados quando as concentrações do seu ligante específico ficam abaixo do valor basal. Os receptores de morte incluem o receptor Fas, denominado Apo-1 ou CD95 e diversos receptores que pertencem à família TNF (fator de necrose tumoral), como TNFR1, TRAILR1, ou DR4 e TRAILR2, ou DR5 (AGGARWAL et al., 2012; GALLUZZI et al., 2018; STRASSER et al., 2009).

Quando o ligante é reconhecido pelos seus receptores, ocorre a formação de um complexo intracelular com uma proteína adaptadora FADD ou TRADD o que, associado à pró-caspase-8 ou -10, forma o

complexo DISC (complexo sinalizador indutor de apoptose) (DICKENS et al., 2016) (Figura 5). Esse complexo gera a ativação autocatalítica das caspases iniciadoras (caspase-8 e -10), as quais ativam as caspases efetoras -3, -6 e -7 e, por fim, levam a célula à apoptose. A caspase-8, ao ser ativada em algumas células, pode levar à ativação da proteína Bid, um membro pró-apoptótico BH3-*only* da família Bcl-2, o que leva também à ativação da apoptose intrínseca (GALLUZZI et al., 2018; LI et al., 1998; OBERST et al., 2010;). A sinalização dos receptores de morte também pode ocasionar a ativação do NF- $\kappa$ B, o que resulta em sobrevivência celular associada a uma resposta inflamatória (MONTINARO; WALCZAK, 2017; VON KARSTEDT;).

Figura 5 Apoptose extrínseca ativada pelo receptor Fas.



O receptor Fas, ao entrar em contato com seu ligante específico, participa da formação do complexo DISC, que ativa a caspase-8 e as caspases efetoras (-3 e -7) e leva à apoptose. A caspase-8, em algumas células, também ativa a proteína Bid, a qual estimula a ativação da apoptose intrínseca. Fonte: A AUTORA

Os receptores de dependência constituem uma família de cerca de 20 membros que incluem os receptores netrina 1 (NTN1), receptor DCC netrina 1 (DCC), receptor 5 netrina unc-5 (UNC5A), entre outros (GILBERT; MEHLEN, 2015). Esses receptores podem desencadear duas

situações opostas: a sobrevivência e proliferação celular, quando os seus ligantes estão em altas quantidades, ou a morte celular, ao emitir sinais apoptóticos quando em baixas concentrações de seus ligantes (GOLDSCHNEIDER; MEHLEN, 2010). Os sinais de morte celular gerados pelos receptores de dependência são silenciados pelas células neoplásicas em algumas formas de câncer, o que previne a morte celular e permite a invasão e as metástases. Existem medicamentos, em fase clínica, para a modulação da via de receptores de dependência e consequente indução da morte celular (GALLUZZI et al., 2018; GILBERT; MEHLEN, 2015).

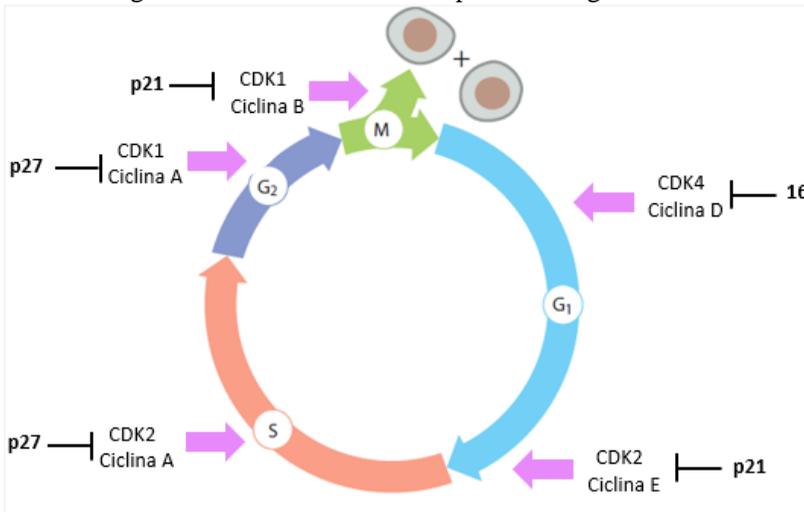
### 3.3 CICLO CELULAR

O ciclo celular é essencial para a replicação e proliferação das células neoplásicas e o estímulo sustentado à replicação e à imortalidade replicativa são duas características importantes para o desenvolvimento das células tumorais (HANAHAN; WEIBERG, 2011). O ciclo de divisão celular, dividido em interfase e mitose (Figura 6), garante que o material genético de uma célula mãe seja duplicado e distribuído igualmente a duas células filhas. A interfase é o período entre duas mitoses e é dividida em três partes: a fase G1 (*gap one*), uma fase preparatória onde ocorre a condensação da cromatina e o início da síntese de proteínas; a fase S (síntese), onde há a replicação do DNA e duplicação dos cromossomos; e a fase G2 (*gap two*), onde são sintetizados os componentes necessários para a realização da mitose como RNA e proteínas. A mitose, ou fase M, é o processo de divisão celular no qual uma célula-mãe se divide em duas células-filhas com o mesmo número de cromossomos, e é dividida em cinco fases: prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase. São denominadas células quiescentes aquelas que não entram no ciclo de divisão celular e se encontram em uma fase denominada G0 (WENZEL; SINGH, 2018; WILLIAMS; STOEBER, 2012).

Ao longo do ciclo celular existem diversos pontos de checagem (*checkpoints*) que tem como finalidades garantir que a divisão celular ocorra de forma adequada e detectar danos e mutações no DNA. Esses *checkpoints* são regulados por ciclinas, as quais são expressas ao longo

das fases do ciclo e regulam de forma alostérica uma família de quinases. As quinases dependentes de ciclinas (CDKs) permitem que a célula progrida ao longo do ciclo de divisão celular. Quando são identificados erros no processo de divisão celular, o mesmo pode ser interrompido pela formação de complexos estáveis entre as CDKs e suas proteínas inibitórias (CKIs), como a p16. Defeitos nesses mecanismos regulatórios podem levar ao acúmulo de anormalidades no DNA e à proliferação celular descontrolada, como em alguns tipos de neoplasias malignas, incluindo o MM (GABRIELLI; BROOKS; PAVEY, 2012; SHERR; BARTEK, 2017; WILLIAMS; STOEBER, 2012).

Figura 6 O ciclo celular e suas proteínas regulatórias.



O ciclo celular é dividido em interfase, formada pelas fases G<sub>1</sub>, S e G<sub>2</sub>, e mitose (fase M). Cada fase do ciclo celular depende de ciclinas e CDKs para sua progressão, as quais podem ser inibidas por diferentes proteínas, como a p16, 21 e 27, em diversos processos regulatórios. Fonte: Adaptado de ALBERTS, 2010.

No MM já foram relatadas diversas alterações genéticas relacionadas ao ciclo de divisão celular, como a desregulação dos genes de ciclina D presente em pacientes com a translocação t(11;14)(q13;q32).

Além da superexpressão desse gene, a translocação t(11;14)(q13;q32) resulta em mutações ou deleções no gene *TP53*, o que diminui a expressão da proteína p53 que desempenha um importante papel na regulação do ciclo celular. Essa translocação também é responsável por aberrações nos genes da p27 e da ciclina E, entre outras proteínas envolvidas no ciclo celular, como a Ki-67 (FURUKAWA; KIKUCHI, 2015; MAES et al., 2017). A Ki-67 é uma proteína nuclear expressa tanto na interfase quanto no momento da mitose, mas que está ausente na fase G0, logo, é encontrada somente em células em estado proliferativo (YANG et al., 2018). Por ser considerada um marcador de proliferação celular, a proteína Ki-67 está presente na avaliação do prognóstico de diversas neoplasias e, apesar de não fazer parte dos exames de rotina para a avaliação de prognóstico do MM, ela está superexpressa em diversos pacientes portadores dessa doença (ALEXANDRAKIS et al., 2004; ELY et al., 2017). Assim, devido ao fato de as células tumorais estarem em constante estado proliferativo, o bloqueio do ciclo celular e suas proteínas relacionadas tornam-se alvos muito pesquisados para a terapia antineoplásica.

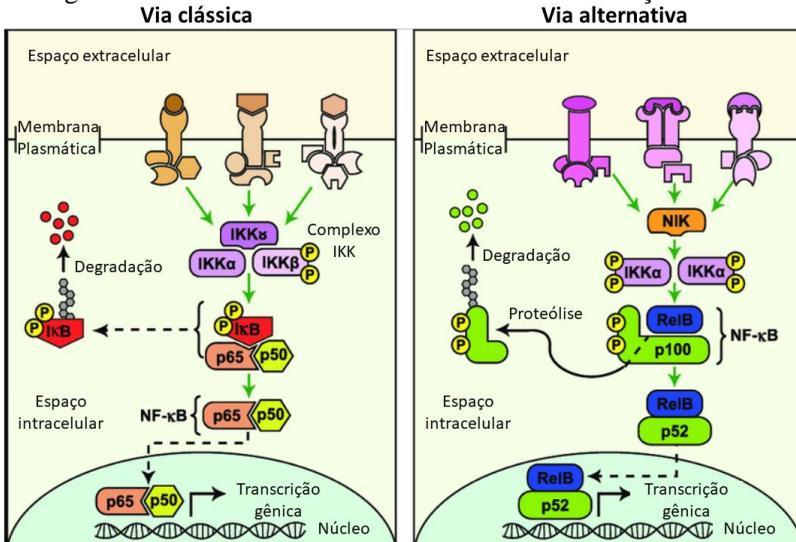
### 3.4 A VIA DE SINALIZAÇÃO PI3K/AKT/mTOR E DO FATOR NF- $\kappa$ B COMO ALVO PARA O TRATAMENTO DO MM

Diversas vias de sinalização estão envolvidas na patogênese do MM e contribuem com a manutenção do microambiente tumoral. Entre essas vias estão a via PI3K/AKT/mTOR e a via do fator de transcrição NF- $\kappa$ B. O NF- $\kappa$ B é um fator de transcrição envolvido na imunidade inata, adaptativa e na linfopoiese, com ação principal na ativação e maturação de células B e também na patogênese de diversas neoplasias hematológicas (XIA; SHEN; VERMA, 2014). De forma geral, o NF- $\kappa$ B, em condições fisiológicas, reside inativo no citoplasma ligado à uma proteína inibitória I $\kappa$ B (inibidor do complexo  $\kappa$ B), e, é formado por homo ou heterodímeros proteicos. Sua forma clássica é o heterodímero RelA (p65) ligado a uma subunidade de RelB. Além dessas, outras subunidades estão descritas na literatura, como a c-Rel e as pró-formas p105 e p100,

as quais necessitam de clivagem proteolítica para tornarem-se ativas (HOESEL; SCHMID, 2013; RAMAKRISHNAN; KUMAR, 2018).

A via clássica do NF- $\kappa$ B é ativada mediante o estímulo de citocinas (ex: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), fatores de crescimento, produtos bacterianos e virais, radiação ultra-violeta (UV) e ionizante, EROs, danos ao DNA, estresse oncogênico, entre outros (Figura 7). O estímulo à via clássica leva à ativação do complexo proteico IKK (I $\kappa$ B quinase), o qual fosforila I $\kappa$ B. A proteína I $\kappa$ B, depois de fosforilada recebe a adição de ubiquitina pela ação da enzima ubiquitina ligase, e é degradada pelo complexo proteossomal 26S. A degradação de I $\kappa$ B resulta na liberação do NF- $\kappa$ B, que se transloca ao núcleo e liga-se à região promotora do DNA (MATSUI, 2016; ZHANG; LENARDO; BALTIMORE, 2017). Como pode ser observado na Figura 7, a via alternativa ocorre, em geral, durante a maturação de órgãos B e T e é ativada, por exemplo, pela linfotoxina B, pelo fator de ativação de células B (BAFF) e por CD40. Nessa via, a ligação dos ligantes específicos aos seus receptores leva à ativação da quinase indutora de NF- $\kappa$ B (NIK). A NIK, por sua vez, fosforila e ativa o complexo IKK, o que leva à proteólise da p100 e à liberação do complexo p52/RelB (TEGOWSKI; BALDWIN, 2018).

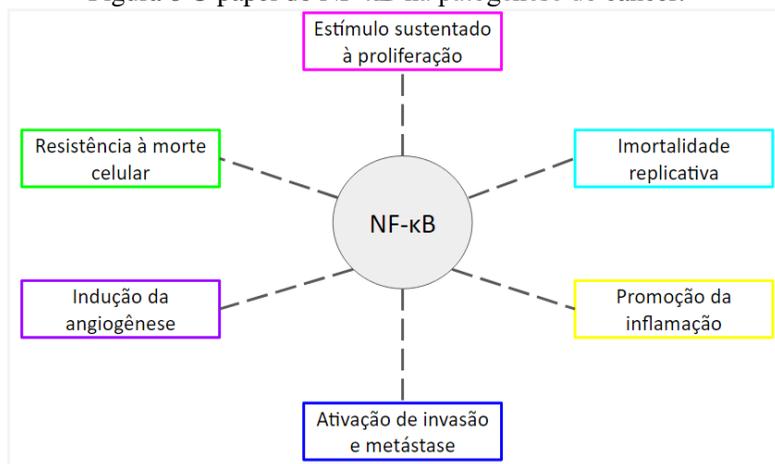
Figura 7 Via clássica e alternativa do fator de transcrição NF- $\kappa$ B.



Via clássica (painel direito) e alternativa (painel esquerdo) do fator de transcrição NF- $\kappa$ B. O NF- $\kappa$ B é um heterodímero que pode ser formado por cinco proteínas diferentes e normalmente encontra-se inativo no citoplasma, ligado a proteínas inibidoras I $\kappa$ B. Quando ativada a via, as proteínas I $\kappa$ B são fosforiladas por proteínas IKK e conduzidas à degradação proteossomal, o que permite a translocação do NF- $\kappa$ B ao núcleo das células, onde ativa a transcrição de genes alvo. Fonte: Adaptado de MATSUI, 2016.

Ao se ligar ao DNA, o NF- $\kappa$ B realiza a transcrição gênica de mediadores inflamatórios, como TNF- $\alpha$  e interleucinas; reguladores anti-apoptóticos, como as proteínas IAP, Bcl-xL e survivina; proteínas de invasão tecidual, como as metaloproteinases; promotores de vascularização e adesão; proteínas de imortalização celular, como a telomerase; e reguladores do ciclo celular, como ciclinas e c-Myc. Assim, o NF- $\kappa$ B contribui com várias das características do câncer (Figura 8) (ZHANG; LENARDO; BALTIMORE, 2017).

Figura 8 O papel do NF- $\kappa$ B na patogênese do câncer.



Fonte: A AUTORA.

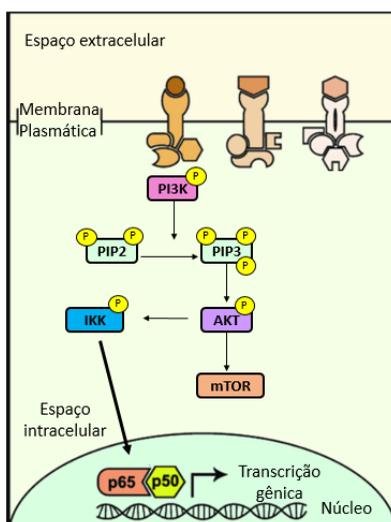
No MM existe a ativação constitutiva desse fator de transcrição, o que contribui para a sua patogênese e também para a resistência ao tratamento (ROY; SARKAR; BASAK, 2018). Vale ressaltar que o NF- $\kappa$ B, no MM, não tem sua ação aumentada somente nas células neoplásicas, mas também em células presentes no estroma da MO. Isso contribui ainda mais com a manutenção do microambiente pró-inflamatório, o que é essencial para o desenvolvimento e resistência das células tumorais (GORGUN et al., 2013; LANDOWSKI et al., 2003; MATTHEWS et al., 2016). Já existem fármacos usados na clínica que tem como alvo a inibição da via do NF- $\kappa$ B como o bortezomibe. Esse fármaco tem como mecanismo de ação a inibição da degradação proteossomal do I $\kappa$ B, o que impede a translocação do NF- $\kappa$ B do citoplasma para o núcleo e, dessa forma, inibe a sua atividade. Porém, já são relatados casos de pacientes que desenvolveram resistência a esse tratamento, o que pode estar relacionado ao fato de o bortezomibe também levar à ativação da via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e a fosforilação de AKT (pAKT) (HIDESHIMA et al., 2004; HIDESHIMA et al., 2006; MIMURA et al., 2014).

A via PI3K/AKT/mTOR também está altamente relacionada com a patogênese das neoplasias hematológicas. Essa via é estimulada mediante a ativação de receptores tirosina quinase e receptores acoplados à proteína G na presença de estresse ou de fatores de crescimento. A ativação desses receptores leva à fosforilação da proteína PI3K que converte a fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) em fosfatidilinositol 1,4,5-trifosfato (PIP3). A PIP3, por sua vez, auxilia na fosforilação de AKT (pAKT) que, uma vez ativada, pode estimular a proliferação celular, a regulação do metabolismo da glicose, a angiogênese e a síntese de proteínas, além de levar à inibição da apoptose (Figura 9) (DURONIO, 2008; MANNING; TOKER, 2017).

O contato das células de MM com as células presentes no estroma da MO contribui com o aumento das concentrações de citocinas e fatores de crescimento no microambiente tumoral, o que também desencadeia a ativação de vias como a PI3K/AKT/mTOR e a do NF- $\kappa$ B (DI MARZO, et al., 2016). A superexpressão de AKT está relacionada com a resistência a agentes quimioterápicos como a cisplatina, o metotrexato e o paclitaxel (ZHENG, 2017). Sua ativação também estimula a fosforilação de IKK, o que leva à degradação proteossomal de

I $\kappa$ B e à translocação de NF- $\kappa$ B para o núcleo (BAI; UENO; VOGT, 2010). Segundo a literatura, o conhecimento aprofundado a respeito das vias PI3K/AKT/mTOR e do NF- $\kappa$ B vem mostrando que essas vias podem ser alvos promissores para a pesquisa de novos compostos para o tratamento do MM.

Figura 9 A via PI3K/AKT/mTOR e sua correlação com a via do fator de transcrição NF- $\kappa$ B



A via PI3K/AKT/mTOR é iniciada pelo estímulo ao receptor via estresse ou fatores de crescimento, o que ativa a proteína PI3K e culmina na fosforilação de AKT (pAKT). A proteína pAKT, além de favorecer a sobrevivência e a proliferação das células tumorais, pode fosforilar IKK, ativando a via do fator de transcrição NF- $\kappa$ B. Fonte: A AUTORA.

### 3.5 O ESTRESSE OXIDATIVO E A TUMORIGÊNESE

As EROs compreendem um grupo heterogêneo de íons e moléculas altamente reativas derivadas do oxigênio molecular ( $O_2$ ) e estão envolvidas na sinalização e na regulação de diversos processos biológicos. Algumas das EROs mais bem conhecidas são o radical

hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ), o ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (GALADARI et al., 2017). Dentro do organismo humano a maior fonte endógena de EROs é a mitocôndria, via cadeia transportadora de elétrons (CTE) (HAN; WILLIAMS; CADENAS, 2001). O balanço entre a produção dessas espécies reativas e sua neutralização por antioxidantes é de extrema importância, pois a concentração elevada de EROs está associada ao desenvolvimento de diversas doenças, como por exemplo o câncer (GALADARI et al., 2017).

Sabe-se que as células neoplásicas se encontram em um estado de disfunção mitocondrial. Tal disfunção ocorre por dois principais fatores, pela resposta celular à hipóxia presente no microambiente tumoral, onde há uma reprogramação metabólica e a produção de energia da célula é desviada para a via anaeróbia (efeito Warburg); e também devido à mutações que alteram o DNA mitocondrial (POTTER; NEWPORT; MORTEN, 2016; SABHARWAL; SCHUMACKER, 2014). Assim, o aumento de EROs, de acordo com a concentração e o período de exposição, pode levar ao estresse oxidativo e, conseqüentemente, a danos nos lipídeos de membrana, proteínas e DNA, o que pode causar instabilidade genômica e a inativação de genes supressores tumorais, como o PTEN (do inglês, *phosphatase and tensin homolog*) e o p53 (GALADARI et al., 2017; RAY; HUANG; TSUJI, 2012). Além disso, o aumento de EROs leva a ativação de diversas vias de sinalização associadas a tumorigênese, como a via PI3K/AKT/mTOR e a via do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (DONKENA; YOUNG; TINDALL, 2010). Assim as altas concentrações de EROs encontrados em neoplasias malignas estão relacionados à promoção e à progressão do tumor, além da resistência à quimioterapia (KUMARI et al., 2018).

Porém, da mesma forma que as EROs contribuem para a progressão do câncer, elas também podem torná-lo vulnerável pois, em altas concentrações, o dano oxidativo pode ser fatal para as células neoplásicas ao encaminhá-las à morte celular (ELING et al., 2015; LIAO et al., 2012; RAHMAN et al., 2016). Com base nesse conhecimento, existem estudos baseados na indução de estresse oxidativo como terapia contra o câncer e a resistência à quimioterapia, inclusive na resistência aos inibidores de proteossoma utilizados no tratamento do MM (DOLLOFF, 2015; LIPCHICK; FINK; NIKIFOROV, 2016). No entanto, apesar da utilidade de agentes quimioterápicos que envolvem dano

oxidativo como terapia anti-neoplásica, as células malignas são altamente adaptáveis e, até o momento, esses fármacos se tornam menos efetivos a medida em que as células tumorais adquirem resistência. (SORIANO et al., 2016).

Pode-se constatar que muitos estudos ainda são necessários a fim de elucidar o papel de vias como a do NF- $\kappa$ B, PI3K/AKT/mTOR e de formação de EROs na morte celular induzida pelos quimioterápicos utilizados na terapia do MM. Além disso, novos compostos são necessários para o tratamento dessa doença e no combate à quimiorresistência gerada pelos fármacos atualmente disponíveis a fim de se promover uma maior expectativa e qualidade de vida aos pacientes. Nesse contexto, destacam-se as pesquisas com produtos naturais como fontes de novos compostos com potencial antineoplásico.

### 3.6 COMPOSTOS NATURAIS PARA O TRATAMENTO DE NEOPLASIAS MALIGNAS

Os produtos naturais são grandes aliados na prevenção e no tratamento de doenças desde a antiguidade e, nos dias atuais, medicamentos provenientes de fontes naturais estão presentes no tratamento de diversas enfermidades, inclusive o câncer. A natureza continua uma fonte abundante de moléculas biologicamente ativas e, além de trazer a possibilidade de novos fármacos, tais moléculas também servem como modelos para a preparação de análogos mais eficazes (CRAGG & PEZZUTO, 2016; NEWMAN & CRAGG, 2016).

Além dos medicamentos extraídos de plantas terrestres, como os alcaloides da vinca e os taxanos, muitas outras fontes naturais podem ser utilizadas para a descoberta de novos fármacos como, por exemplo, os micro-organismos, de onde surgiram a doxorrubicina, bleomicina e estaurosporina, e, também, o ambiente marinho (CRAGG & PEZZUTO, 2016). Apesar de cobrir cerca de 70% do planeta, menos de 5% do fundo do mar foi explorado do ponto de vista farmacológico (RAMIREZ et al., 2010). Existem diversas pesquisas de produtos naturais de origem marinha para o tratamento de neoplasias tanto *in vitro* quanto *in vivo* e, também, em ensaios clínicos, porém poucos fármacos foram aprovados

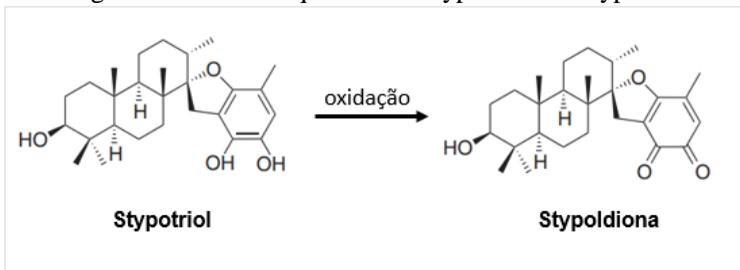
até o momento para uso em seres humanos. Dentre eles, estão a citarabina, a trabectedina (Yondelis®) e a eribulina (Halaven®), um derivado sintético baseado na estrutura da halicondrina B (CRAGG & PEZZUTO, 2016; JIMENEZ et al.; 2018).

Porém, como mencionado anteriormente, a quimioterapia atual tem duas limitações importantes, que são a baixa especificidade dos medicamentos disponíveis, o que resulta em efeitos adversos importantes, e o alto índice de resistência ao tratamento (YUAN et al., 2017). Diante dessa realidade, os produtos naturais são um grande alvo de pesquisas para a busca de novos fármacos tanto para a prevenção quanto para o tratamento de neoplasias malignas devido a sua alta diversidade química, especificidade bioquímica e outras propriedades moleculares, o que os tornam favoráveis como novos fármacos ou como protótipos para o desenvolvimento de novos compostos sintéticos (CLARDY; WALSH, 2004; SANDERS et al., 2016).

### 3.6.1 Stypoldiona

A stypoldiona (Figura 10) é uma *o*-quinona extraída da alga parda *Styopodium zonale*, a qual pertence à classe Phaeophyceae e à família Dictyotaceae (JACOBS et al., 1985). Já existem relatos na literatura que mostram o efeito ictiotóxico (toxicidade em peixes) da stypoldiona e, também, estudos que demonstram o efeito no ciclo celular de embriões de ouriço-do-mar e na inibição *in vitro* de microtúbulos de células de cérebro bovino (O'BRIEN; JACOBS; WILSON, 1983; O'BRIEN et al., 1989; PENICOOKE et al., 2013).

Figura 10 Estrutura química da stypoldiona e stypotriol

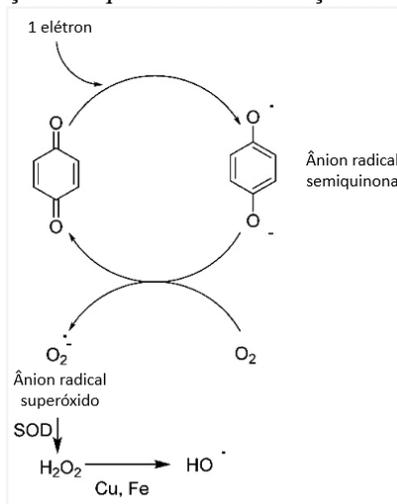


A stypoldiona pode ser formada a partir da oxidação do stypotriol.

Fonte: A AUTORA.

As quinonas compreendem um grupo de substâncias coloridas e semivoláteis distribuídas de forma ampla pela natureza e são encontradas em diversos produtos naturais, medicamentos, metabolismo endógeno e também no metabolismo de compostos aromáticos. São compostas por dois grupamentos carbonila em um anel insaturado de seis átomos de carbono (ciclohexadienodiona) situados nas posições “orto” ou “para”. (BOLTON; DUNLAP, 2017). Além disso, são substâncias neutras que apresentam duas particularidades químicas importantes, são oxidantes e eletrofílicas. Essas características permitem que esses compostos participem de reações do ciclo redox e de reações de Michael (adição nucleofílica) (MONKS et al., 1992). Os produtos de redução de quinonas (semiquinonas e hidroquinonas) (Figura 11) são tóxicos e possuem capacidade de gerar EROs, os quais podem gerar danos aos lipídeos de membrana, proteínas, ao DNA e levar à indução de morte celular (LU et al., 2013; SRINIVAS et al., 2004; VERRAX et al, 2011).

Figura 11 Redução das quinonas e a formação de EROs.



A redução das quinonas pode dar origem à semiquinona ou à hidroquinona que, na presença de oxigênio molecular, participam da formação de EROs. Fonte: Adaptado de BOLTON; DUNLAP, 2017.

Diversas quinonas já são utilizadas na clínica como quimioterápicos, como, por exemplo, a daunorrubicina, doxorrubicina, emodina e mitoxantrona. Além disso, existem na literatura inúmeros estudos que relatam a atividade citotóxica e antitumoral de quinonas, inclusive no MM (BOLTON; DUNLAP, 2017; PARK et al., 2017; SUTO et al., 2017). Diante disso, o presente trabalho tem como finalidade avaliar o efeito citotóxico da *o*-quinona stypoldiona em células de linhagem de MM, bem como avaliar sua atividade em relação as vias de sinalização fosfoinositol-3-quinase (PI3K) /AKT/mTOR e do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), que se encontram ativadas de forma constitutiva em células plasmocitárias de pacientes com MM e auxiliam na sobrevivência e proliferação dessas células (DI MARZO, et al., 2016; ROY; SARKAR; BASAK, 2018).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DO COMPOSTO

A stypoldiona foi extraído pelo aluno de doutorado Sanjay Cleveland Campbell, da Universidade das Índias Ocidentais, Jamaica, sob orientação da professora Dr<sup>a</sup>. Winklet Gallimore e cedido pela professora Dr<sup>a</sup>. Miriam de Barcellos Falkenberg. A alga *Stypopodium zonale*, seca ao ar (220 g), foi extraída durante três dias com MeOH/DCM 1:1 (2000 mL) e concentrada sob pressão reduzida com o auxílio de um evaporador rotativo. O extrato MeOH/DCM originou uma goma verde escura (8,4 g). O extrato obtido foi então submetido a cromatografia rápida em gel de sílica (450 g, dimensões da coluna: 35 x 6 cm), eluído em 100% de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (frações 1-18, 200 mL) com aumento das proporções de acetona em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (frações 19-40, 250 mL) seguido por 100% de metanol (frações 41-45, 500 mL).

As frações obtidas foram combinadas em dezesseis frações principais (Sz1-Sz16) com base nos perfis obtidos por cromatografia em camada fina. Para a purificação do composto, o resíduo obtido da fração Sz10 (3,3 g) foi submetido à cromatografia em gel de sílica (200 g, dimensões da coluna: 35 x 3,5 cm) e um sistema solvente de 10% de EtOAc-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Assim, foi obtida a stypoldiona, uma *o*-quinona de coloração avermelhada.

### 4.2 PREDIÇÃO *IN SILICO* DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS

Para a predição *in silico* das principais características físico-químicas e biológicas da stypoldiona, utilizou-se o *SwissADME* e *SwissTargetPrediction*, ferramentas *online* gratuitas desenvolvidas pelo Grupo de Modelagem Molecular do SIB (Instituto Suíço de Bioinformática). A plataforma *SwissADME* fornece, além das características físico-químicas do composto, a predição de parâmetros ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) e de propriedades farmacológicas e farmacocinéticas (DAINA; MICHIELIN;

ZOETE, 2017). Para as propriedades farmacológicas foram avaliadas as regras de Lipinski, Ghose, Veber, Egan e Muegge (EGAN; MERZ; BALDWIN, 2002; GHOSE et al., 1998; LIPINSKI et al., 2001; MUEGGE; HEALD; BRITTELLI, 2001). Além disso, a stypoldiona foi avaliado quanto às suas características relacionadas à química medicinal e ao possível desenvolvimento de um novo fármaco, onde foram analisadas a presença de subestruturas que podem sugerir uma reatividade aumentada do composto (ensaio PAINS, do inglês *Pan Assay Interference Compounds*) (BAELL, 2010; BRENK et al., 2018). Nesse mesmo aspecto, foi analisada a presença de alertas estruturais, como a presença de grupamentos supostamente tóxicos, quimicamente reativos, metabolicamente instáveis ou que apresentem propriedades responsáveis por uma farmacocinética deficiente. Por fim, a ferramenta também atribui ao composto um escore de acessibilidade sintética, de 0 a 10, onde a nota 10 representa um composto que gera dificuldade no processo de síntese. Já a ferramenta *SwissTargetPrediction* auxilia na predição de possíveis alvos farmacológicos do composto em estudo, pelas medidas de similaridade 2D e 3D com compostos já descritos na literatura (GFELLER et al., 2014).

### 4.3 CULTIVO CELULAR

Neste trabalho foram utilizadas células de linhagem de MM (MM1.S) cedidas pela Dr<sup>a</sup>. Adriana da Silva Santos Duarte, orientada pela Prof. Dr<sup>a</sup>. Sara Saad (UNICAMP). As células foram cultivadas em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*, GIBCO®), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF, Gibco®), 10.000 U/mL de penicilina (Gibco®), 10.000 µg/mL de estreptomicina (Gibco®) e 10 mM de tampão HEPES (N-[2-hidroxietil]piperazina-N'[2-etanosulfônico], Gibco®), em pH 7,4. As células foram mantidas em frascos estéreis próprios para cultivo celular em estufa úmida, numa temperatura de 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>.

Inicialmente, as células foram semeadas na densidade de 2,0 x 10<sup>6</sup> células por frasco, onde o meio foi substituído a cada 48 h. Para a realização dos experimentos, o meio contendo a suspensão celular foi retirado dos frascos de cultura e centrifugado à 264 x g por 10 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi

ressuspendido em 2 mL de meio de cultura. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão do corante Azul de Trypan 0,4% (Sigma-Aldrich®) (TENNANT, 1964) e foram utilizadas para os experimentos apenas as suspensões celulares que continham viabilidade celular superior a 95%. O período de incubação com o composto (stypoldiona) e a densidade celular utilizada foram definidos de acordo com o protocolo experimental de cada procedimento.

#### 4.4 DETERMINAÇÃO DAS CURVAS DE CONCENTRAÇÃO E TEMPO RESPOSTA (MÉTODO DO MTT)

A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio). O método baseia-se na redução do MTT, o qual, pela ação das desidrogenases mitocondriais, passa da coloração amarela para roxa (formazan). Assim, a redução do MTT à formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e, conseqüentemente, à viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

Para a determinação das curvas de concentração e tempo resposta, as células MM1.S foram incubadas com a stypoldiona em diferentes concentrações e períodos. Utilizou-se  $1 \times 10^5$  células/poço para 24 h de incubação,  $5 \times 10^4$  células/poço para 48 h e  $2,5 \times 10^4$  células/poço para o período de 72 h, em 200  $\mu$ L de meio de cultura. As células foram depositadas em placas de cultura de 96 poços e incubadas com a stypoldiona em concentrações crescentes (0,5 - 20  $\mu$ M) a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 24, 48 ou 72 h. Após o período de incubação, o meio de cultura foi parcialmente removido e adicionou-se uma solução contendo MTT (5 mg/mL em PBS, Sigma-Aldrich®) diluído em meio de cultura celular em uma proporção de 1:5. A suspensão celular foi incubada com a solução de MTT por 3 horas e, após esse período, o sobrenadante foi removido. Os precipitados de formazan formados em cada poço foram dissolvidos com 100  $\mu$ L de solução de álcool isopropílico/HCL 0,04 N e as placas foram centrifugadas a 264 x g por 10 min. O sobrenadante foi transferido para uma nova placa, onde foi realizada a leitura das absorvâncias em

espectrofotômetro (Microwell Systems, Organon Teknika®) no comprimento de onda de 540 nm.

A absorbância do grupo controle (células sem tratamento) foi considerada como 100% de viabilidade. Foi realizada também uma curva com o veículo (DMSO) nas mesmas concentrações do composto (0,5 - 20  $\mu\text{M}$ ), para descartar a interferência do veículo. Todos os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes de forma independente e a concentração inibitória de 50 % ( $\text{CI}_{50}$ ) foi obtida por regressão linear a partir das curvas de concentração e tempo-resposta, utilizando-se o software GraphPad Prism 5.0®.

#### 4.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA STYPOLDIONA SOBRE CÉLULAS DE SP

Para a avaliação do efeito citotóxico da stypoldiona sobre células mononucleadas e o seu potencial hemolítico, foram coletadas amostras de SP de indivíduos não fumantes e considerados saudáveis, os quais assinaram de forma prévia um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme o Comitê de Ética de Pesquisa em Seres humanos da UFSC (CEPSH nº2.838.107/2018) (Anexo 1). Foram considerados saudáveis os indivíduos que não se encontravam em processo infeccioso, alérgico ou inflamatório e com ausência de doenças crônicas. As amostras foram obtidas por punção venosa e processadas imediatamente após a coleta.

##### 4.5.1 Efeito citotóxico em células mononucleadas de SP

As amostras de SP de foram coletadas a vácuo em um tubo com anticoagulante EDTA. Após a coleta, as amostras foram diluídas em PBS na proporção 1:1 e gentilmente colocadas em um tubo com Ficoll-Hypaque (densidade  $1.077 \text{ g/m}^3$ ), também na proporção 1:1, e centrifugadas a  $300 \times g$  por 30 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado com uma pipeta *pasteur* e a interfase com as células mononucleadas foi transferida para um outro tubo, onde foram ressuspendidas em 10 mL de PBS e novamente centrifugadas a  $200 \times g$  por 10 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 2 mL de meio RPMI, a partir do qual foi

realizada a contagem. Foram utilizadas somente as amostras que apresentaram mais de 95% de viabilidade. As células foram plaqueadas numa densidade de  $7,5 \times 10^5$  células/poço em uma placa de 96 poços com 200  $\mu\text{L}$  de meio RPMI e incubadas com a stypoldiona em concentrações crescentes (1 - 50  $\mu\text{M}$ ) e com o solvente DMSO na maior concentração utilizada nos experimentos (20  $\mu\text{M}$ ) a 37°C com 5% de  $\text{CO}_2$  por 24 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT.

#### 4.5.2 Teste de hemólise

O teste de hemólise avalia o potencial de um composto em causar lesões nas membranas de eritrócitos, o que leva ao extravasamento do seu conteúdo intracelular. As amostras de SP foram coletadas em tubos contendo citrato de sódio e processadas imediatamente após a coleta. Inicialmente, os tubos foram centrifugados a 264 x g por 10 min e o sobrenadante (plasma) foi descartado. O sedimento que continha as hemácias foi lavado por três vezes com salina (NaCl 0,9%) e diluído, também, em NaCl 0,9%, obtendo-se assim a dispersão estoque de eritrócitos. A partir da dispersão estoque de eritrócitos, foram realizados os controles positivo (50  $\mu\text{l}$  de dispersão de eritrócitos com adição de 950  $\mu\text{l}$  de água destilada) e negativo (50  $\mu\text{l}$  de dispersão de eritrócitos com adição de 950  $\mu\text{l}$  de salina). As amostras incubadas com a stypoldiona foram diluídas com salina (50  $\mu\text{l}$  de dispersão de eritrócitos com adição de 950  $\mu\text{l}$  de salina), contendo diferentes concentrações do composto (múltiplos da  $\text{CI}_{50}$ ). A seguir, as amostras foram incubadas sob agitação leve (100 x g) em um termobloco, por 1 h a 37° C. Após incubação, as células foram centrifugadas a 500 x g por 5 min. Ao fim da centrifugação, 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante de cada tubo foi transferido, em triplicata, para uma placa de 96 poços e a absorbância foi lida em espectrofotômetro (Microwell Systems, Organon Teknika®). A taxa de hemólise foi calculada de acordo com a quantidade de hemoglobina liberada devido a lise dos eritrócitos a partir da seguinte equação:

$$\text{Taxa de hemólise (\%)} = \frac{DO_t - DO_{cn}}{DO_{cp} - DO_{cn}} \times 100$$

Onde:  $DO_t$ , densidade óptica da amostra teste;  $DO_{cn}$ , densidade óptica do controle negativo;  $DO_{cp}$ , densidade óptica do controle positivo.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA STYPOLDIONA NO CICLO CELULAR DAS CÉLULAS MM1.S

Para a avaliação o efeito da stypoldiona nas diferentes fases do ciclo celular, utilizou-se o kit comercial *PI/RNase Solution* (Immunostep®). O método consiste na coloração dos ácidos nucleicos pelo corante iodeto de propídio (PI) após a digestão do RNA pela enzima ribonuclease (RNase). O PI emite diferentes intensidades de fluorescência de acordo com a quantidade de DNA presente nas células, o que varia ao longo das fases do ciclo celular (GONG et al., 1994; POZAROWSKI; DARZYNKIEWICZ, 2004).

As células MM1.S ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com a stypoldiona na sua  $CI_{50}$  de 24 h pelo período de 24 h em estufa úmida a 37°C com 5% de  $CO_2$ . O controle negativo foi preparado com células sem tratamento para a caracterização dos parâmetros a serem analisados no citômetro de fluxo. Após o período de incubação, as células foram lavadas com PBS e fixadas com 200  $\mu$ L de etanol 70% durante 30 min a 4°C. Ao fim desse período, as células foram lavadas com PBS acrescido de 2% de BSA (albumina do soro bovino), a fim de evitar ligações inespecíficas. Por fim, o sobrenadante foi descartado, o sedimento foi ressuspenso com 300  $\mu$ L de PI com RNase e incubou-se a suspensão por 15 min à temperatura ambiente, na ausência de luz. Os *doublets* foram excluídos após a realização de *gates* no canal PE (área x largura) e foram adquiridos 10.000 eventos em ciclo celular (*storage gate*) no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) com o *software* BD FACSDiva versão 6.1.2. Os resultados foram analisados no *software* Infinicyt versão 1.7 (Cytognos®).

#### 4.7 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DA APOPTOSE

A fim de avaliar se a stypoldiona induz as células à morte celular por apoptose foram utilizadas duas metodologias: avaliação da morfologia das células por microscopia de fluorescência com brometo de etídio (BE) e laranja de acridina (LA) (Sigma-Aldrich®) e avaliação da

exposição dos resíduos de fosfatidilserina na membrana celular por citometria de fluxo (CF) pelo método da anexina-V-FITC. Em todos os ensaios, o controle negativo foi preparado com células sem tratamento e os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes de forma independente.

#### **4.7.1 Microscopia de fluorescência com BE/LA**

A avaliação morfológica pelo método de microscopia de fluorescência com BE/LA permite a distinção das células viáveis e em processo de morte celular pela mudança na sua permeabilidade de membrana, o que permite a distinção da morte celular com morfologia de necrose ou apoptose. O LA é um corante permeável à membrana citoplasmática e, ao interagir com o DNA, emite coloração verde quando observado ao microscópio de fluorescência, o que permite a identificação das células viáveis e com membrana íntegra. O BE, por sua vez, não possui a capacidade de atravessar a membrana íntegra e permeia a célula somente quando há alguma perda na integridade da membrana celular. Isso permite, então, a sua passagem e interação com o DNA, o que confere coloração vermelha às células mortas ou em processo de morte celular. Assim, pela observação da morfologia celular, esse método permite a diferenciação das células em fase inicial de apoptose daquelas que se encontram em processo de apoptose tardia ou necrose (RENVOIZÉ et al., 1998).

Para a realização do método, as células MM1.S ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com a stypoldiona na sua  $CI_{50}$  de 24h pelo período de 24 h, em estufa úmida a 37°C com 5% de  $CO_2$ . Após o período de incubação, as células foram lavadas com PBS, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado com 40  $\mu$ L de uma solução contendo BE (5  $\mu$ g/mL) e LA (10  $\mu$ g/mL) na proporção 1:1. Para a leitura em microscópio de fluorescência, 25  $\mu$ L da solução foram transferidos para uma lâmina de vidro, a qual foi recoberta por uma lamínula e posteriormente observada em microscópio de fluorescência (Olympus BX-FLA®), na objetiva de 40 x. Foram observados e fotografados, pelo menos, dez campos diferentes.

#### 4.7.2 Avaliação da exposição dos resíduos de fosfatidilserina pelo método da Anexina V-FITC

A anexina-V-FITC é um composto capaz de se ligar aos resíduos de fosfatidilserina, que são externalizados no processo de apoptose e possuem extrema importância para o reconhecimento e remoção das células apoptóticas pelas células fagocitárias (KOOPMAN et al., 1994). As células MM1.S ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com a stypoldiona na sua  $CI_{50}$  de 24h pelo período de 24 h, em estufa úmida a 37°C com 5% de  $CO_2$ . Após o período de incubação, as células foram lavadas com PBS, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 1 mL de *buffer* (10 mM Hepes, 140 mM NaCl, 2,5 mM  $CaCl_2$ ). Dessa suspensão, foi retirada uma alíquota de 100  $\mu$ L, na qual foram adicionados 5  $\mu$ L de anexina V conjugada a FITC (BD Pharmingen™ - Catálogo: 556419). As amostras foram incubadas com a anexina-V-FITC por 30 min na ausência da luz, em temperatura ambiente. Foram adquiridos um total de 20.000 eventos para cada amostra no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) com o *software* BD FACSDiva versão 6.1.2. Os resultados foram analisados no *software* Infinicyt versão 1.7 (Cytognos®).

#### 4.8 AVALIAÇÃO DO COMPROMETIMENTO DO POTENCIAL MITOCONDRIAL ( $\Delta\Psi_m$ )

A fim de avaliar os efeitos da stypoldiona no  $\Delta\Psi_m$  das células MM1.S, foi utilizado o kit MitoView 633 (Biotium®). O kit é composto por um corante fluorescente que possui capacidade de corar as mitocôndrias de células viáveis, pois permeia as membranas das células e se acumula na membrana mitocondrial. Sua fluorescência é proporcional a integridade de membrana mitocondrial, já que o corante não consegue se acumular em membranas com potencial comprometido.

As células MM1.S ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com a stypoldiona na sua  $CI_{50}$  de 24 h pelo período de 24 h, em estufa úmida a 37°C com 5 % de  $CO_2$ . O controle negativo foi preparado com células sem tratamento para caracterização dos parâmetros a serem analisados no

citômetro de fluxo. Após esse período, as células foram lavadas com PBS, submetidas à centrifugação a 264 x g por 5 min e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram adicionados sobre o sedimento celular 200 µL da solução de Mito View 633 diluído 1:10.000, de acordo com as instruções do fabricante. As células foram incubadas por 30 min à temperatura ambiente na ausência da luz. Ao fim do período de incubação, as células foram novamente centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em 400 µL de PBS. Foram adquiridos 20.000 eventos no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) com o *software* BD FACSDiva versão 6.1.2. Os resultados foram analisados no *software* Infinicyt versão 1.7 (Cytognos®) e os *doublets* foram retirados utilizando-se as características de *forward scatter* (FSC) (altura x área).

#### 4.9 AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NOS MECANISMOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE (KI-67, BCL-2, BAX, AIF, FASR, CASPASE-3 ATIVADA E SURVIVINA)

A avaliação do efeito do composto em diversas proteínas envolvidas na apoptose e na proliferação celular foi realizada por citometria de fluxo. Para todos os experimentos, as células MM1.S (1 x 10<sup>6</sup> células/poço) foram incubadas com a stypoldiona na sua CI<sub>50</sub> de 24 h, em estufa úmida a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. O controle negativo foi preparado com células sem tratamento para caracterização dos parâmetros a serem analisados no citômetro de fluxo. Para as proteínas intracelulares (Ki-67, Bcl-2, Bax, AIF, caspase-3 ativada, survivina) utilizou-se um kit de permeabilização celular *FIX&PERM*® (Nordic-MUBio®) e para o FasR, uma proteína de membrana, utilizou-se a técnica de marcação direta.

Assim, para a marcação das proteínas intracelulares, após o período de incubação, as células foram lavadas uma vez com PBS e ressuspensionadas em 100 µL do reagente A (reagente de fixação). Após a incubação por 15 min na ausência da luz e em temperatura ambiente, as células foram centrifugadas com 4 mL de PBS a 264 x g por 5 min. Ao fim da centrifugação, o sobrenadante foi descartado, foram adicionados

100 µL do reagente B (reagente de permeabilização celular) e o volume adequado do anticorpo específico para a proteína de interesse. As células foram novamente incubadas por 15 min, nas mesmas condições, e centrifugadas com 4 mL de PBS a 264 x g por 5 min. Ao sedimento celular foram acrescentados 300 µL de PBS para a aquisição no citômetro de fluxo.

Para a marcação direta da proteína FasR, após o período de incubação das células com o composto, as células foram lavadas uma vez com PBS e ressuspensas em 100 µL de PBS. Ao sedimento celular foi acrescentado o volume adequado do anticorpo específico para a proteína. As células foram incubadas por 15 min em temperatura ambiente e na ausência da luz. Após o período de incubação, as células foram centrifugadas a 264 x g por 5 min com 2 mL de PBS, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido com 300 µL de PBS para a análise no citômetro de fluxo. Para todas as proteínas, foram adquiridos 20.000 eventos no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) com o *software* BD FACSDiva versão 6.1.2. Os resultados foram analisados no *software* Infinicyt versão 1.7 (Cytognos®) e os *doublets* foram retirados utilizando-se as características de *forward scatter* (FSC) (altura x área).

#### 4.10 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE NF-KB, AKT E pAKT POR WESTERN BLOTTING (WB)

As células MM1.S (4 x 10<sup>6</sup> células/poço) foram incubadas com a stypoldiona na sua CI<sub>50</sub> de 24 h, em estufa úmida a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, preparou-se os lisados celulares totais. Para isso, as células incubadas com o composto foram lavadas uma vez com PBS (300 x g por 5 min) e ressuspensas em 1 mL de PBS, depois foram transferidas para um tubo cônico de 1,5 mL. No tubo cônico, as células foram novamente centrifugadas, por 300 x g por 5 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 100 µL de tampão RIPA contendo inibidor de proteases (Sigma-Aldrich®). As amostras foram mantidas em banho de gelo por 15 min e depois centrifugadas a 500 x g por 10 min. Por fim, transferiu-se o sobrenadante a um novo tubo para a quantificação das proteínas pelo método do ácido bicinonínico (BCA) (WALKER, 1994) com o *kit Micro BCA Protein*

*Assay* (Pierce®). Para isso, 10 µL de cada amostra foram adicionados em placas de 96 poços, em triplicata, onde foram acrescidos 200 µL do agente colorimétrico. As amostras foram incubadas com o agente colorimétrico por 30 min a 37°C na ausência de luz e a leitura das absorvâncias foi realizada no espectrofotômetro *Microwell Systems* (OrganonTeknika®) no comprimento de onda 540 nm. Uma curva-padrão com concentrações conhecidas de albumina bovina sérica foi realizada paralelamente aos experimentos.

Para a realização do WB, foram utilizadas 50 µg de proteína proveniente dos lisados proteicos, as quais foram submetidas à separação eletroforética em gel SDS-PAGE (12 %). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (HybondTM-C Extra – Amersham Biosciences®) utilizando-se tampão de transferência (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0,1 % e metanol 20 %), a uma voltagem crescente que se inicia a 10 V por 45min, no aparelho *semi-dry* mini (GE Healthcare Life Sciences®). A eficácia do processo de transferência foi avaliada pela coloração da membrana com solução de *Ponceau S* 0,1% em ácido acético 3% e o gel foi submetido à coloração com *Comassie Blue* a fim de verificar se houve algum resquício de proteína no gel.

Após a comprovação da eficácia do processo de transferência, realizou-se o bloqueio da membrana, a qual foi incubada com uma solução de bloqueio (TBS-T [Tris 25 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,1% com pH 7,4]) e leite desnatado a 5 % durante 1 h sob agitação constante. Após o período de incubação com a solução de bloqueio, a membrana de nitrocelulose foi incubada *overnight* a 8°C sob agitação com os anticorpos primários para as proteínas de interesse, diluídos na solução de bloqueio. A expressão de NF-κB, Akt 1/2/3, p-Akt 1/2/3 e β-tubulina (utilizada como controle) nas linhagens celulares purificadas foi avaliada com anticorpos primários e secundários específicos (Quadro 1).

Quadro 1 Anticorpos utilizados na avaliação por WB.

<b>Molécula alvo</b>	<b>Diluição</b>	<b>Origem</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Nº catálogo</b>
NF- $\kappa$ B p65 (C-20)	1:250	Coelho	Santa Cruz Biotechnology	sc-372
Akt 1/2/3	1:1000	Coelho	Cell Signaling Technologies	9272S
pAkt 1/2/3	1:500	Camundongo	Santa Cruz Biotechnology	sc-514032
$\beta$ -tubulina	1:250	Coelho	Santa Cruz Biotechnology	sc-9104

Após a incubação da membrana com os anticorpos primários para as proteínas de interesse, foram realizadas três lavagens de 10min com TBS-T sob agitação constante. Ao fim da lavagem, a membrana foi incubada com os respectivos anticorpos secundários conjugados a HRP diluídos em solução de bloqueio por 1 h. Lavou-se novamente a membrana, com TBS-T por três vezes de 10 min, sob agitação constante. Concluídas as lavagens, adicionou-se à membrana 1 mL de reagente ECL (GE Healthcare®) para a revelação. Para isso, a membrana foi lida por quimioluminescência e fotografada pelo transiluminador ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare®). Os resultados obtidos foram normalizados com a utilização da proteína constitutiva  $\beta$ -tubulina e a avaliação da expressão das proteínas de interesse foi realizada de forma quantitativa pela avaliação densitométrica das bandas geradas com o software ImageJ (disponível em <http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

#### 4.11 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EROS

A avaliação da produção de EROs foi realizada pelo kit *MitoSOX Red Molecular Probes* (ThermoFischer®). O *MitoSOX red* é um corante fluorogênico que permeia a membrana de células viáveis e é direcionado de forma seletiva para as mitocôndrias. Uma vez na mitocôndria, o reagente é oxidado pelo ânion superóxido e emite

fluorescência vermelha. As células MM1.S ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com a stypoldiona na sua  $CI_{50}$  de 24 h, em estufa úmida a  $37^\circ\text{C}$  com 5 % de  $\text{CO}_2$ . O controle negativo foi preparado com células sem tratamento para caracterização dos parâmetros a serem analisados no citômetro de fluxo.

Após o período de incubação, as células foram lavadas com PBS, submetidas à centrifugação a  $264 \times g$  por 5 min e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram adicionados sobre o sedimento celular 300  $\mu\text{L}$  da solução de MitoSOX diluído 1:10.000, de acordo com as instruções do fabricante. As células foram incubadas por 30 min à temperatura ambiente na ausência da luz. Ao fim do período de incubação, as células foram novamente centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 400  $\mu\text{L}$  de PBS. Foram adquiridos 20.000 eventos no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) com o *software* BD FACSDiva versão 6.1.2. Os resultados foram analisados no *software* Infinicyt versão 1.7 (Cytognos®) e os *doublets* foram retirados utilizando-se as características de *forward scatter* (FSC) (altura x área).

#### 4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

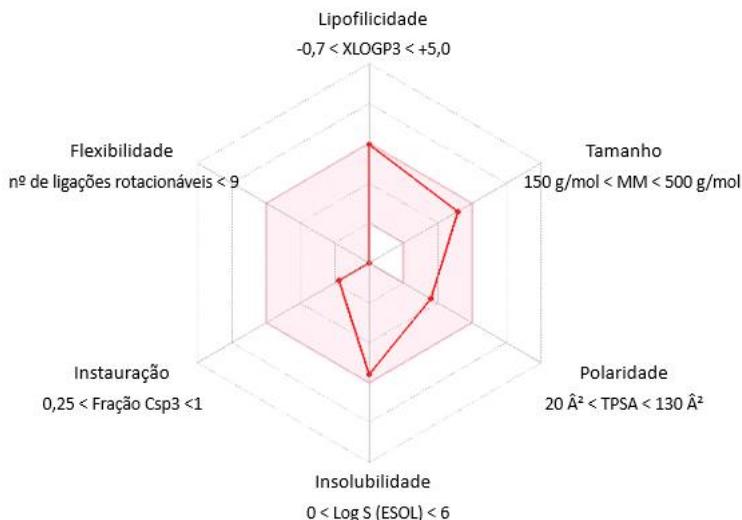
Os resultados obtidos foram expressos pela média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e cada experimento foi realizado, no mínimo, duas vezes de maneira independente. Os testes de citotoxicidade foram avaliados utilizando-se a análise de variância (ANOVA) *two way*, complementada pelo teste *post-hoc* de Tukey. Para a avaliação do efeito da stypoldiona nas diferentes fases do ciclo celular utilizou-se ANOVA *one way* seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni. Para a avaliação da expressão de resíduos de fosfatidilserina, da alteração do  $\Delta\Psi_m$  e da avaliação da expressão das proteínas pró e antiapoptóticas foi utilizado o teste *t* não pareado, com cada ponto comparado ao seu respectivo grupo controle. Em todas as análises, foi adotado um nível de significância mínimo de 5 %. As análises estatísticas foram realizadas pelo do *software* GraphPad Prism 5.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 PREDIÇÃO *IN SILICO* DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS

Os dados obtidos pela ferramenta de predição *in silico* SWISSADME estão apresentados no Quadro 2 e as características quanto a biodisponibilidade oral da stypoldiona estão representadas na Figura 12. Além disso, quando foi avaliado as suas propriedades para o desenvolvimento de um novo fármaco, foram gerados dois alertas devido a presença do grupamento *o*-quinona (1,2-benzoquinona), o que confere uma possível toxicidade ao composto. A acessibilidade sintética atribuída ao composto foi de 6,93.

Figura 12 Predição *in silico* da biodisponibilidade oral da stypoldiona.



A zona colorida é o espaço físico-químico adequado para uma boa biodisponibilidade oral. Fonte: Adaptado de: SWISSADME, 2019.

Quadro 2 Predição *in silico* das características físico-químicas, farmacocinéticas e farmacológicas da stypoldiona.

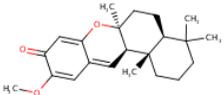
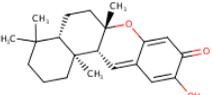
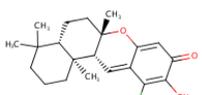
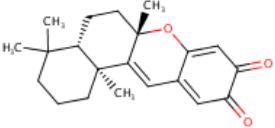
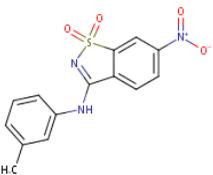
<b>Propriedades físico-químicas</b>	
Fórmula	C27H38O4
Peso Molecular	426,59 g/mol
Número de Átomos Pesados	31
Fração Csp <sup>3</sup>	0,78
Número de ligações rotacionáveis	0
Aceptores de ligações de hidrogênio	4
Doadores de ligações de hidrogênio	1
Refratividade Molar	122,29
Área de superfície polar topológica (TPSA)	63,60 Å <sup>2</sup>
Log P o/w	4,39
Solubilidade em água	Moderadamente solúvel
<b>Características farmacocinéticas</b>	
Absorção gastrointestinal	Alta
Permeação da barreira hematoencefálica	Sim
Substrato da glicoproteína-P (P-gp)	Sim
Inibidor da CYP1A2	Não
Inibidor da CYP2C19	Não
Inibidor da CYP2C9	Sim
Inibidor da CYP2D6	Não
Inibidor da CYP3A4	Não
<b>Características farmacológicas</b>	
Lipinski	Sim (nenhuma violação)
Ghose	Sim
Veber	Sim
Egan	Sim
Muegge	Sim
Escore de biodisponibilidade	0,56

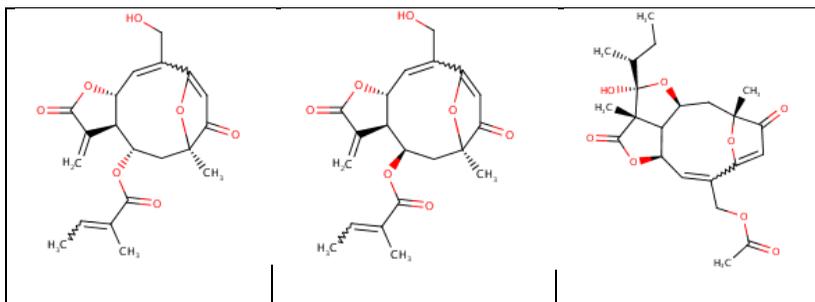
Fonte: A AUTORA.

Outra ferramenta utilizada para a predição da atividade farmacológica da stypoldiona foi o *SWISSTargetprediction*. Pela

comparação da estrutura 2D/3D do composto, alguns dos possíveis alvos farmacológicos apresentados para a stypoldiona, com maior probabilidade, foram a araquidonato 5-lipoxigenase (ALOX5), araquidonato 15-lipoxigenase (ALOX15), araquidonato 12-lipoxigenase (ALOX12) e o fator de transcrição RelA (p65) (Quadro 3).

Quadro 3 Resultados obtidos na predição *in silico* pelo SWISStargetprediction

<b>Ligantes ALOX5, ALOX15 e ALOX12 com similaridade baseada em 3D</b>		
CHEMBL463805 Similaridade: 0.867 	CHEMBL157844 Similaridade: 0.819 	CHEMBL465616 Similaridade: 0.817 
CHEMBL1163875 Similaridade: 0.808 	CHEMBL2163381 Similaridade: 0.762 	
<b>Ligantes do fator de transcrição p65 (RELA) com similaridade baseada em 3D</b>		
CHEMBL382151 Similaridade: 0.854	CHEMBL189707 Similaridade: 0.792	CHEMBL370022 Similaridade: 0.776

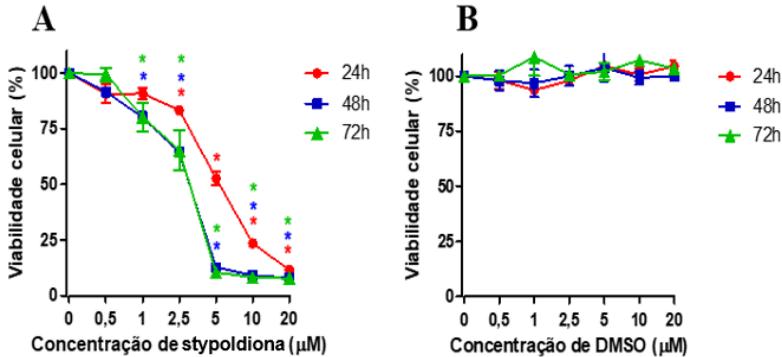


Fonte: A AUTORA.

## 5.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA STYPOLDIONA SOBRE CÉLULAS MM1.S

Como pode ser observado na Figura 13A, a stypoldiona diminuiu a viabilidade das células MM1.S, com redução significativa da viabilidade celular a partir de 2,5  $\mu\text{M}$  no período de 24 h e de 1  $\mu\text{M}$  nos períodos de 48 e 72 h. A redução na viabilidade celular foi dependente do tempo e da concentração quando comparado os tempos de 24 e 48 h, e 24 e 72 h, e não houve diferença significativa entre os tempos de 48 e 72 h. A Figura 13B mostra a curva de concentração e tempo resposta realizada com o solvente (DMSO), e é possível observar que não há interferência do mesmo na redução da viabilidade celular. A partir dessas curvas foi possível calcular os valores de  $\text{CI}_{50}$  da stypoldiona na linhagem MM1.S, os quais estão demonstrados na Tabela 1.

Figura 13 Efeito citotóxico da stypoldiona em células MM1.S



As células MM1.S ( $1 \times 10^5$  células/poço - 24 h,  $5 \times 10^4$  células/poço - 48 h e  $2,5 \times 10^4$  células/poço - 72 h) foram incubadas com a stypoldiona (A) ou com o veículo DMSO (B) nas concentrações de 0,5, 1, 2,5, 5, 10 e 20  $\mu\text{M}$ . A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Cada ponto representa media  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. \* $p \leq 0,05$  quando comparado ao grupo controle, ANOVA *two-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni. Fonte: A AUTORA.

Tabela 1 Valores de CI<sub>50</sub> calculados nas células MM1.S após 24, 48 e 72 h de incubação com a stypoldiona

Tempo	CI <sub>50</sub> MM1.S
24 h	$5,38 \pm 0,38 \mu\text{M}$
48 h	$2,49 \pm 0,44 \mu\text{M}$
72 h	$2,55 \pm 0,53 \mu\text{M}$

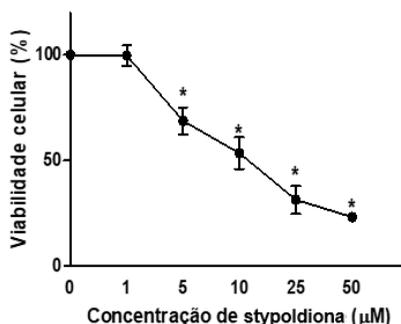
Fonte: A AUTORA.

### 5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA STYPOLDIONA EM CÉLULAS DE SP

#### 5.3.1 Efeito citotóxico em células mononucleadas de SP

Como é possível observar na Figura 14, a stypoldiona foi citotóxica de forma significativa em células mononucleadas somente a partir da concentração de 5  $\mu\text{M}$  no período de incubação de 24 h. Apesar de o composto demonstrar citotoxicidade para as células de pacientes saudáveis, a  $\text{CI}_{50}$  obtida foi de  $12,19 \pm 0,41 \mu\text{M}$ , cerca de 2,3 x maior do que a encontrada em células de MM.

Figura 14 Efeito citotóxico da stypoldiona em células mononucleadas isoladas de SP.



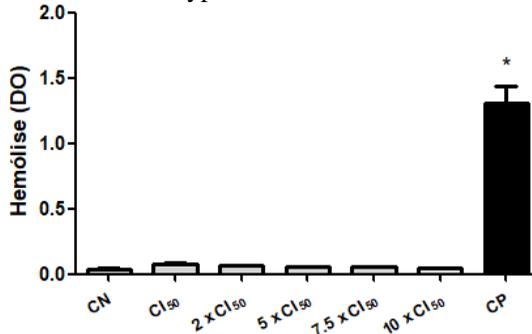
As células mononucleadas de SP ( $7,5 \times 10^5$  células/poço) foram incubadas com a stypoldiona nas concentrações de 1-50  $\mu\text{M}$  por 24 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Cada ponto representa media  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. \* $p \leq 0,05$  quando comparado ao grupo controle, ANOVA *one-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni. Fonte: A AUTORA.

### 5.3.2 Avaliação do efeito hemolítico induzido pela stypoldiona em eritrócitos humanos

O efeito da stypoldiona em eritrócitos isolados do SP de pacientes considerados saudáveis foi avaliado nas concentrações de 5,38  $\mu\text{M}$  ( $\text{CI}_{50}$ ), 10,76  $\mu\text{M}$  (2 x  $\text{CI}_{50}$ ), 26,9  $\mu\text{M}$  (5 x  $\text{CI}_{50}$ ), 40,35  $\mu\text{M}$  (7,5 x  $\text{CI}_{50}$ ) e 53,8  $\mu\text{M}$  (10 x  $\text{CI}_{50}$ ). A Tabela 2 apresenta os valores de hemólise encontrados em cada concentração, os quais estão representados na Figura 15. Os dados apresentados demonstram que a stypoldiona não

possui efeito hemolítico significativo em eritrócitos quando comparado ao controle negativo mesmo em concentrações dez vezes superiores à sua  $CI_{50}$ .

Figura 15 Efeito da stypoldiona sobre eritrócitos de SP.



Hemólise representada pela densidade óptica (DO) após tratamento dos eritrócitos com o composto. As amostras de SP foram coletadas em tubo de citrato e a solução de hemácias foi preparada conforme o protocolo experimental. Os ensaios foram realizados em triplicata, com pelo menos três amostras coletadas de diferentes indivíduos. \*  $p \leq 0,05$  quando comparado ao controle negativo,  $p \leq 0,05$ , ANOVA *one-way* seguida de teste *post-hoc* de Tukey Nota: CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo. Fonte: A AUTORA.

Tabela 2 Taxa de hemólise (%) provocada pela stypoldiona em diferentes concentrações.

	$CI_{50}$	2 x $CI_{50}$	5 x $CI_{50}$	7,5 x $CI_{50}$	10 x $CI_{50}$
<b>Stypoldiona</b>	0,52 ± 0,09 %	0,84 ± 0,05 %	0,43 ± 0,14 %	2,88 ± 0,16 %	3,12 ± 0,08 %

Fonte: A AUTORA.

#### 5.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA STYPOLDIONA NO CICLO CELULAR DE CÉLULAS MM1.S

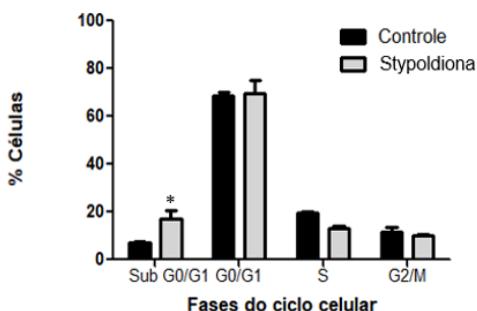
O efeito da stypoldiona na progressão do ciclo celular de células MM1.S foi avaliado após 24 h de incubação na sua  $CI_{50}$  de 24 h. A porcentagem de células em cada fase do ciclo celular está apresentada na Tabela 3 e ilustrada na Figura 16. Quando comparadas ao grupo controle, as células MM1.S tratadas com a stypoldiona não apresentaram diferença significativa na quantidade de células presentes nas diferentes fases do ciclo celular.

Tabela 3 Efeito da stypoldiona nas diferentes fases do ciclo celular das células MM1.S.

	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)	Sub G0/G1 (%)
<b>Controle</b>	68,65 ± 1,51	19,85 ± 0,36	11,53 ± 1,87	7,16 ± 0,19
<b>Stypoldiona</b>	74,87 ± 0,405	14,27 ± 0,06	10,86 ± 0,46	17,06 ± 3,4

Fonte: A AUTORA.

Figura 16 Efeito da stypoldiona na progressão do ciclo celular das células MM1.S.



As células MM1.S ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas por 24 h com a stypoldiona na sua  $CI_{50}$  de 24 h e os grupos controle correspondem às células sem tratamento. As fases estão representadas por G0/G1, S e G2/M. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD

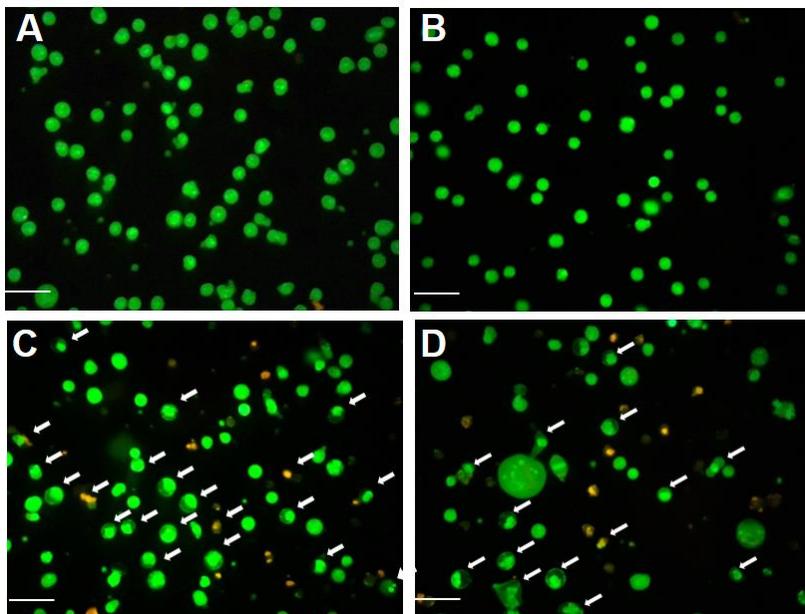
FACSCanto™ II e avaliadas pelo software *Infinicity* versão 1.7 (Cytognos®). Os gráficos representam a média  $\pm$  EPM de pelo menos três experimentos independentes. Fonte: A AUTORA.

## 5.5 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DA APOPTOSE

### 5.5.1 Microscopia de fluorescência com BE/LA

Para avaliar se a stypoldiona induziu morte celular por apoptose em células MM1.S, foi utilizada inicialmente a técnica de microscopia de fluorescência após coloração com BE e LA (Figura 17). Após 24 h de incubação com o composto na sua  $CI_{50}$  de 24 h foi possível observar nas células de MM características típicas de células em apoptose inicial, como a manutenção da integridade de membrana (indicada pela fluorescência verde do LA) e a condensação de cromatina. Também foi possível observar sinais de apoptose tardia, como a perda da integridade de membrana, indicada pela fluorescência alaranjada do BE. As células apoptóticas estão indicadas pelas setas brancas na Figura 17.

Figura 17 Alterações morfológicas induzidas pela stypoldiona em células MM1.S.

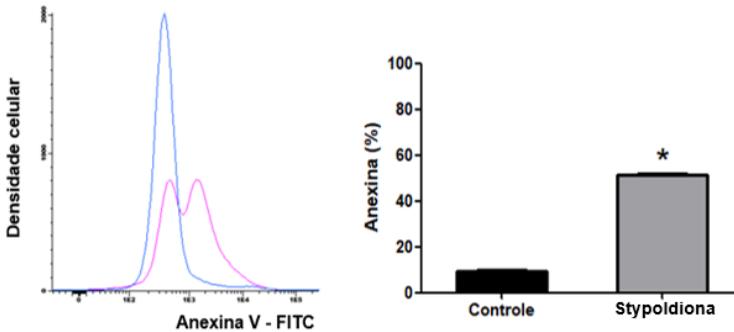


As células MM1.S ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com o composto na sua  $CI_{50}$  de 24 h e coradas com uma solução 1:1 de BE/LA. Os grupos controles representam as células sem tratamento (A) e tratadas com o solvente DMSO (B). As células foram observadas em microscópio de fluorescência na magnitude de 400 x e os campos representativos foram fotografados, pelo menos, dez campos diferentes. As setas brancas indicam células em apoptose. Painel A: Controle. Painel B: DMSO. Painéis C e D: células incubadas com o composto. Os resultados foram obtidos de pelo menos dois experimentos independentes. Escala: 10  $\mu$ m. Fonte: A AUTORA.

### 5.5.2 Avaliação da exposição dos resíduos de fosfatidilserina pelo método da Anexina V-FITC

Como representado na Figura 18, é possível observar que o grupo de células incubadas com a stypoldiona teve expressão dos resíduos de fosfatidilserina em cerca de 52 % das células de MM, diferença significativa quando comparado ao grupo controle (células sem tratamento).

Figura 18 Efeito da stypoldiona na exposição dos resíduos de fosfatidilserina em células MM1.S pelo método da Anexina V conjugada a FITC.

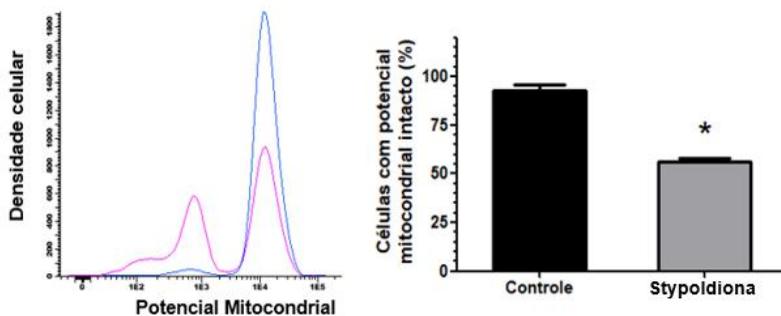


As células MM1.S ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas por 24 h na ausência (grupo controle) e na presença da stypoldiona, na sua  $CI_{50}$  de 24 h. A exposição dos resíduos de fosfatidilserina foi determinada pela marcação com Anexina V-FITC. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II e avaliadas pelo *software Infinicyt* versão 1.7. O histograma é ilustrativo de um único experimento e os gráficos representam a média  $\pm$  EPM de pelo menos dois experimentos independentes. \* $p \leq 0,05$  quando comparado ao grupo controle, teste t de *Student*. Fonte: A AUTORA.

### 5.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA STYPOLDIONA NO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ( $\Delta\Psi_M$ )

A fim de se avaliar se a morte celular ocasionada pela stypoldiona está relacionada a danos mitocondriais, avaliou-se o efeito do composto sobre o  $\Delta\Psi_m$  das células MM1.S. A Figura 19 representa os resultados obtidos e, a partir dela, pode-se observar uma redução significativa de  $35,5 \pm 5,5\%$  do  $\Delta\Psi_m$  das células tratadas com o composto.

Figura 19 Efeito da stypoldiona no  $\Delta\Psi_m$  de células MM1.S após 24 h de incubação.



As células MM1.S ( $1 \times 10^6$  células/poço), foram incubadas por 24 h na ausência (grupo controle) e na presença da stypoldiona na sua  $CI_{50}$  de 24 h. O percentual de células com o  $\Delta\Psi_m$  intacto foi determinado por meio do kit *MitoView* 633. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II e avaliadas pelo *software Infinicyt* versão 1.7. O histograma é ilustrativo de um único experimento e os gráficos representam a média  $\pm$  EPM de pelo menos dois experimentos independentes.  $*p \leq 0,05$  quando comparado ao grupo controle, teste t de *Student*. Fonte: A AUTORA.

## 5.7 AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NOS MECANISMOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE

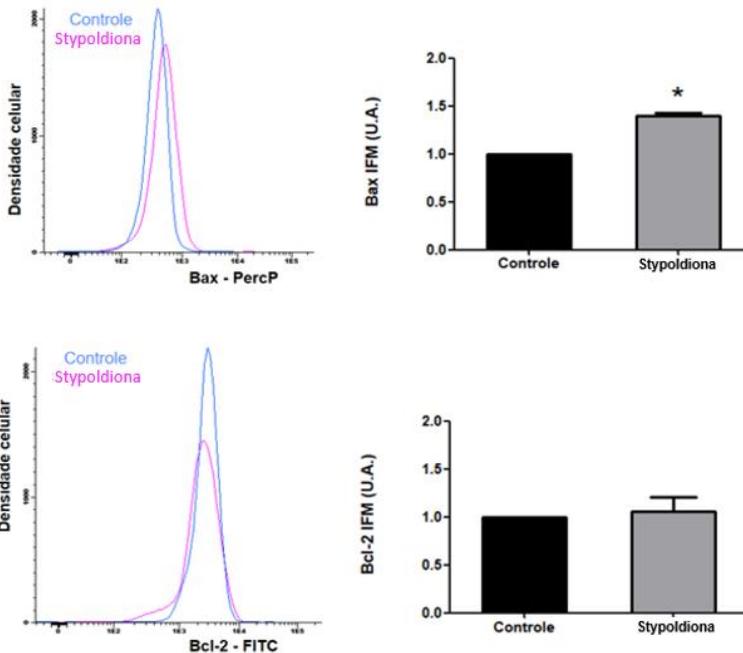
Para avaliar se os resultados sugestivos de apoptose se correlacionam à apoptose extrínseca e/ou intrínseca, foram avaliadas diversas proteínas envolvidas nessas duas vias. Para todas as análises, as

células MM1.S foram incubadas por 24 h com a stypoldiona na sua  $CI_{50}$  de 24 h.

### 5.7.1 Investigação do efeito da stypoldiona sobre proteínas da família Bcl-2

Como é possível observar na Figura 20, houve um aumento significativo de  $1,4 \pm 0,03$  vezes na expressão de Bax em relação ao controle de células sem tratamento, entretanto, não houve alteração significativa na expressão da proteína Bcl-2. Ainda assim, a relação Bax/Bcl-2 nas células tratadas passou a ser de 1,33, o que favorece o estímulo pró-apoptótico.

Figura 20 Efeito da stypoldiona na expressão das proteínas Bcl-2 e Bax em células MM1.S.



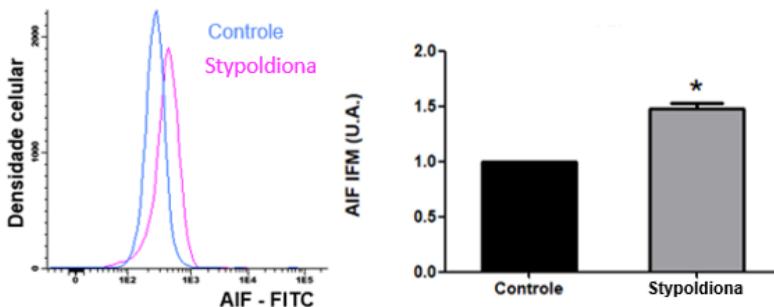
As células MM1.S ( $1 \times 10^6$  células/poço), foram incubadas por 24 h na ausência (grupo controle) e na presença da stypoldiona na sua  $CI_{50}$  de 24

h. IFM foi determinada por CF após a marcação com o anticorpo anti-Bcl-2 conjugado a FITC e anti-Bax conjugado a PercP. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II e avaliadas pelo *software Infinicyt* versão 1.7. Os histogramas são ilustrativos de um único experimento e os gráficos representam a média  $\pm$  EPM de, pelo menos, dois experimentos independentes. \* $p \leq 0,05$  quando comparado ao grupo controle, teste t de *Student*. Nota: IFM: intensidade de fluorescência média. U.A.: Unidades arbitrárias. Fonte: A AUTORA.

### 5.7.2 Investigação do efeito da stypoldiona sobre o fator indutor da apoptose (AIF)

A expressão da proteína pró-apoptótica AIF está representada na Figura 21, e, pode-se observar um aumento significativo de  $1,5 \pm 0,05$  vezes na expressão de AIF.

Figura 21 Efeito da stypoldiona na expressão da proteína AIF em células MM1.S.



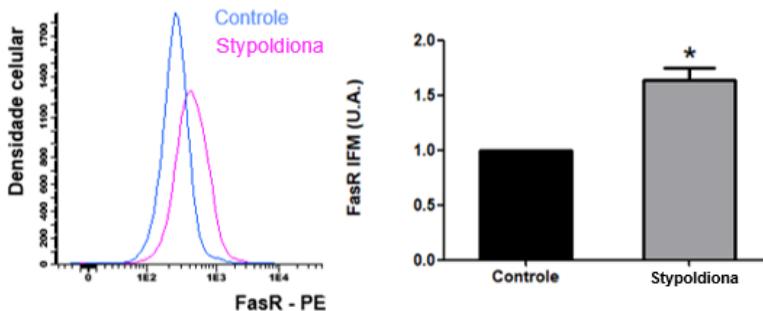
As células MM1.S ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas por 24 h na ausência (grupo controle) e na presença da stypoldiona na sua  $CI_{50}$  de 24 h. A IFM foi determinada por CF após a marcação com o anticorpo anti-AIF conjugado a FITC. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II e avaliadas pelo *software Infinicyt* versão 1.7. O histograma é ilustrativo de um único experimento e os gráficos

representam a média  $\pm$  EPM de pelo menos dois experimentos independentes.  $*p \leq 0,05$  quando comparado ao grupo controle, teste t de Student. Nota: IFM: intensidade de fluorescência média. U.A.: Unidades arbitrárias. Fonte: A AUTORA.

### 5.7.3 Investigação do efeito da stypoldiona sobre o receptor Fas

Para avaliar o envolvimento da stypoldiona com a apoptose extrínseca, avaliou-se o seu efeito na expressão do receptor Fas. A Figura 22 representa os resultados obtidos, onde foi observado um aumento significativo de  $1,63 \pm 0,11$  vezes na expressão de FasR quando comparado ao controle (células sem tratamento).

Figura 22 Efeito da stypoldiona na expressão do receptor Fas.

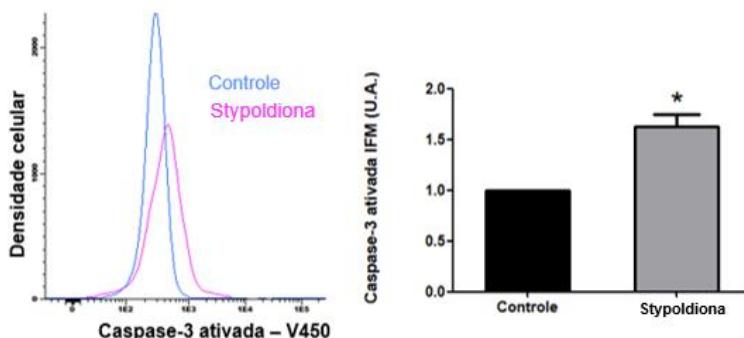


As células MM1.S ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas por 24 h na ausência (grupo controle) e na presença da stypoldiona na sua  $CI_{50}$  de 24 h. A IFM foi determinada por CF após a marcação com o anticorpo anti-FasR conjugado a PE. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II e avaliadas pelo *software Infinicyt* versão 1.7. O histograma é ilustrativo de um único experimento e os gráficos representam a média  $\pm$  EPM de pelo menos dois experimentos independentes.  $*p \leq 0,05$  quando comparado ao grupo controle, teste t de Student. Nota: IFM: intensidade de fluorescência média. U.A.: Unidades arbitrárias. Fonte: A AUTORA.

### 5.7.4 Investigação do efeito da stypoldiona sobre a caspase-3 ativada

A Figura 23 representa o aumento da caspase-3 ativada em células MM1.S após o período de incubação de 24 h com a stypoldiona. Foi observado um aumento significativo, de  $1,62 \pm 0,12$  vezes quando comparadas as células tratadas em relação ao controle (células sem tratamento).

Figura 23 Efeito da stypoldiona na expressão de caspase-3 ativada em células MM1.S.



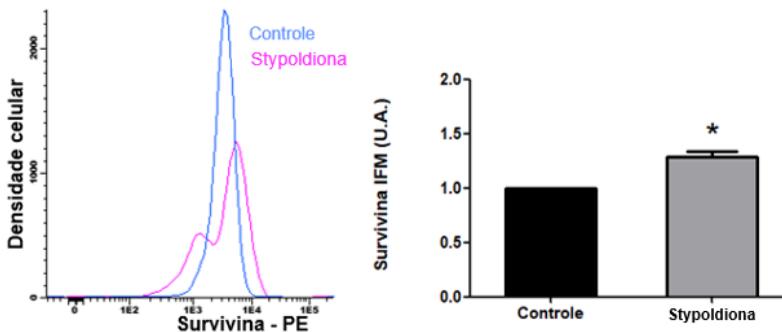
As células MM1.S ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas por 24 h na ausência (grupo controle) e na presença da stypoldiona na sua  $CI_{50}$  de 24 h. A IFM foi determinada por CF após a marcação com o anticorpo anti-caspase-3 ativada conjugado a V450. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II e avaliadas pelo *software Infinicyt* versão 1.7. O histograma é ilustrativo de um único experimento e os gráficos representam a média  $\pm$  EPM de, pelo menos, dois experimentos independentes. \* $p \leq 0,05$  quando comparado ao grupo controle, teste t de *Student*. Nota: IFM: intensidade de fluorescência média. U.A.: Unidades arbitrárias. Fonte: A AUTORA.

### 5.7.5 Efeito da stypoldiona sobre a proteína antiapoptótica survivina

Como pode ser observado na Figura 24, houve um aumento significativo de  $1,29 \pm 0,04$  vezes na IFM nas células tratadas com o composto quando comparadas ao controle (células sem tratamento).

Porém, no histograma apresentado, é possível observar que em cerca de 35,5 % das células reduziram a expressão de survivina em relação ao controle, enquanto nos 64,5 % restantes, houve aumento na expressão dessa proteína.

Figura 24 Efeito da stypoldiona na expressão da proteína survivina em células MM1.s.

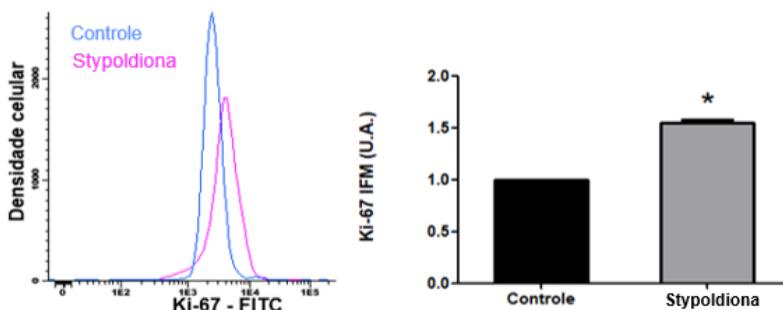


As células MM1.S ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas por 24 h na ausência (grupo controle) e na presença da stypoldiona na sua  $CI_{50}$  de 24 h. A IFM foi determinada por CF após a marcação com o anticorpo anti-survivina conjugado a PE. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II e avaliadas pelo *software* *Infinicyt* versão 1.7. O histograma é ilustrativo de um único experimento e os gráficos representam a média  $\pm$  EPM de pelo menos dois experimentos independentes. \* $p \leq 0,05$  quando comparado ao grupo controle, teste t de *Student*. Nota: IFM: intensidade de fluorescência média. U.A.: Unidades arbitrárias. Fonte: A AUTORA.

## 5.8 EFEITO DA STYPOLDIONA SOBRE A PROTEÍNA KI-67

Como pode-se observar na Figura 25, após o período de incubação com a stypoldiona, houve um aumento de  $1,54 \pm 0,03$  vezes da expressão de Ki-67 em relação ao grupo controle (sem tratamento).

Figura 25 Efeito da stypoldiona na expressão da proteína Ki-67 em células MM1.S.

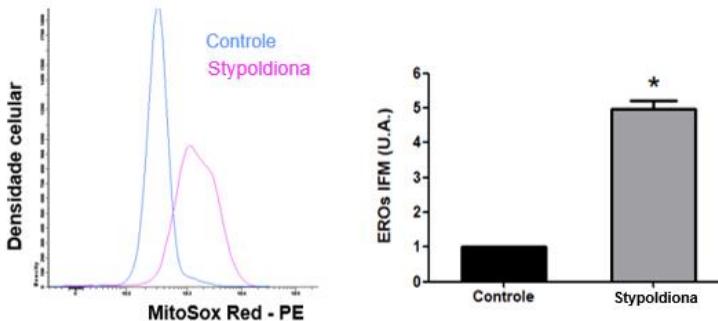


As células MM1.S ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas por 24 h na ausência (grupo controle) e na presença da stypoldiona na sua  $CI_{50}$  de 24 h. A IFM foi determinada por CF após a marcação com o anticorpo anti-Ki-67 conjugado a FITC. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II e avaliadas pelo *software Infinicyt* versão 1.7. O histograma é ilustrativo de um único experimento e os gráficos representam a média  $\pm$  EPM de pelo menos dois experimentos independentes.  $*p \leq 0,05$  quando comparado ao grupo controle, teste t de *Student*. Nota: IFM: intensidade de fluorescência média. U.A.: Unidades arbitrárias. Fonte: A AUTORA.

## 5.9 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA STYPOLDIONA NA GERAÇÃO DE EROS

Como pode ser observado na Figura 26, houve um aumento significativo de  $4.97 \pm 0.24$  vezes da concentração de EROs nas células MM1.S após o tratamento com a stypoldiona quando comparadas ao controle (células sem tratamento).

Figura 26 Efeito da stypoldiona sobre a formação de EROs

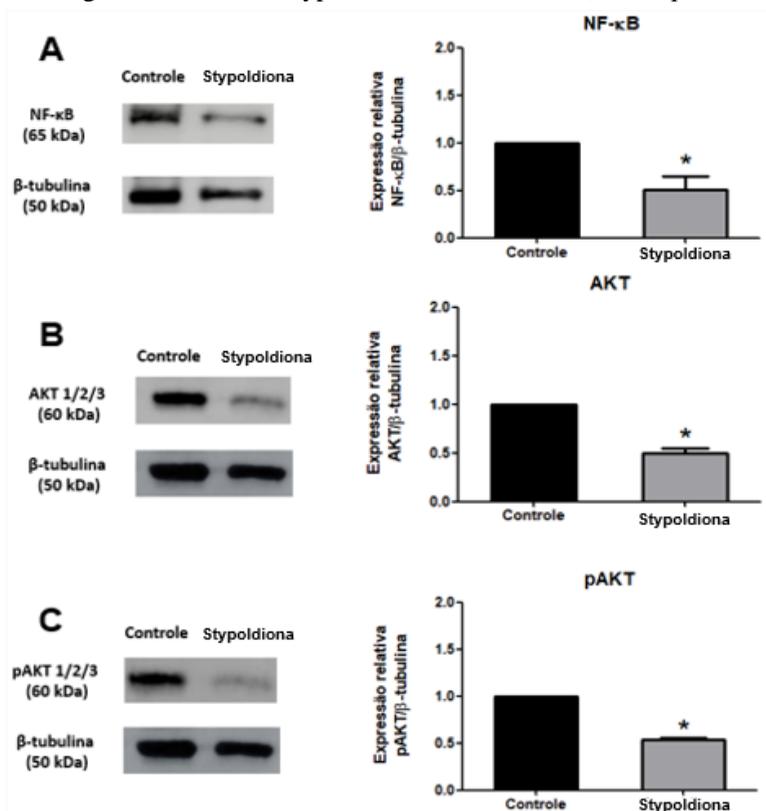


As células MM1.S ( $1 \times 10^6$  células/poço), foram incubadas por 24 h na ausência (grupo controle) e na presença da stypoldiona na sua  $CI_{50}$  de 24 h. A IFM foi determinada por CF após a marcação com o corante *MitoSox*. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCantoTM II e avaliadas pelo *software Infinicyt* versão 1.7. O histograma é ilustrativo de um único experimento e os gráficos representam a média  $\pm$  EPM de pelo menos dois experimentos independentes. \* $p \leq 0,05$  quando comparado ao grupo controle, teste t de *Student*. Nota: IFM: intensidade de fluorescência média. U.A.: Unidades arbitrárias. Fonte: A AUTORA.

#### 5.10 EFEITO DA STYPOLDIONA SOBRE A EXPRESSÃO DE NF- $\kappa$ B, AKT E pAKT

Na Figura 26 é possível observar que, após a incubação com a stypoldiona na sua  $CI_{50}$  de 24 h, houve uma redução na expressão de NF- $\kappa$ B de  $0.51 \pm 0.13$  U.A. (Figura 27A) em relação ao grupo controle (sem tratamento), bem como redução na expressão de Akt e pAkt, de  $0.49 \pm 0.05$  e  $0.53 \pm 0.02$ , respectivamente (Figura 27B-C). A relação Akt/pAkt do controle foi de  $0,95 \pm 0,03$  U.A. e nas células incubadas com a stypoldiona foi obtida uma relação de  $1,04 \pm 0.19$  U.A.

Figura 27 Efeito da stypoldiona sobre o NF- $\kappa$ B, Akt e pAkt.



As células MM1.S ( $4 \times 10^6$  células), foram incubadas por 24 h na ausência (grupo controle) e na presença da stypoldiona na sua  $CI_{50}$  de 24 h. A avaliação da expressão de NF- $\kappa$ B (A), Akt (B) e pAkt (C) foi realizada por WB e a proteína  $\beta$ -tubulina foi utilizada como controle da reação. Os resultados da quantificação de proteínas representam a média  $\pm$  EPM. U.A.: Unidades arbitrárias. \* Diferença estatística em relação ao grupo controle,  $p \leq 0,05$ , teste t de *Student*. Fonte: A AUTORA.

## 6 DISCUSSÃO

O aumento das pesquisas científicas na área da biologia tumoral nos últimos anos colaborou muito com a elucidação dos mecanismos fisiopatológicos do MM, o que foi importante para o conhecimento dos possíveis alvos na intervenção terapêutica. Entretanto, mesmo com a melhora na sobrevivência dos pacientes nas últimas décadas devido a inserção de novos fármacos, o MM permanece uma doença incurável (KUMAR et al., 2017a). Dessa forma, a recidiva da doença é inevitável e, devido a sua heterogeneidade genética, às altas taxas de resistência ao tratamento e à presença de inúmeros efeitos adversos em resposta a terapia farmacológica, o combate à essa neoplasia segue um desafio para a comunidade científica (ATTAL et al., 2012; MCCARTHY et al., 2012; MCCARTHY et al., 2017). Considerando esses aspectos, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito citotóxico de uma *o*-quinona, a stypoldiona, isolada da alga parda *Styopodium zonale*, sobre células de linhagem de MM.

Na investigação de novos protótipos para o desenvolvimento de fármacos procura-se compostos que apresentem alta atividade biológica com baixa toxicidade para células normais. Além disso, é importante que o composto possua boas características farmacocinéticas, o que garante que a concentração desejada do fármaco chegará ao alvo terapêutico dentro do organismo. Assim, já é comprovado que avaliar as estimativas dos parâmetros ADME nas fases iniciais da pesquisa por novos compostos reduz de forma significativa as falhas relacionadas às características farmacocinéticas nas fases clínicas. Para realizar essas estimativas, os modelos computacionais trouxeram um grande avanço nessa abordagem (DAHLIN; INGLESE; WALTERS, 2015; HAY et al., 2014).

Os primeiros parâmetros apresentados no Quadro 2 são as propriedades físico-químicas da stypoldiona e, a partir deles, foi gerado o radar de biodisponibilidade oral presente na Figura 12. A stypoldiona permaneceu dentro de todas as características adequadas para uma boa biodisponibilidade oral, o que sugere que o composto possa ser administrado por essa via. Além disso, o composto ficou dentro de todas as regras aplicadas, de Lipinski, Ghose, Veber, Egan e Muegge, e apresentou

um escore de biodisponibilidade (probabilidade do fármaco de apresentar >10 % de biodisponibilidade oral) de 0,56. Foi realizada também a predição da solubilidade em água da stypoldiona, onde a mesma foi classificada como moderadamente solúvel. A solubilidade em água é importante não só para a biodisponibilidade oral, mas também para uma maior facilidade na manipulação e formulação do composto (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017; OTTAVIANI et al., 2014). Além disso, mesmo para medicamentos destinados ao uso parenteral, a solubilidade em água é um fator importante para que a substância ativa seja distribuída de forma suficiente em uma menor dosagem (SAVJANI; GAJJAR; SAVJANI, 2012).

Como visto no Quadro 2, em relação as características farmacocinéticas, a stypoldiona apresentou alta capacidade de absorção gastrointestinal, o que reforça a possibilidade do seu uso por via oral. Além disso, os dados mostram a possibilidade de o composto permear a barreira hematoencefálica (BHE) e que o mesmo seja substrato da P-gp. A P-gp é uma das principais bombas de efluxo envolvidas em barreiras biológicas, inclusive presente na BHE, e é superexpressa em diversas neoplasias e relacionada com a resistência à múltiplos fármacos (ABRAHAM; SALAMA; AZAB, 2015; SHAROM, 2008). Assim, apesar da stypoldiona possuir a capacidade de permear a BHE, ela também pode ser substrato da P-gp, e isso pode diminuir o risco de neurotoxicidade. Porém, devem ser realizados mais estudos para avaliar a segurança da administração da stypoldiona quanto ao surgimento de efeitos adversos que envolvam o sistema nervoso central (SNC). Assim como a stypoldiona, alguns fármacos, inclusive utilizados para o tratamento do MM, são substratos da P-gp, como o bortezomibe e a doxorubicina. Além disso, alguns medicamentos, como a dexametasona, são capazes de aumentar a expressão dessas proteínas (BAO et al., 2011; NARANG et al., 2008; O'CONNOR et al., 2013; YE et al., 2008).

O conhecimento sobre a interação de compostos com as isoenzimas da superfamília do citocromo P450 (CYP) é de extrema importância para a pesquisa de novos fármacos, por se tratarem de enzimas responsáveis pela sua biotransformação metabólica. Estima-se que entre 50-90% das moléculas terapêuticas são substrato das cinco

principais isoformas do CYP, as quais foram avaliadas na predição realizada (DI, 2014; MCDONNELL; DANG, 2013). A inibição dessas isoenzimas pode levar a interações medicamentosas relacionadas à farmacocinética e à uma menor depuração do fármaco ou de seus metabólitos, o que gera como consequência o acúmulo do mesmo e a incidência de efeitos adversos (MANIKANDAN; NAGINI, 2018). A stypoldiona foi classificada como um possível inibidor de uma das cinco CYP avaliadas, a CYP2C9. Diversos outros fármacos utilizados no tratamento antineoplásico são inibidores de membros da superfamília CYP como, por exemplo o imatinibe, que é capaz de inibir a CYP2C9, e o bortezomibe e seus metabólitos, que são capazes de inibir as isoenzimas CYP2C19 e CYP2C9 (LU et al., 2006; RÉCOCHÉ et al., 2016). Assim, para a administração da stypoldiona em conjunto com outros fármacos, deve-se priorizar aqueles que não sejam metabolizados pela CYP2C9 como o bortezomibe, pois o mesmo é metabolizado pelas isoenzimas CYP3A4 e CYP2C19, o que não acarretaria em efeitos de interação medicamentosa (LU et al., 2006).

Por fim, a última análise realizada pelo *SWISSADME* sobre a stypoldiona levou em consideração os PAINS e os alertas estruturais de Brenk, além de avaliar a sua acessibilidade sintética. Nessa análise, foram gerados dois alertas devido a presença do grupo quinona e também por se tratar de uma *o*-quinona. Como já citado, as quinonas são compostos altamente reativos devido às suas características oxidantes e eletrofílicas, bem como à sua capacidade de participar de reações do ciclo redox e reações de Michael (BOLTON; DUNLAP, 2017; MONKS et al., 1992). Um dos motivos da reatividade das *o*-quinonas está relacionado a presença de um anel de seis átomos de carbono não aromático, o que as torna instáveis e facilmente reduzidas à semiquinonas ou posteriormente ao catecol, que pode seguir o caminho inverso e ser transformado novamente em uma *o*-quinona (BRUINS; ALBADA; VAN DELF, 2018). Tais compostos, assim que formados, podem reagir com espécies nucleofílicas, como grupamentos tiol e aminas, formando um conjugado aromático estável. Porém, uma vez formadas, as *o*-quinonas possuem diversos alvos biológicos com efeitos que vão desde a quimioprevenção até a toxicidade (BOLTON; DUNLAP, 2017; BOLTON; DUNLAP; DIETZ, 2018). A acessibilidade sintética atribuída à stypoldiona foi de

6,93, o que representa uma possível dificuldade para a síntese do composto.

A última ferramenta preditiva utilizada foi o *SWISSTargetprediction*, que trouxe como possíveis alvos farmacológicos da stypoldiona as enzimas araquidonato 5-lipoxigenase, araquidonato 15-lipoxigenase, araquidonato 12-lipoxigenase e o fator de transcrição RelA (p65). A similaridade da stypoldiona com os inibidores de lipoxigenase foi de até 0,87 (escore de 0-1) (AMAGATA et al., 2003). Tais enzimas participam da via do ácido araquidônico e a inibição dessas lipoxigenases pode levar à uma ação anti-inflamatória, além de relatos da literatura abordarem que a inibição de algumas dessas enzimas, como a araquidonato 12-lipoxigenase, resulta em um efeito antineoplásico pela inibição da proliferação celular e indução da apoptose em células de tumor gástrico (WONG et al., 2001). Além disso, a 15-lipoxigenase está relacionada ao desenvolvimento de diversas doenças, como o câncer, e sua atividade na terapia antineoplásica já é avaliada na literatura (ORAFIAIE; MATIN; SADEGHIAN, 2018).

A stypoldiona também apresentou uma similaridade de até 0,85 com inibidores do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (subunidade p65). Como citado anteriormente, a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B contribui para a manutenção do microambiente pró-inflamatório tumoral, o que resulta em aumento da proliferação celular, progressão tumoral e mecanismos de resistência ao tratamento. Assim, a inibição dessa via representa uma estratégia muito procurada em pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos (ZHANG; LENARDO; BALTIMORE, 2017). Dessa forma, a stypoldiona pode estar relacionada com a via do NF- $\kappa$ B e com diversas outras vias importantes para o tratamento antineoplásico, o que torna esse composto um bom candidato para o estudo de novos fármacos a serem utilizados na quimioterapia.

Após a predição *in silico* das características químicas e biológicas da stypoldiona, iniciou-se a investigação do seu efeito citotóxico *in vitro*. Como representado na Figura 13A, a stypoldiona apresentou redução na viabilidade celular de forma dependente da concentração e do período de incubação nas células de MM (Figura 13A). Esses resultados corroboram outros estudos presentes na literatura, onde

foi avaliada a atividade citotóxica de quinonas em células MM1.S, como a primina, que apresentou  $CI_{50}$  de  $5,31 \pm 0,28 \mu\text{M}$  no período de 24 h, e de  $5,11 \pm 0,36 \mu\text{M}$  e  $1,36 \pm 0,36 \mu\text{M}$  em 48 e 72 h, respectivamente (BIGOLIN, 2016). Além disso, Santos-Pirath (2018) ao investigar o efeito citotóxico de uma plastoquinona sobre células MM1.S observou valores de  $CI_{50}$  de  $12,3 \pm 1,1 \mu\text{M}$ ,  $4,8 \pm 0,5 \mu\text{M}$  e  $3,1 \pm 0,5 \mu\text{M}$  após 24, 48 e 72h de incubação, respectivamente. Outro estudo realizado por Maioral (2017) avaliou o efeito citotóxico do acetato de miconidina, uma hidroquinona sobre células MM1.S e demonstrou valores de  $CI_{50}$  de  $5,2 \pm 0,3 \mu\text{M}$ ,  $4,3 \pm 0,2 \mu\text{M}$  e  $1,7 \pm 0,3 \mu\text{M}$  nos períodos de 24, 48 e 72 h, respectivamente. Vale ressaltar que todos os estudos citados acima utilizaram  $5,0 \times 10^4$ ,  $2,5 \times 10^4$  e  $12,5 \times 10^3$  células/poço para 24, 48 e 72 h, respectivamente, o que corresponde à metade da densidade celular utilizada no presente trabalho. Ainda assim, os mesmos apresentaram valores de  $CI_{50}$  próximos ou superiores aos deste estudo (Tabela 1), o que ressalta a superioridade do efeito citotóxico da stypoldiona em relação aos compostos já descritos na literatura.

De acordo com a literatura, o efeito citotóxico das quinonas provém de dois mecanismos principais: seu ciclo redox, capaz de gerar EROs, e também da sua capacidade de gerar danos ao DNA. Conforme citado anteriormente, as quinonas são facilmente reduzidas a semiquinonas (Figura 11) que podem ser oxidadas pelo oxigênio molecular e levar à produção de EROs. Depois de formadas, as EROs podem interagir com lipídeos de membrana, proteínas, DNA e RNA, e causar danos celulares irreversíveis (BOLTON; DUNLAP, 2017). Já existem relatos na literatura do efeito citotóxico da stypoldiona em células CEM (leucemia linfoblástica aguda) e também do seu efeito antitumoral em camundongos com tumor ascítico de Ehrlich e xenoenxertos de camundongos com células P388 (leucemia linfoblástica aguda), onde foi observado um aumento de 42 % na sobrevida dos animais (WHITE; JACOBS, 1983; O'BRIEN et al., 1984). A stypoldiona é capaz de interferir em diversos processos biológicos e bioquímicos e grande parte dos efeitos realizados por essa *o*-quinona estão relacionados com a sua reatividade com grupos sulfidríla de inúmeros compostos contendo o grupamento tiol, como o  $\beta$ -mercaptoetanol, cisteína, glutatona e diversas proteínas, como a tubulina. Dados da literatura sugerem que o amplo espectro de atividade biológica da stypoldiona ocorre devido a adição de

enxofre no C-4 do anel quinona, que favorece o bloqueio por ligação covalente dos grupos sulfidrila localizados nos sítios reativos das proteínas ou proximidades (O'BRIEN et al., 1986).

Ao se investigar o efeito de um novo composto para o uso no tratamento de neoplasias, espera-se que o mesmo seja seletivo para as células neoplásicas, a fim de evitar efeitos adversos relacionados ao tratamento (HOIJAT-FARSANGI, 2015). Assim, após comprovar a citotoxicidade da stypoldiona sobre células de MM, foi avaliado o seu efeito sobre hemácias e sobre células mononucleadas isoladas do SP de indivíduos considerados saudáveis. A stypoldiona apresentou efeito citotóxico significativo sobre células mononucleadas a partir da concentração de 5  $\mu$ M (Figura 14) e, apesar de apresentar uma  $CI_{50}$  considerada baixa, a mesma foi cerca de 2,3 x maior do que a encontrada sobre células de MM. Na literatura, já existem relatos do efeito ichtiotóxico da stypoldiona (GERWICK; FENICAL, 1981), porém, o composto não apresentou toxicidade para os xenoenxertos de camundongos com as células P388 e nem para os camundongos com tumor ascítico de Ehrlich. A stypoldiona também não apresentou evidências de toxicidade aguda (dentro de 24 h) em camundongos que receberam a dose de 100 mg/kg do composto. Além disso, neste estudo, o composto não demonstrou efeito hemolítico significativo, mesmo em uma concentração 10 x superior a  $CI_{50}$  observada nas células MM1.S, o que sugere que o composto possa ser administrado por via endovenosa (Figura 15 e Tabela 2).

Sabe-se que as células neoplásicas se encontram em constante estado de proliferação e que a progressão ao longo das fases do ciclo celular é essencial para a replicação e manutenção dessas células. Defeitos no ciclo celular são características comuns em células neoplásicas e incluem proliferação descontrolada, instabilidade genômica e instabilidade cromossômica (MAES et al., 2017). A desregulação de genes, como o da ciclina D, é um evento comum em pacientes com MM e resulta em uma divisão celular aberrante (MUSGROVE et al., 2011). Assim, o ciclo celular é um alvo interessante para o tratamento do MM, o que já é abordado na quimioterapia convencional dos pacientes com o uso da vincristina. Porém, o tratamento com vincristina possui muitas

limitações, como o desenvolvimento de neuropatia periférica e neutropenia (DUMONTET; JORDAN, 2010; MAES et al., 2017).

Ao avaliar o efeito da stypoldiona nas diferentes fases do ciclo celular das células MM1.S não foi observada nenhuma diferença significativa em relação ao grupo controle (células sem tratamento) (Figura 16 e Tabela 3). Estudos realizados na década de 80 observaram que a stypoldiona foi capaz de inibir a polimerização de microtúbulos purificados de cérebro bovino de maneira dependente da concentração, onde 50% da inibição ocorreu em uma concentração de aproximadamente 25  $\mu\text{M}$  de stypoldiona. O mesmo estudo também observou que o composto foi capaz de inibir a ligação da colchicina à tubulina, com bloqueio de 50% da atividade da colchicina na concentração de aproximadamente 12-15  $\mu\text{M}$ , porém de forma não competitiva, o que sugere que a stypoldiona interaja com a tubulina em um sítio ativo diferente da colchicina (O'BRIEN; JACOBS; WILSON, 1983). O efeito da stypoldiona na divisão celular também foi avaliado em embriões de ouriço-do-mar por White *and* Jacobs (1983), onde foi observada uma inibição dependente da concentração, com  $\text{CI}_{50}$  de 2,5  $\mu\text{M}$ . O mesmo estudo também relatou que a *o*-quinona é capaz de inibir a captação de aminoácidos e nucleotídeos (WHITE; JACOBS, 1983).

Poucos anos mais tarde, no mesmo grupo de pesquisa, O'Brien e colaboradores (1989) observaram o efeito do composto na divisão celular de embriões de ouriço-do-mar em diversas concentrações. Em concentrações mais baixas (5-10  $\mu\text{M}$ ), foi observada apenas a inibição da citocinese, com a evolução normal da mitose e sem efeito na organização dos microtúbulos. Já em concentrações de 20-40  $\mu\text{M}$ , a stypoldiona bloqueou a divisão celular dos embriões dos ouriço-do-mar antes do estágio da primeira divisão e foi observada uma desorganização na formação dos microtúbulos. Por fim, com 80  $\mu\text{M}$  ou mais do composto houve a ausência da polimerização dos microtúbulos e bloqueio do ciclo celular (O'BRIEN et al., 1989). Diferente dos estudos citados acima, neste trabalho não foram observadas alterações significativas no ciclo celular das células MM1.S (Figura 16). Na comparação com os estudos citados anteriormente, deve-se levar em conta que os mesmos foram realizados em diferentes condições e com diferentes linhagens celulares. Esses resultados podem sugerir que a stypoldiona pode afetar a divisão celular das células MM1.S, porém em estágios posteriores aos avaliados,

como no momento da citocinese, ou em concentrações superiores à utilizada (5,38  $\mu\text{M}$ ), pois essa pode ter sido muito baixa para inibir a polimerização dos microtúbulos.

A Ki-67 é uma proteína nuclear envolvida na regulação do ciclo celular, tanto em condições fisiológicas quanto em neoplasias, e é considerada um indicador de proliferação, pois se encontra presente somente em células em processo de divisão celular. Assim, na clínica, a proteína Ki-67 é utilizada no estabelecimento do prognóstico de diversas neoplasias, uma vez que a expressão de Ki-67 é significativamente maior em células malignas, quando comparadas a células normais (ELY et al., 2017; LI et al., 2015). Em algumas delas, como por exemplo, no tratamento de câncer de mama com tamoxifeno, uma elevada expressão de Ki-67 representa um mau prognóstico e tendência à resistência ao tratamento (ELZAWAHRY et al., 2013). Após o tratamento com a stypoldiona foi observado um aumento de 54 % na expressão da proteína Ki-67 em células MM1.S (Figura 25). Esses resultados corroboram os descritos por Bigolin (2016) que, ao avaliar o efeito da quinona primina em células MM1.S, observou que a mesma não causou bloqueio em nenhuma fase do ciclo celular e apresentou um aumento de 28% no conteúdo de Ki-67. O mesmo composto, ao ser testado em células Jurkat (leucemia aguda de células T) e K562 (leucemia mielóide aguda), causou uma diminuição de 7 % e 44 % no conteúdo de Ki-67, respectivamente (BIGOLIN, 2016). Os resultados de Bigolin (2016), em conjunto com os apresentados neste trabalho, demonstram uma tendência das células MM1.S responderem ao tratamento com um aumento na expressão Ki-67, pois, como visto anteriormente, essa proteína está aumentada na proliferação celular. Segundo a literatura, a resistência ao tratamento em pacientes com MM está mais correlacionada à expressão de P-gp e a produção de IL-6, porém já existem estudos que correlacionam os clones com alta expressão de Ki-67 no MM e com uma baixa resposta ao tratamento e consequente resistência ao mesmo (ALEXANDRAKIS et al., 2004; FORSBERG et al., 2015).

Em neoplasias malignas, as células tumorais proliferam de forma exacerbada e evitam ao máximo os processos de morte celular. A redução na viabilidade das células neoplásicas por compostos e fármacos

ocorre devido a ativação de diversas vias de sinalização que podem levar as células à morte. Conforme citado anteriormente, a apoptose como morte celular regulada é o foco de diversos tratamentos para as neoplasias malignas. A primeira razão é a maior sensibilidade das células tumorais a esse tipo de morte em relação às células não-neoplásicas devido ao estresse gerado no microambiente tumoral diante da privação de nutrientes e à hipóxia. Além disso, a apoptose clássica é considerada um tipo de morte celular não imunogênica e, por este motivo, não afeta os tecidos adjacentes ao gerar um processo inflamatório. Por fim, a indução da apoptose não é uma estratégia específica ao tipo de neoplasia, o que oferece a possibilidade de aplicar o mesmo tratamento em diversos subtipos da doença (LOPEZ; TAIT, 2015; PFEFFER; SINGH, 2018). Assim, a primeira etapa para a elucidação do mecanismo de morte celular da stypoldiona foi a avaliação da apoptose, o que foi realizado por duas metodologias distintas: microscopia de fluorescência com BE/LA e o método da Anexina-V.

A microscopia de fluorescência com BE/LA baseia-se na diferença de permeabilidade dos dois corantes utilizados. O LA é um corante capaz de permear membranas celulares intactas e, uma vez dentro das células, intercala-se ao DNA e gera uma coloração esverdeada. Já o BE não é capaz de permear a membrana íntegra e adentra as células somente quando há uma perda na integridade da membrana. Nesse caso, o corante se intercala ao DNA celular e gera uma coloração alaranjada (RENVOIZÉ et al., 1998). Na Figura 17 é possível observar que as células incubadas com a stypoldiona apresentaram alterações morfológicas quando comparadas ao controle de células sem tratamento. No Painel 17A é possível observar que as células que não foram incubadas com o composto se apresentam viáveis, com coloração verde homogênea. O mesmo pode ser observado com as células incubadas com o veículo (DMSO) (Figura 17B), o que demonstra que o mesmo não causa interferência no processo de morte celular. Já quando as células MM1.S foram tratadas com o com a stypoldiona na sua  $CI_{50}$  de 24 h, pode-se observar sinais de apoptose inicial, como a redução do volume celular e condensação da cromatina, e também de apoptose tardia, sinalizada pela perda de integridade de membrana, o que torna visível a coloração laranja conferida pelo BE (Figura 17C-D).

A externalização dos resíduos de fosfatidilserina ocorre durante o estágio inicial da apoptose quando há a perda de simetria da membrana citoplasmática. Essa é uma etapa essencial no processo apoptótico, pois as células fagocitárias reconhecem a célula apoptótica e engolfam a mesma e a degradam em fagolisossomas (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2018a). A anexina-V é um composto capaz de se ligar aos resíduos de fosfatidilserina e, assim, auxiliar na investigação da apoptose (KOOPMAN et al., 1994). Após o tratamento com a stypoldiona na sua  $CI_{50}$  de 24 h, 52 % das células MM1.S passaram a externalizar resíduos de fosfatidilserina (Figura 18). Esse resultado, em conjunto com os encontrados pela microscopia de fluorescência com BE/LA, sugerem que a stypoldiona causa morte celular por apoptose nas células MM1.S. Porém, outras formas de morte celular não devem ser descartadas. Considerando os resultados apresentados até aqui, a próxima etapa do trabalho foi investigar quais os mecanismos de apoptose, intrínseca e/ou extrínseca, estavam envolvidos nesse processo.

Um passo crítico para o desencadeamento da apoptose intrínseca é a formação de poros na membrana mitocondrial externa. Como citado anteriormente, a mitocôndria é circundada por duas membranas e o espaço intermembrana, o qual é controlado pelo  $\Delta\Psi_m$ . Quando há a permeabilização da membrana mitocondrial externa, ou na presença de algum dano à mitocôndria, há uma diminuição no  $\Delta\Psi_m$  (CZABOTAR et al., 2014; SONG et al., 2015; GALLUZZI et al., 2018). Após a incubação das células MM1.S com a stypoldiona por 24 h na sua  $CI_{50}$ , pôde-se observar uma redução de cerca de 35 % no  $\Delta\Psi_m$ , a qual foi significativa em relação às células sem tratamento (Figura 19). A permeabilização da membrana mitocondrial externa pode ocorrer pela formação de poros na membrana da mitocôndria, em um processo regulado pelas proteínas pró e antiapoptóticas da família Bcl-2. Quando existe uma alteração no equilíbrio da concentração dessas proteínas a favor dos membros pró-apoptóticos, há a formação de poros na membrana externa da mitocôndria o que, além de ocasionar a perda do  $\Delta\Psi_m$ , leva à liberação de componentes que transitam pelo espaço intermembrana, como o citocromo-c, o AIF e a proteína SMAC/Diablo. Essas proteínas, depois de liberadas, contribuem com a formação do apoptossoma e com a

ativação das caspases efetoras (-3, -6 e -7), o que por fim resulta na conclusão da apoptose (GALLUZZI et al., 2018).

Além de causar uma diminuição no  $\Delta\Psi_m$  das células MM1.S, a stypoldiona causou um aumento significativo do conteúdo da proteína pró-apoptótica Bax em relação ao grupo controle, e, isso ocasionou uma relação Bax/Bcl-2 de 1,33, ou seja, houve um aumento da proporção da proteína apoptótica Bax em relação a antiapoptótica Bcl-2, o que favoreceu o estímulo apoptótico (Figura 20). Por fim, sugere-se que a stypoldiona estimula o aumento da liberação de AIF no citoplasma em cerca de 1,5 vezes em relação ao controle (Figura 21). O AIF, após liberado pela mitocôndria, é capaz de se translocar até o núcleo celular, onde pode induzir a condensação da cromatina e fragmentação do DNA de forma independente da ativação de caspases (SEVRIOUKOVA, 2011; BANO; PREHN, 2018). Assim, é possível sugerir que a BANO stypoldiona induz a apoptose intrínseca, com aumento do conteúdo intracelular de Bax, o que leva à redução do  $\Delta\Psi_m$  e à liberação de AIF. Outros relatos na literatura também relacionam a atividade citotóxica de quinonas com a ativação da apoptose intrínseca, inclusive em células MM1.S (BIGOLIN, 2016; 2017; MAIORAL et al., 2018; SANTOS-PIRATH, 2018).

Além da apoptose intrínseca, neste trabalho também foi investigado o envolvimento do efeito citotóxico da stypoldiona com os mecanismos de apoptose extrínseca. A apoptose extrínseca é uma forma de RCD que se inicia por perturbações no microambiente extracelular, e que é detectada a partir de receptores transmembranares, como o FasR. Esse é um receptor de morte que, ao se ligar ao seu ligante específico, forma o complexo DISC em conjunto com a proteína adaptadora FADD e as pró-caspases-8 ou -10. Depois de formado, o complexo DISC ativa as caspases iniciadoras (caspase-8 e -10), as quais são responsáveis pela ativação das caspases efetoras (DICKENS et al., 2016). Como demonstrado na Figura 22, a stypoldiona levou a um aumento de cerca de 1,63 vezes no conteúdo de FasR, o que sugere o envolvimento da apoptose extrínseca no mecanismo de ação desse composto. Esse resultado corrobora outros estudos presentes na literatura, que relatam o envolvimento de quinonas com a apoptose extrínseca e com o aumento do conteúdo de FasR (BIGOLIN, 2016; MAIORAL, 2017; SANTOS-

PIRATH, 2018). Porém, mais estudos são necessários para confirmar o envolvimento da stypoldiona na apoptose extrínseca em células MM1.S.

Como citado anteriormente, a ativação das caspases efetoras é um evento que ocorre tanto nos mecanismos que envolvem a apoptose intrínseca, quanto extrínseca. Após ativadas, as caspases efetoras desencadeiam diversos eventos que levam à mudança na morfologia celular, como os *blebbings* de membrana, a fragmentação do DNA, a exposição dos resíduos de fosfatidilserina e a formação de corpos apoptóticos (LI et al., 1997; JULIEN; WELLS, 2017). Esses eventos foram observados com as células MM1.S tratadas com a stypoldiona (Figura 17), e, além disso, foi observado um aumento de cerca de 1,63 vezes na expressão de caspase-3 ativada nessas células (Figura 23). Em conjunto, esses resultados reforçam a hipótese do envolvimento da apoptose como mecanismo de morte celular causado pelo composto.

A survivina é uma proteína membro da família IAP, capaz de inibir caspases e bloquear o processo de morte celular, superexpressa em diversas neoplasias e está relacionada a diferenciação, a proliferação e a invasão das células tumorais (JAISWAL; GOEL; MITTAL, 2015; CHEN et al., 2016). O efeito da stypoldiona também foi avaliado na expressão da proteína antiapoptótica survivina nas células MM1.S, e, curiosamente, após a incubação das células com o composto foi observada uma redução na expressão de survivina em cerca de 35,5 % das células, e aumento nas 64,5 % restantes, quando comparado ao controle (Figura 24). Esses resultados mostram que a stypoldiona não conseguiu reduzir conteúdo de survivina em uma porcentagem significativa de células, pois mais da metade das células aumentaram o conteúdo da proteína, o que sugere o envolvimento dos mecanismos de resistência das células. No entanto, mesmo diante das tentativas das células MM1.S em desencadear mecanismos de resistência ao tratamento com a stypoldiona, como o aumento do conteúdo de survivina e Ki-67, tais eventos não impediram o composto de induzir a morte celular nas células de MM.

Além dos resultados citados, como pode ser observado na Figura 26, a stypoldiona também causou aumento na produção de EROs de  $4.97 \pm 0.24$  U.A., o que indica o envolvimento da *o*-quinona no ciclo redox das células MM1.S esteja relacionado ao mecanismo de ação citotóxica do

composto. Como citado anteriormente, baixas concentrações de EROs podem levar à ativação de vias de sobrevivência celular, como a via do Nrf2 (fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2), bem como contribuir com a proliferação celular, tanto em condições fisiológicas quanto em células neoplásicas (COVARRUBIAS et al., 2008; REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016). No entanto, altas concentrações de EROs podem ocasionar a sinalização de vias de morte celular, como a apoptose, necroptose, ferroptose, entre outras (AMRI et al., 2017; RADOGNA et al., 2016; RAVIDRAN et al., 2011). Atualmente, investiga-se também uma forma de morte celular independente de caspases e não inflamatória induzida por EROs, denominada previamente de “oxeiptose” (HOLZE et al., 2018; SCATURRO; PICHLMAIR, 2018; SCATURRO; PICHLMAIR, 2019).

Dentro da morte celular apoptótica, as EROs podem tanto estimular a apoptose intrínseca, quanto a extrínseca. Na apoptose extrínseca, as EROs podem levar à despolarização da membrana externa mitocondrial e/ou a formação de poros via Bax e Bak. Além disso, as EROs podem causar dano direto ao DNA nuclear e mitocondrial (ORRENIUS; GOGVADZE; ZHIVOTOVSKY, 2015; REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016). O peróxido de hidrogênio e ânion superóxido também podem causar a liberação de citocromo c do espaço intermembrana da mitocondrial, o que além de desencadear a apoptose intrínseca leva à ruptura da cadeia transportadora de elétrons e gera ainda mais EROs (CIRCU; AW, 2010; MADESH; HAJNÓCZKY, 2001; REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016). Nos mecanismos de sinalização da apoptose extrínseca, as EROs podem ativar receptores de morte transmembrana, como Fas, TRAIL-R1/2 e TNF-R1 (BLASER et al., 2016; PALLEPATI; AVERILL-BATES, 2011).

Por fim, avaliou-se o efeito da stypoldiona nas vias do fator de transcrição NF- $\kappa$ B e PI3K/Akt/mTOR, que como já citado, encontram-se ativadas de forma constitutiva nas células de pacientes com MM e contribuem para o desenvolvimento da doença e resistência a diversos tratamentos (DURONIO, 2008; ROY; SARKAR; BASAK, 2018). Como mostra a Figura 27, após o tratamento das células MM1.S com o composto na sua  $CI_{50}$  de 24 h, foi possível observar uma redução tanto do conteúdo de NF- $\kappa$ B quanto de Akt e pAkt, o que sugere a ação da stypoldiona nas duas vias. Ao avaliar a relação Akt/pAkt, porém, não foi

observada diferença significativa quando comparada ao grupo controle (células sem tratamento), o que sugere que a stypoldiona não esteja inibindo diretamente a fosforilação de Akt, mas sim a quantidade total da proteína ou, ainda, alguma outra proteína acima da via PI3K/Akt/mTOR. Já existem tratamentos para o MM que têm a via do NF- $\kappa$ B como alvo, como, por exemplo o bortezomibe. Porém, como efeito colateral desse tratamento ocorre o aumento na expressão de Akt, o que colabora com a resistência ao tratamento (MIMURA et al., 2014). Além disso, a doxorrubicina, também utilizada no tratamento de MM, causa aumento do conteúdo de NF- $\kappa$ B, outro evento que também está relacionado a mecanismos de resistência (HAJRA et al., 2018). Diante disso, compostos como a stypoldiona podem ser utilizados em combinação com esses fármacos com a finalidade de diminuir a resistência ao tratamento e melhorar sua efetividade.

A atividade do NF- $\kappa$ B é regulada pelas proteínas I $\kappa$ B que podem ser fosforiladas e conduzidas a degradação proteossomal pelos complexos IKK, o que resulta na liberação do fator de transcrição, que se transloca até o núcleo da célula e estimula a transcrição gênica (ZHANG; LENARDO; BALTIMORE, 2017). Quinases como os complexos IKK são atrativos para quinonas eletrofílicas, o que pode levar à inibição dessa via. A 1,2-naftoquinona e a  $\beta$ -lapachona, por exemplo, inibem a fosforilação de I $\kappa$ B pelo complexo IKK e levam à uma redução no conteúdo de NF- $\kappa$ B (DONG et al., 2010; SUMI et al., 2010). Também existem relatos da inibição da via do NF- $\kappa$ B pela antraquinona denbinobina, causada pela modulação de IKK em células de leucemias humanas, e do efeito do catecol piceatannol, que quando oxidado à uma *o*-quinona tem como alvo a cisteína 179 do complexo IKK (BOLTON; DUNLAP, 2017; LIU et al., 2014; SON et al., 2010).

A ativação constitutiva de Akt é reconhecida como um sinal oncogênico presente no MM e está envolvida com o estímulo à proliferação celular e a resistência à apoptose como, por exemplo, pela inibição de proteínas pró-apoptóticas como a proteína BAD e estímulo à proteínas antiapoptóticas como a proteína Mcl-1 (LEHNERS et al., 2018; REN et al., 2013; SHE et al., 2005; ZHAO et al., 2007). Assim, a inibição de Akt resulta na ativação de vias apoptóticas (HUANG et al., 2012;

ZHANG et al., 2014). Como a via da Akt é altamente relacionada com o desenvolvimento de resistência ao tratamento, inclusive com doxorrubicina e bortezomibe, já é relatado na literatura o efeito sinérgico de inibidores dessa via com quimioterápicos (CAI et al., 2019; GAGNON et al., 2008; XINQUN et al., 2005; YU et al., 2008). Nesse contexto, a inibição de Akt aumenta a sensibilidade das células à doxorrubicina, como observado no estudo de Cai e colaboradores (2019), que relatou o efeito da costunolida em conjunto com a doxorrubicina sobre células K562 e K562/ADR, que é uma variante da primeira linhagem, pois possui resistência à andriamicina e a diversos outros fármacos. Nesse estudo, foi observado um aumento da sensibilidade das células K562 à doxorrubicina, após o tratamento com a costunolida, mesmo na linhagem multi-resistente (CAI et al., 2019). Além disso, também são relatados os efeitos de fármacos inibidores de Akt em conjunto com o uso do bortezomibe em células de MM, o que aumenta a efetividade do tratamento e reduz a resistência a terapia (MIMURA et al., 2014).

Já existem relatos do efeito de quinonas na inibição de Akt, como por exemplo o estudo de Toral-Barza e colaboradores, que avaliaram o efeito da piranaptoquinona (PNQ) e seus análogos na inibição dessa proteína. A partir desse estudo, foi sugerido que o mecanismo de ação da PNQ na inibição de Akt dá-se pela alquilação biorredutora do composto e pela interação com resíduos de cisteína (310 e 296) presentes na proteína, os quais são encontrados na alça de ativação da Akt1 (SALASKI et al., 2009; TORAL-BARZA et al., 2007). Acredita-se que essa alquilação ocorra de acordo com o que foi proposto por Moore em 1977, que observou que diversas quinonas, após sua redução *in vivo* à hidroquinona, podem formar um intermediário reativo e assim alquilar sítios nucleofílicos, como, por exemplo, os resíduos de cisteína da Akt (MOORE, 1977; NITULESCU et al., 2015; SALASKI et al., 2009). Já existem, inclusive, estudos pré-clínicos e clínicos de inibidores dessa via para o tratamento do MM (SPENCER et al., 2014; STÜHMER et al., 2012).

Assim, diante dos resultados apresentados, que demonstram a capacidade da stypoldiona na indução de morte celular por apoptose em células MM1.S e seu envolvimento em diversas vias relacionadas ao desenvolvimento da doença e resistência ao tratamento, como a via do NF- $\kappa$ B e da via PI3K/Akt/mTOR, sugere-se que a *o*-quinona avaliada

neste estudo seja um bom candidato ao estudo de novos fármacos para o tratamento do MM, inclusive em formas mais resistentes da doença.

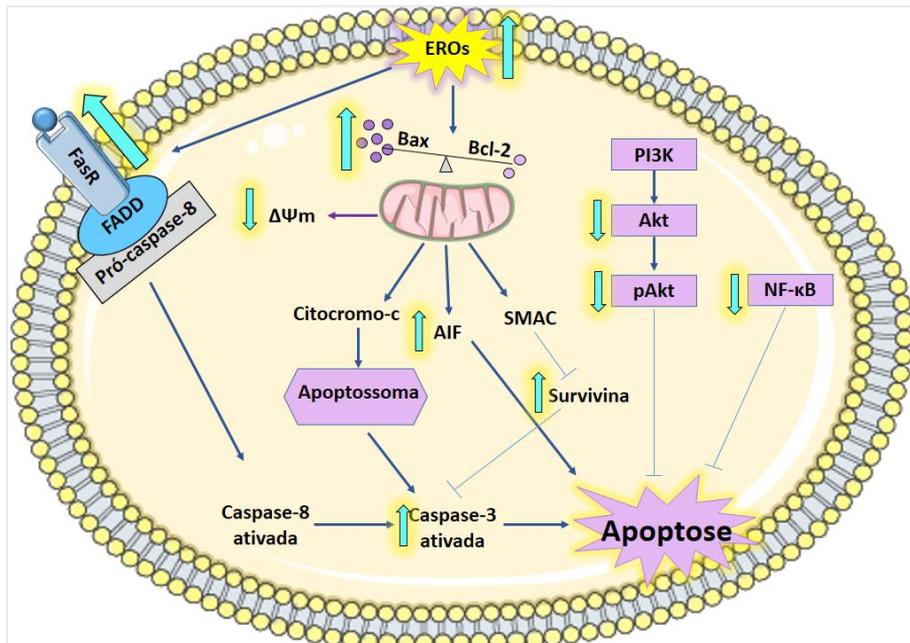
## 7 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo permitem concluir que:

- A stypoldiona foi citotóxica para as células MM1.S de forma dependente da concentração e do período de incubação, com valores de  $CI_{50}$  de 24 h inferiores a 6  $\mu$ M e de 48 e 72 h inferiores a 3  $\mu$ M.
- A stypoldiona foi 2,3 vezes mais citotóxica para as células de MM em comparação às PBMCs isoladas de indivíduos saudáveis e não apresentou efeito hemolítico mesmo em concentração 10 vezes superior à  $CI_{50}$  de 24 h na linhagem MM1.S.
- O composto não causou bloqueio significativo nas fases do ciclo celular das células MM1.S.
- A morte celular causada pela stypoldiona foi sugestiva de apoptose, pois apresentou alterações morfológicas sugestivas de apoptose por microscopia de fluorescência, e causou aumento da externalização dos resíduos de fosfatidilserina.
- A stypoldiona levou à ativação da apoptose intrínseca e extrínseca, com aumento de FasR e Bax, redução do  $\Delta\psi_m$ , e liberação de AIF, além do aumento de caspase-3 ativada.
- O composto também causou aumento da expressão da proteína antiapoptótica survivina e do marcador de proliferação celular Ki-67.
- Foi observada ainda uma redução de NF- $\kappa$ B, Akt e pAkt após incubação com a stypoldiona, o que sugere o envolvimento dessas vias na indução da morte celular causada pelo composto.

Em resumo, o presente estudo permite sugerir que o mecanismo de ação da stypoldiona em células MM1.S envolva a produção de EROs e a ativação da apoptose intrínseca e extrínseca, com aumento de FasR e Bax e a inversão dos membros pró-apoptóticos (Bcl-2) e antiapoptóticos (Bax) da família Bcl-2, o que leva à redução do  $\Delta\psi_m$ , e, à consequente liberação de AIF, além do aumento de caspase-3 ativada (Figura 28). Também está envolvida no mecanismo de ação proposto a inibição das vias NF- $\kappa$ B e PI3K/Akt/mTOR.

Figura 28 Esquema ilustrativo do mecanismo de ação da stypoldiona em células MM1.S



## 8 PERSPECTIVAS

- Avaliar o efeito citotóxico da stypoldiona em outras células de linhagem de MM, como as células MM1.R, resistentes à dexametasona.
- Avaliar o efeito da stypoldiona na atividade de proteínas de resistência, como a P-gp.
- Avaliar a citotoxicidade da stypoldiona em células de estroma de medula óssea, devido a sua contribuição com a manutenção do microambiente pró-inflamatório e resistência ao tratamento.
- Avaliar o possível sinergismo da stypoldiona com fármacos já utilizados no tratamento do MM como o bortezomibe e a doxorubicina
- Analisar o efeito citotóxico da stypoldiona *ex vivo* em amostras de MO de pacientes portadores de MM.

## REFERÊNCIAS

ABRAHAM, J.; SALAMA, N. N.; AZAB, A. K. The role of P-glycoprotein in drug resistance in multiple myeloma. **Leuk Lymphoma**, v. 56, n. 1, p. 26-33, Jan 2015.

AGGARWAL, B. B.; GUPTA, S. C.; KIM, J. H. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. **Blood**, v. 119, n. 3, p. 651-65, Jan 19 2012.

ALBERTS *et al.* Replicação, Reparo e Recombinação do DNA. In: **Biologia Molecular da Célula**. 5ª ed. Artmed, São Paulo, 2010. Cap. 5, p. 285.

ALEXANDRAKIS, M. G. *et al.* Ki-67 proliferation index: correlation with prognostic parameters and outcome in multiple myeloma. **Am J Clin Oncol**, v. 27, n. 1, p. 8-13, Feb 2004.

AMAGATA, T. *et al.* Exploring Sponge-Derived Terpenoids for Their Potency and Selectivity against 12-Human, 15-Human, and 15-Soybean Lipoxygenases. January 18, 2003.

AMRI, F. *et al.* Neuroglobin protects astroglial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress and apoptotic cell death. **J Neurochem**, v. 140, n. 1, p. 151-169, Jan 2017

ARUP K. GHOSE; VELLARKAD N. VISWANADHAN, A.; WENDOLOSKI, J. J. A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases. December 18, 1998.

ATTAL, M. *et al.* Lenalidomide maintenance after stem-cell transplantation for multiple myeloma. **N Engl J Med**, v. 366, n. 19, p. 1782-91, May 2012.

ATTAL, M.; HAROUSSEAU, J. L. Standard therapy versus autologous transplantation in multiple myeloma. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 11, n. 1, p. 133-46, Feb 1997.

BAELL, J. B.; HOLLOWAY, G. A. New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. **J Med Chem**, v. 53, n. 7, p. 2719-40, Apr 2010.

BAI, D.; UENO, L.; VOGT, P. K. Akt-mediated regulation of NF $\kappa$ B and the essentialness of NF $\kappa$ B for the oncogenicity of PI3K and Akt. **Int J Cancer**, v. 125, n. 12, p. 2863-70, Dec 15 2009.

BANO, D.; PREHN, J. H. Apoptosis-Inducing Factor (AIF) in Physiology and Disease: The Tale of a Repented Natural Born Killer. In: (Ed.). **EBioMedicine**, v.30, 2018. p.29-37.

BAO, L. *et al.* Increased expression of P-glycoprotein is associated with doxorubicin chemoresistance in the metastatic 4T1 breast cancer model. **Am J Pathol**, v. 178, n. 2, p. 838-52, Feb 2011.

BERGSAGEL, P. L. Where we were, where we are, where we are going: progress in multiple myeloma. **Am Soc Clin Oncol Educ Book**, p. 199-203, 2014.

BIGOLIN, A. Investigação do mecanismo de morte celular induzido por compostos em células de linhagens de neoplasias hematológicas. 2016. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BISHAYEE, A.; SETHI, G. Bioactive natural products in cancer prevention and therapy: Progress and promise. **Semin Cancer Biol**, v. 40-41, p. 1-3, Oct 2016.

BLASER, H. *et al.* TNF and ROS Crosstalk in Inflammation. **Trends Cell Biol**, v. 26, n. 4, p. 249-261, Apr 2016.

BODET, L. *et al.* ABT-737 is highly effective against molecular subgroups of multiple myeloma. **Blood**, v. 118, n. 14, p. 3901-10, Oct 6 2011.

BOLTON, J. L.; DUNLAP, T. Formation and Biological Targets of Quinones: Cytotoxic versus Cytoprotective Effects. **Chem Res Toxicol**, v. 30, n. 1, p. 13-37, Jan 2017

BOLTON, J. L.; DUNLAP, T. L.; DIETZ, B. M. Formation and biological targets of botanical o-quinones. **Food Chem Toxicol**, v. 120, p. 700-707, Oct 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 708, 06 de agosto de 2015. Aprova as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Mieloma Múltiplo. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2015. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/agosto/07/VERS--O-PARA-SITE---MINUTA-de-Portaria-SAS-DDT-Mieloma-M--ltiplo-30-07-2015--2-.pdf>. Acesso em: 11/12/2018.

BRENK, R. *et al.* Lessons learnt from assembling screening libraries for drug discovery for neglected diseases. **ChemMedChem**, v. 3, n. 3, p. 435-44, Mar 2008.

BRINGHEN, S.; DE WIT, E.; DIMOPOULOS, M. A. New Agents in Multiple Myeloma: An Examination of Safety Profiles. **Clin Lymphoma Myeloma Leuk**, v. 17, n. 7, p. 391-407.e5, Jul 2017.

BRUINS, J. J.; ALBADA, B.; VAN DELFT, F. ortho-Quinones and Analogues Thereof: Highly Reactive Intermediates for Fast and Selective Biofunctionalization. **Chemistry**, v. 24, n. 19, p. 4749-4756, Apr 2018.

CAI, H. *et al.* Costunolide enhances sensitivity of K562/ADR chronic myeloid leukemia cells to doxorubicin through PI3K/Akt pathway. **Phytother Res**, Apr 2019.

CALLERA, F. *et al.* Oncohematological diseases in the Vale do Paraíba, State of São Paulo: demographic aspects, prevalences and incidences. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 33, n. 2, p. 120-5, 2011.

CALLERA, F. *et al.* Survival of patients diagnosed with subsets of lymphoid neoplasms and acute myeloid leukemia from 2000 to 2010 in the Vale do Paraíba, State of São Paulo are we going the right way? **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 34, n. 2, p. 168-70, 2012.

CHEN, X. *et al.* Survivin and Tumorigenesis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. **J Cancer**, v. 7, n. 3, p. 314-23, 2016.

CHILD, J. A. *et al.* High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. **N Engl J Med**, v. 348, n. 19, p. 1875-83, May 8 2003.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radic Biol Med**, v. 48, n. 6, p. 749-62, Mar 15 2010.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 829-37, Dec 16 2004.

COVARRUBIAS, L. *et al.* Function of reactive oxygen species during animal development: passive or active? **Dev Biol**, v. 320, n. 1, p. 1-11, Aug 1 2008.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. **Chem Rev**, v. 109, n. 7, p. 3012-43, Jul 2009.

CRAGG, G. M.; PEZZUTO, J. M. Natural Products as a Vital Source for the Discovery of Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents. In: (Ed.). **Med Princ Pract**, v.25, 2016.

CZABOTAR, P. E. *et al.* Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 15, n. 1, p. 49-63, Jan 2014.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Sci Rep**, v. 7, p. 42717, Mar 3 2017.

DEBERARDINIS, R. J.; CHANDEL, N. S. Fundamentals of cancer metabolism. In: (Ed.). **Sci Adv**, v.2, 2016.

DI MARZO, L. *et al.* Microenvironment drug resistance in multiple myeloma: emerging new players. **Oncotarget**, v. 7, n. 37, p. 60698-60711, Sep 13 2016.

DI, L. The role of drug metabolizing enzymes in clearance. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v. 10, n. 3, p. 379-93, Mar 2014.

DICKENS, L. S. *et al.* A death effector domain chain DISC model reveals a crucial role for caspase-8 chain assembly in mediating apoptotic cell death. **Mol Cell**, v. 47, n. 2, p. 291-305, Jul 27 2012.

DOLLOFF, N. G. Emerging Therapeutic Strategies for Overcoming Proteasome Inhibitor Resistance. **Adv Cancer Res**, v. 127, p. 191-226, 2015.

DONG, G. Z. *et al.* Beta-lapachone suppresses radiation-induced activation of nuclear factor-kappaB. **Exp Mol Med**, v. 42, n. 5, p. 327-34, May 31 2010.

DONKENA, K. V.; YOUNG, C. Y.; TINDALL, D. J. Oxidative stress and DNA methylation in prostate cancer. **Obstet Gynecol Int**, v. 2010, p. 302051, 2010.

DUMONTET, C.; JORDAN, M. A. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. **Nat Rev Drug Discov**, v. 9, n. 10, p. 790-803, Oct 2010.

DURIE, B. G. *et al.* Bortezomib with lenalidomide and dexamethasone versus lenalidomide and dexamethasone alone in patients with newly diagnosed myeloma without intent for immediate autologous stem-cell transplant (SWOG S0777): a randomised, open-label, phase 3 trial. **Lancet**, v. 389, n. 10068, p. 519-527, Feb 4 2017.

DURONIO, V. The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. **Biochem J**, v. 415, n. 3, p. 333-44, Nov 1 2008.

EGAN, W. J.; MERZ, K. M.; BALDWIN, J. J. Prediction of drug absorption using multivariate statistics. **J Med Chem**, v. 43, n. 21, p. 3867-77, Oct 2000.

ELING, N. *et al.* Identification of artesunate as a specific activator of ferroptosis in pancreatic cancer cells. **Oncoscience**, v. 2, n. 5, p. 517-32, 2015.

ELY, S. *et al.* Cellular Proliferation by Multiplex Immunohistochemistry Identifies High-Risk Multiple Myeloma in Newly Diagnosed, Treatment-Naive Patients. **Clin Lymphoma Myeloma Leuk**, v. 17, n. 12, p. 825-833, Dec 2017.

ELZAWAHRY, H. M. *et al.* Role of Ki67 in predicting resistance to adjuvant tamoxifen in postmenopausal breast cancer patients. **J Egypt Natl Canc Inst**, v. 25, n. 4, p. 181-91, Dec 2013.

FAIRFIELD, H. *et al.* Multiple myeloma in the marrow: pathogenesis and treatments. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1364, p. 32-51, Jan 2016.

FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. **Infect Immun**, v. 73, n. 4, p. 1907-16, Apr 2005.

FORSBERG, P. A. *et al.* Rising Plasma Cell Proliferation By Ki67/CD138 Ratio at Relapse Is a Marker of High Risk Disease in Multiple Myeloma. **Blood**, v. 126, 2015.

FUCHS, Y.; STELLER, H. Programmed cell death in animal development and disease. **Cell**, v. 147, n. 4, p. 742-58, Nov 11 2011.

FURUKAWA, Y.; KIKUCHI, J. Molecular pathogenesis of multiple myeloma. **Int J Clin Oncol**, v. 20, n. 3, p. 413-22, Jun 2015.

GABRIELLI, B.; BROOKS, K.; PAVEY, S. Defective Cell Cycle Checkpoints as Targets for Anti-Cancer Therapies. **Front Pharmacol**, v. 3, 2012.

GAGNON, V. *et al.* Akt and XIAP regulate the sensitivity of human uterine cancer cells to cisplatin, doxorubicin and taxol. **Apoptosis**, v. 13, n. 2, p. 259-71, Feb 2008.

GALADARI, S. *et al.* Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? **Free Radic Biol Med**, v. 104, p. 144-164, Mar 2017.

GALLUZZI, L. *et al.* Autophagy in malignant transformation and cancer progression. **Embo j**, v. 34, n. 7, p. 856-80, Apr 1 2015.

GALLUZZI, L. *et al.* Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. **Cell Death Differ**, v. 14, n. 7, p. 1237-43, Jul 2007.

GALLUZZI, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death Differ**, v. 25, n. 3, p. 486-541, Mar 2018.

GERWICK, W. H.; FENICAL, W. Ichthyotoxic and Cytotoxic Metabolites of the Tropical Brown Alga *Styopodium zonale* (Lamouroux) Papenfuss. **J. Org. Chem.**, v. 46, p. 22-27. May 1981.

GFELLER, D. *et al.* SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules. **Nucleic Acids Res**, v. 42, n. Web Server issue, p. W32-8, Jul 2014.

GIBERT, B.; MEHLEN, P. Dependence Receptors and Cancer: Addiction to Trophic Ligands. **Cancer Res**, v. 75, n. 24, p. 5171-5, Dec 2015.

GILMORE, T. D. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. **Oncogene**, v. 25, n. 51, p. 6680-4, Oct 2006.

GOLDSCHNEIDER, D.; MEHLEN, P. Dependence receptors: a new paradigm in cell signaling and cancer therapy. **Oncogene**, v. 29, n. 13, p. 1865-82, Apr 2010.

GONG, J. N. *et al.* Hierarchy for targeting prosurvival BCL2 family proteins in multiple myeloma: pivotal role of MCL1. **Blood**, v. 128, n. 14, p. 1834-1844, Oct 6 2016.

GONSALVES, W. I. *et al.* Prognostic Significance of Quantifying Circulating Plasma Cells in Multiple Myeloma. **Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia**, v. 14, Sep. 2014.

GORGUN, G. T. *et al.* Tumor-promoting immune-suppressive myeloid-derived suppressor cells in the multiple myeloma microenvironment in humans. **Blood**, v. 121, n. 15, p. 2975-87, Apr 11 2013.

GREEN, D. R. *et al.* Immunogenic and tolerogenic cell death. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 5, p. 353-63, May 2009.

GUGLIELMI, V. *et al.* Bortezomib-Induced Muscle Toxicity in Multiple Myeloma. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 76, n. 7, p. 620-630, Jul 01 2017.

HAJRA, S. *et al.* Indole-3-Carbinol (I3C) enhances the sensitivity of murine breast adenocarcinoma cells to doxorubicin (DOX) through inhibition of NF-kappabeta, blocking angiogenesis and regulation of mitochondrial apoptotic pathway. **Chem Biol Interact**, v. 290, p. 19-36, Jun 25 2018.

HAN, D.; WILLIAMS, E.; CADENAS, E. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. **Biochem J**, v. 353, n. Pt 2, p. 411-6, Jan 15 2001.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 2011.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 2000.

HAY, M. *et al.* Clinical development success rates for investigational drugs. **Nat Biotechnol**, v. 32, n. 1, p. 40-51, Jan 2014.

HIDESHIMA, T. *et al.* p38 MAPK inhibition enhances PS-341 (bortezomib)-induced cytotoxicity against multiple myeloma cells. **Oncogene**, v. 23, n. 54, p. 8766-76, Nov 18 2004.

HIDESHIMA, T. *et al.* Perifosine, an oral bioactive novel alkylphospholipid, inhibits Akt and induces in vitro and in vivo cytotoxicity in human multiple myeloma cells. **Blood**, v. 107, n. 10, p. 4053-62, May 15 2006.

HOESEL, B.; SCHMID, J. A. The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. In: (Ed.). **Mol Cancer**, v.12, 2013. p.86.

HOIJAT-FARSANGI, M. Novel and emerging targeted-based cancer therapy agents and methods. **Tumour Biology**, v. 36, n. 2, p.543-546, 2015.

HOLZE, C. *et al.* Oxeiptosis, a ROS-induced caspase-independent apoptosis-like cell-death pathway. *Nature Immunology*, v. 19, n. 2, p. 130, Dec 2018.

HUANG, Y. *et al.* Down-regulation of the PI3K/Akt signaling pathway and induction of apoptosis in CA46 Burkitt lymphoma cells by baicalin. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 31, n. 1, p. 48, May 2012.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/estimativa-2018.pdf>. Acesso em 08/01/19.

JACOBS S. R. *et al.* SOME PHARMACOLOGICAL OBSERVATIONS ON MARINE NATURAL PRODUCTS. **Tetrahedron**, v. 41, n. 6, p. 981-984. 1985.

JAISSWAL, P. K.; GOEL, A.; MITTAL, R. D. Survivin: A molecular biomarker in cancer. **Indian J Med Res**, v. 141, n. 4, p. 389-97, Apr 2015.

JIMENEZ, P. C.; WILKE, D. V.; COSTA-LOTUFO, L. V. Marine drugs for cancer: surfacing biotechnological innovations from the oceans. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 73, n. suppl 1, p. e482s, Aug 20 2018.

JULIEN, O.; WELLS, J. A. Caspases and their substrates. **Cell Death Differ**, v. 24, n. 8, p. 1380-1389, Aug 2017.

KUEHL, W. M.; BERGSAGEL, P. L. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 3, p. 175-87, Mar 2002.

KUMAR, S. *et al.* Trisomies in multiple myeloma: impact on survival in patients with high-risk cytogenetics. **Blood**, v. 119, n. 9, p. 2100-5, Mar 2012.

KUMAR, S. K. *et al.* Multiple myeloma. **Nat Rev Dis Primers**, v. 3, p. 17046, Jul 2017a.

KUMAR, S. K. *et al.* Natural history of relapsed myeloma, refractory to immunomodulatory drugs and proteasome inhibitors: a multicenter IMWG study. **Leukemia**, v. 31, n. 11, p. 2443-2448, Nov 2017b.

KUMAR, S. K. *et al.* NCCN Guidelines Insights: Multiple Myeloma, Version 3.2018. **J Natl Compr Canc Netw**, v. 16, n. 1, p. 11-20, Jan 2018.

KUMAR, V; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. Cell Injury, Cell Death, and Adaptations. In: KUMAR, V; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins Basic Pathology**. 10th ed. Philadelphia: Elsevier, 2018a. Chap. 2, p. 31-56.

KUMAR, V; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. Neoplasia. In: KUMAR, V; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins Basic Pathology**. 10th ed. Philadelphia: Elsevier, 2018b. Chap. 6, p. 189-242.

KUMARI, S. *et al.* Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival. In: (Ed.). **Biomark Insights**, v.13, 2018.

LANDOWSKI, T. H. *et al.* Cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) is associated with activation of NF-. **Oncogene**, v. 22, n. 16, p. 2417, 2003.

LEHNERS, N. *et al.* Profiling of Oncogenic Signaling in Multiple Myeloma — Association with Biology, Disease Progression and Prognosis. **Blood**, v. 132, 2018.

LEVY, J. M. M.; TOWERS, C. G.; THORBURN, A. Targeting autophagy in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 17, n. 9, p. 528-542, Sep 2017.

LI, H. *et al.* Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. **Cell**, v. 94, n. 4, p. 491-501, Aug 21 1998.

LI, L. T. *et al.* Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). **Mol Med Rep**, v. 11, n. 3, p. 1566-72, Mar 2015.

LI, P. *et al.* Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 479-89, Nov 14 1997.

LI, X. *et al.* Differential responses to doxorubicin-induced phosphorylation and activation of Akt in human breast cancer cells. **Breast Cancer Research**, v. 7, n. 5, May 2005.

LIAO, A. *et al.* Autophagy induced by FTY720 promotes apoptosis in U266 cells. **Eur J Pharm Sci**, v. 45, n. 5, p. 600-5, Apr 11 2012.

LIPCHICK, B. C.; FINK, E. E.; NIKIFOROV, M. A. Oxidative Stress and Proteasome Inhibitors in Multiple Myeloma. **Pharmacol Res**, v. 105, p. 210-5, Mar 2016.

LIPINSKI, C. A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 46, n. 1-3, p. 3-26, Mar 2001.

LIU, L. *et al.* Piceatannol inhibits phorbol ester-induced expression of COX-2 and iNOS in HR-1 hairless mouse skin by blocking the activation of NF-kappaB and AP-1. **Inflamm Res**, v. 63, n. 12, p. 1013-21, Dec 2014.

LOPEZ, J.; TAIT, S. W. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. **Br J Cancer**, v. 112, n. 6, p. 957-62, Mar 17 2015.

LU, C. *et al.* Investigation of drug-drug interaction potential of bortezomib in vivo in female Sprague-Dawley rats and in vitro in human liver microsomes. **Drug Metab Dispos**, v. 34, n. 4, p. 702-8, Apr 2006.

LU, J. J. *et al.* Quinones derived from plant secondary metabolites as anti-cancer agents. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 13, n. 3, p. 456-63, Mar 2013.

MADESH, M.; HAJNOCZKY, G. VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release. **J Cell Biol**, v. 155, n. 6, p. 1003-15, Dec 10 2001.

MAES, A. *et al.* The therapeutic potential of cell cycle targeting in multiple myeloma. **Oncotarget**, v. 8, n. 52, p. 90501-20, 2017.

MAES, A. *et al.* The therapeutic potential of cell cycle targeting in multiple myeloma. **Oncotarget**, v. 8, n. 52, p. 90501-90520, Oct 27 2017.

MAIORAL, M. F. *et al.* MICONIDINE acetate, a new selective and cytotoxic compound with synergic potential, induces cell cycle arrest and apoptosis in leukemia cells. **Invest New Drugs**, Dec 19 2018.

MAIORAL, M. F. *et al.* Molecular Cytotoxic Mechanisms of 1-(3,4,5-Trihydroxyphenyl)-dodecylbenzoate in Human Leukemia Cell Lines. **Indian J Pharm Sci**, v. 78, n. 1, p. 120-8, 2016.

MANIKANDAN, P.; NAGINI, S. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. **Curr Drug Targets**, v. 19, n. 1, p. 38-54, 2018.

MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 2, p. 143-8, Feb 2002.

MANNING, B. D.; TOKER, A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. **Cell**, v. 169, n. 3, p. 381-405, Apr 20 2017.

MATSUI, W. H. Cancer stem cell signaling pathways. **Medicine (Baltimore)**, v. 95, n. 1 Suppl 1, p. S8-s19, Sep 2016.

MATTHEWS, G. M. *et al.* NF-kappaB dysregulation in multiple myeloma. **Semin Cancer Biol**, v. 39, p. 68-76, Aug 2016.

MCCARTHY, P. L. *et al.* Lenalidomide after stem-cell transplantation for multiple myeloma. **N Engl J Med**, v. 366, n. 19, p. 1770-81, May 2012.

MCCARTHY, P. L. *et al.* Lenalidomide Maintenance After Autologous Stem-Cell Transplantation in Newly Diagnosed Multiple Myeloma: A Meta-Analysis. **J Clin Oncol**, v. 35, n. 29, p. 3279-3289, Oct 2017.

MCDONNELL, A. M.; DANG, C. H. Basic Review of the Cytochrome P450 System. **J Adv Pract Oncol**, v. 4, n. 4, p. 263-8, Aug 2013.

MIMURA, N. *et al.* Selective and potent Akt inhibition triggers anti-myeloma activities and enhances fatal endoplasmic reticulum stress induced by proteasome inhibition. **Cancer Res**, v. 74, n. 16, p. 4458-69, Aug 15 2014.

MIMURA, N. *et al.* Selective and potent Akt inhibition triggers anti-myeloma activities and enhances fatal endoplasmic reticulum stress induced by proteasome inhibition. **Cancer Res**, v. 74, n. 16, p. 4458-69, Aug 15 2014.

MOLDOVEANU, T. *et al.* Many players in BCL-2 family affairs. **Trends Biochem Sci**, v. 39, n. 3, p. 101-11, Mar 2014.

MONKS, T. J. *et al.* Quinone chemistry and toxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 112, n. 1, p. 2-16, Jan 1992.

MOORE, H. W. Bioactivation as a model for drug design bioreductive alkylation. **Science**, v. 197, n. 4303, p. 527-32, Aug 1977.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 16 1983.

MUEGGE, I.; HEALD, S. L.; BRITTELLI, D. Simple selection criteria for drug-like chemical matter. **J Med Chem**, v. 44, n. 12, p. 1841-6, Jun 2001.

MUSGROVE, E. A. *et al.* Cyclin D as a therapeutic target in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 11, n. 8, p. 558-72, Jul 7 2011.

NARANG, V. S. *et al.* Dexamethasone increases expression and activity of multidrug resistance transporters at the rat blood-brain barrier. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 295, n. 2, p. C440-50, 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **J Nat Prod**, v. 79, n. 3, p. 629-61, Mar 2016.

NITULESCU, G. M. *et al.* Akt inhibitors in cancer treatment: The long journey from drug discovery to clinical use (Review). **International Journal of Oncology**, v. 48, n. 3, p. 869-885, 2015.

OBERST, A. *et al.* Inducible dimerization and inducible cleavage reveal a requirement for both processes in caspase-8 activation. **J Biol Chem**, v. 285, n. 22, p. 16632-42, May 28 2010.

O'BRIEN, E. T. *et al.* Mechanism of action of the marine natural product stypoldione: evidence for reaction with sulfhydryl groups. **J Med Chem**, v. 29, n. 10, p. 1851-5, Oct 1986.

O'BRIEN, E. T. *et al.* Pharmacological properties of a marine natural product, stypoldione, obtained from the brown alga *Styopodium zonale*. **Hydrobiologia**, v. 116/117, p. 141-144, 1984.

O'BRIEN, E. T. *et al.* Selective inhibition of cytokinesis in sea urchin embryos by low concentrations of stypoldione, a marine natural product that reacts with sulfhydryl groups. **Mol Pharmacol**, v. 35, n. 5, p. 635-42, May 1989.

O'BRIEN, E. T.; JACOBS, R. S.; WILSON, L. Inhibition of bovine brain microtubule assembly in vitro by stypoldione. **Mol Pharmacol**, v. 24, n. 3, p. 493-9, Nov 1983.

O'CONNOR, R. *et al.* The interaction of bortezomib with multidrug transporters: implications for therapeutic applications in advanced multiple myeloma and other neoplasias. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 71, n. 5, p. 1357-68, May 2013.

ORAFAT, A.; MATIN, M. M.; SADEGHIAN, H. The importance of 15-lipoxygenase inhibitors in cancer treatment. **Cancer Metastasis Rev**, v. 37, n. 2-3, p. 397-408, Sep 2018.

ORRENIUS, S.; GOGVADZE, V.; ZHIVOTOVSKY, B. Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 460, n. 1, p. 72-81, Apr 24 2015.

OTTAVIANI, G. *et al.* What is modulating solubility in simulated intestinal fluids? **Eur J Pharm Sci**, v. 41, n. 3-4, p. 452-7, Nov 20 2010.

PALLEPATI, P.; AVERILL-BATES, D. A. Mild thermotolerance induced at 40 degrees C protects HeLa cells against activation of death receptor-mediated apoptosis by hydrogen peroxide. **Free Radic Biol Med**, v. 50, n. 6, p. 667-79, Mar 15 2011.

PALUMBO, A. *et al.* International Myeloma Working Group guidelines for the management of multiple myeloma patients ineligible for standard high-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation. **Leukemia**, v. 23, n. 10, p. 1716-30, Oct 2009

PALUMBO, A. *et al.* Personalized therapy in multiple myeloma according to patient age and vulnerability: a report of the European

Myeloma Network (EMN). **Blood**, v. 118, n. 17, p. 4519-29, Oct 27 2011.

PARK, S. *et al.* Smenospongidine suppresses the proliferation of multiple myeloma cells by promoting CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein-mediated beta-catenin degradation. **Arch Pharm Res**, v. 40, n. 5, p. 592-600, May 2017.

PAVLOVA, N. N.; THOMPSON, C. B. THE EMERGING HALLMARKS OF CANCER METABOLISM. **Cell Metab**, v. 23, n. 1, p. 27-47, Jan 12 2016.

PENICOOKE, N. *et al.* Antiproliferative activity and absolute configuration of zonaquinone acetate from the Jamaican alga *Stypodium zonale*. **Phytochemistry**, v. 87, p. 96-101, Mar 2013.

PFEFFER, C. M.; SINGH, A. T. K. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 2, Feb 2 2018.

POTTER, M.; NEWPORT, E.; MORTEN, K. J. The Warburg effect: 80 years on. **Biochem Soc Trans**, v. 44, n. 5, p. 1499-1505, Oct 15 2016.

POZAROWSKI, P.; DARZYNKIEWICZ, Z. Analysis of cell cycle by flow cytometry. **Methods Mol Biol**, v. 281, p. 301-11, 2004.

RADOGNA, F. *et al.* Cell type-dependent ROS and mitophagy response leads to apoptosis or necroptosis in neuroblastoma. **Oncogene**, v. 35, n. 29, p. 3839-53, Jul 21 2016.

RAHMAN, A. *et al.* Hydrogen peroxide/ceramide/Akt signaling axis play a critical role in the antileukemic potential of sanguinarine. **Free Radic Biol Med**, v. 96, p. 273-89, Jul 2016.

RAJKUMAR, S. V. *et al.* International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. **Lancet Oncol**, v. 15, n. 12, p. e538-48, Nov 2014.

RAJKUMAR, S. V. *et al.* Lenalidomide plus high-dose dexamethasone versus lenalidomide plus low-dose dexamethasone as initial therapy for newly diagnosed multiple myeloma: an open-label randomised controlled trial. **Lancet Oncol**, v. 11, n. 1, p. 29-37, Jan 2010.

RAMAKRISHNAN, V.; KUMAR, S. PI3K/AKT/mTOR pathway in multiple myeloma: from basic biology to clinical promise. **Leuk Lymphoma**, p. 1-11, Jan 11 2018.

RAMIREZ-LLODRA, E. *et al.* Deep, diverse and definitely different: unique attributes of the world's largest ecosystem. **Biogeosciences**, v. 7, n. 9, p. 2851-2899, 2010.

RAVINDRAN, J. *et al.* Modulation of ROS/MAPK signaling pathways by okadaic acid leads to cell death via, mitochondrial mediated caspase-dependent mechanism. **Apoptosis**, v. 16, n. 2, p. 145-61, Feb 2011.

RAY, P. D.; HUANG, B. W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cell Signal**, v. 24, n. 5, p. 981-90, May 2012.

RÉCOCHÉ, I. *et al.* Drug–drug interactions with imatinib: An observational study. **Medicine (Baltimore)**, v. 95, n. 40, Oct 2016.

REDZA-DUTORDOIR, M.; AVERILL-BATES, D. A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. **Biochim Biophys Acta**, v. 1863, n. 12, p. 2977-2992, Dec 2016.

REN, H. *et al.* The E3 ubiquitin ligases  $\beta$ -TrCP and FBXW7 cooperatively mediates GSK3-dependent Mcl-1 degradation induced by the Akt inhibitor API-1, resulting in apoptosis. **Molecular Cancer**, v. 12, n. 1, p. 146, Nov 2013.

RENVOIZE, C. *et al.* Apoptosis: identification of dying cells. **Cell Biol Toxicol**, v. 14, n. 2, p. 111-20, Mar 1998.

ROGERS, C. *et al.* Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death. **Nat Commun**, v. 8, p. 14128, Jan 3 2017.

ROY, P.; SARKAR, U. A.; BASAK, S. The NF-kappaB Activating Pathways in Multiple Myeloma. **Biomedicines**, v. 6, n. 2, May 16 2018.

SABHARWAL, S. S.; SCHUMACKER, P. T. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? **Nat Rev Cancer**, v. 14, n. 11, p. 709-21, Nov 2014.

SALASKI, E. J. *et al.* Pyranonaphthoquinone Lactones: A New Class of AKT Selective Kinase Inhibitors Alkylate a Regulatory Loop Cysteine. March 23, 2009.

SANDERS, K. *et al.* Natural Products for Cancer Prevention: Clinical Update 2016. **Semin Oncol Nurs**, v. 32, n. 3, p. 215-40, Aug 2016.

SANTOS-PIRATH, I. M. Investigação dos principais mecanismos apoptóticos induzidos por compostos de origem sintética e natural em células de linhagens de neoplasias linfoides. 2018. Tese (Doutorado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SAVJANI, K. T.; GAJJAR, A. K.; SAVJANI, J. K. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. **ISRN Pharm**, 2012.

SCATURRO, P.; PICHLMAIR, A. Oxeyptosis-a cell death pathway to mitigate damage caused by radicals. **Cell Death Differ**, v. 25, n. 7, p. 1191-1193, 2018.

SCATURRO, P.; PICHLMAIR, A. Oxeyptosis: a discreet way to respond to radicals. **Curr Opin Immunol**, v. 56, p. 37-43, Feb 2019.

SEVRIOUKOVA, I. F. Apoptosis-inducing factor: structure, function, and redox regulation. **Antioxid Redox Signal**, v. 14, n. 12, p. 2545-79, Jun 15 2011.

SHAMAS-DIN, A. *et al.* Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 5, n. 4, Apr 1 2013.

SHAROM, F. J. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. **Pharmacogenomics**, v. 9, n. 1, p. 105-27, Jan 2008.

SHE, Q. B. *et al.* The BAD protein integrates survival signaling by EGFR/MAPK and PI3K/Akt kinase pathways in PTEN-deficient tumor cells. **Cancer Cell**, v. 8, n. 4, p. 287-97, Oct 2005.

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

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2018. **CA Cancer J Clin**, v. 68, n. 1, p. 7-30, Jan 2018.

SILVA, R. O. P. E. *et al.* Mieloma múltiplo: características clínicas e laboratoriais ao diagnóstico e estudo prognóstico. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 2, p. 63-68, 2009.

SON, P. S. *et al.* Piceatannol, a catechol-type polyphenol, inhibits phorbol ester-induced NF- $\kappa$ B activation and cyclooxygenase-2 expression in human breast epithelial cells: cysteine 179 of IKK $\beta$  as a potential target. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 8, p. 1442-9, Aug 2010.

SONG, I. S. *et al.* Mitochondria as therapeutic targets for cancer stem cells. **World J Stem Cells**, v. 7, n. 2, p. 418-27, Mar 26 2015.

SORIANO, G. P. *et al.* Proteasome inhibitor-adapted myeloma cells are largely independent from proteasome activity and show complex proteomic changes, in particular in redox and energy metabolism. **Leukemia**, v. 30, n. 11, p. 2198, April 2016.

SPENCER, A. *et al.* The novel AKT inhibitor afuresertib shows favorable safety, pharmacokinetics, and clinical activity in multiple myeloma. **Blood**, v. 124, n. 14, p. 2190-5, Oct 2 2014.

SRINIVAS, P. *et al.* Plumbagin induces reactive oxygen species, which mediate apoptosis in human cervical cancer cells. **Mol Carcinog**, v. 40, n. 4, p. 201-11, Aug 2004.

STRASSER, A.; JOST, P. J.; NAGATA, S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. **Immunity**, v. 30, n. 2, p. 180-92, Feb 20 2009.

STÜHMER, T. *et al.* Preclinical activity of the novel orally bioavailable HSP90 inhibitor NVP-HSP990 against multiple myeloma cells. **Anticancer Res**, v. 32, n. 2, p. 453-62, Feb 2012.

SUMI, D. *et al.* 1,2-Naphthoquinone suppresses lipopolysaccharide-dependent activation of IKKbeta/NF-kappaB/NO signaling: an alternative mechanism for the disturbance of inducible NO synthase-catalyzed NO formation. **J Toxicol Sci**, v. 35, n. 6, p. 891-8, Dec 2010.

SUN, X. *et al.* Ki-67 Contributes to Normal Cell Cycle Progression and Inactive X Heterochromatin in p21 Checkpoint-Proficient Human Cells. **Mol Cell Biol**, v. 37, n. 17, 2017.

SUSIN, S. A. *et al.* Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. **Nature**, v. 397, n. 6718, p. 441, 1999-02-04 1999.

SUTO, Y. *et al.* Synthesis and biological evaluation of the natural product komaroviquinone and related compounds aiming at a potential therapeutic lead compound for high-risk multiple myeloma. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 27, n. 19, p. 4558-4563, Oct 1 2017.

SWERDLOW S. H. *et al.* Mature B-cell neoplasms. In: The 2017 revision of the World Health Organization (WHO) classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC; p. 241-250, 2017.

SWISSADME. **Swiss Institute of Bioinformatics**. Disponível em: <<http://www.swissadme.ch/index.php#>>. Acesso em: 01/04/2019.  
TEGOWSKI, M.; BALDWIN, A. Noncanonical NF- $\kappa$ B in Cancer. *Biomedicines*, v. 6, n. 2, 2018.

TENNANT, J. R. Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. **Transplantation**, v. 2, p. 685-94, Nov 1964.

TORAL-BARZA, L. *et al.* Discovery of lactoquinomycin and related pyranonaphthoquinones as potent and allosteric inhibitors of AKT/PKB: mechanistic involvement of AKT catalytic activation loop cysteines. **Mol Cancer Ther**, v. 6, n. 11, p. 3028-38, Nov 2007.

TOUZEAU, C. *et al.* Targeting Bcl-2 for the treatment of multiple myeloma. **Leukemia**, v. 32, n. 9, p. 1899-1907, Sep 2018.

VERHAGEN, A. M. *et al.* Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. **Cell**, v. 102, n. 1, p. 43-53, Jul 7 2000.

VERRAX, J. *et al.* Redox-active quinones and ascorbate: an innovative cancer therapy that exploits the vulnerability of cancer cells to oxidative stress. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 11, n. 2, p. 213-21, Feb 2011.

VON KARSTEDT, S.; MONTINARO, A.; WALCZAK, H. Exploring the TRAILS less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy. **Nat Rev Cancer**, v. 17, n. 6, p. 352-366, May 24 2017.

WALKER, J. M. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. **Methods Mol Biol**, v. 32, p. 5-8, 1994.

WENZEL, E. S.; SINGH, A. T. K. Cell-cycle Checkpoints and Aneuploidy on the Path to Cancer. **In Vivo**, v. 32, n. 1, p. 1-5, Feb 2018.

WHITE, S. J.; JACOBS, R. S. Effect of stypoldione on cell cycle progression, DNA and protein synthesis, and cell division in cultured sea urchin embryos. **Mol Pharmacol**, v. 24, n. 3, p. 500-8, Nov 1983.

WILLIAMS, G. H.; STOEBER, K. The cell cycle and cancer. **J Pathol**, v. 226, n. 2, p. 352-64, Jan 2012.

WONG, B. C. *et al.* 12-Lipoxygenase inhibition induced apoptosis in human gastric cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 9, p. 1349-54, Sep 2001.

XIA, Y.; SHEN, S.; VERMA, I. M. NF- $\kappa$ B, an active player in human cancers. **Cancer Immunol Res**, v. 2, n. 9, p. 823-30, Sep 2014.

YANG, C. *et al.* Ki67 targeted strategies for cancer therapy. **Clin Transl Oncol**, v. 20, n. 5, p. 570-575, May 2018.

YATIM, N.; CULLEN, S.; ALBERT, M. L. Dying cells actively regulate adaptive immune responses. **Nat Rev Immunol**, v. 17, n. 4, p. 262-275, Apr 2017.

YE, S. *et al.* Chemotoxicity of doxorubicin and surface expression of P-glycoprotein (MDR1) is regulated by the *Pseudomonas aeruginosa* toxin Cif. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 295, n. 3, p. C807-18, 2008.

YU, H. G. *et al.* Phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway plays an important role in chemoresistance of gastric cancer cells against etoposide and doxorubicin induced cell death. **Int J Cancer**, v. 122, n. 2, p. 433-43, Jan 15 2008.

YUAN, R. *et al.* Natural products to prevent drug resistance in cancer chemotherapy: a review. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1401, n. 1, p. 19-27, Aug 2017.

ZHANG, Q.; LENARDO, M. J.; BALTIMORE, D. 30 Years of NF-kappaB: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology. **Cell**, v. 168, n. 1-2, p. 37-57, Jan 12 2017.

ZHANG, Y. *et al.* Destabilization of akt promotes the death of myeloma cell lines. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 190629, 2014.

ZHAO, Y. *et al.* Glycogen Synthase Kinase 3 $\alpha$  and 3 $\beta$  Mediate a Glucose-Sensitive Antiapoptotic Signaling Pathway To Stabilize Mcl-1. June 2007.

ZHENG, H. C. The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. **Oncotarget**, v. 8, n. 35, p. 59950-59964, Aug 29 2017.

## ANEXO A – Parecer do CEP/SH da UFSC.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação de mecanismos de citotoxicidade e morte celular em amostras de pacientes portadores de neoplasias hematológicas e não hematológicas e em amostras de indivíduos saudáveis.

**Pesquisador:** Maria Cláudia Santos da Silva

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 80430317.0.0000.0121

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Catarina

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.638.107

#### Apresentação do Projeto:

\*Avaliação de mecanismos de citotoxicidade e morte celular em amostras de pacientes portadores de neoplasias hematológicas e não hematológicas e em amostras de indivíduos saudáveis. Projeto de pesquisa que tem como objetivo investigar o efeito citotóxico de compostos de origem natural e sintética em amostras de SP e MO de pacientes portadores de neoplasias hematológicas atendidos no HU da UFSC e também em amostras de SP de indivíduos saudáveis, utilizados como modelos de células não neoplásicas (controle não neoplásico). As informações resultantes deste estudo serão de grande importância na compreensão da atividade desses compostos, o que poderá ser utilizado para o desenvolvimento de novos fármacos visando o tratamento de pacientes portadores de neoplasias malignas.

#### Objetivo da Pesquisa:

##### Objetivo Primário:

Investigar o efeito citotóxico de compostos de origem natural e sintética com potencial antitumoral em células obtidas de amostras de SP e MO de pacientes portadores de neoplasias hematológicas atendidos no HU da UFSC no momento do diagnóstico (antes do primeiro tratamento).

##### Objetivo Secundário:

**Endereço:** Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R. Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401  
**Bairro:** Trindade **CEP:** 88.040-400  
**UF:** SC **Município:** FLORIANÓPOLIS  
**Telefone:** (48)3721-6004 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 2.838.107

Investigar o efeito citotóxico de compostos de origem natural e sintética com potencial antitumoral em células obtidas de amostras de SP de voluntários saudáveis, utilizadas como modelo de células não neoplásicas para fins comparativos

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

O estudo não apresenta riscos para os pacientes participantes, uma vez que serão utilizadas nos experimentos apenas suas amostras de SP e MO e os mesmos não terão contato direto com os compostos que serão investigados. As amostras serão coletadas no HU/UFSC no momento do diagnóstico, ou seja, os pacientes não serão submetidos a novos procedimentos invasivos ou desconfortos adicionais. Não haverá duas coletas, pois será aproveitado o mesmo material coletado para os exames laboratoriais. Os voluntários saudáveis incluídos neste trabalho cederão apenas uma amostra de SP coletada por punção venosa por profissionais qualificados do Laboratório de Análises Clínicas da UFSC, portanto também não estão sujeitos a quaisquer riscos caso aceitem participar da pesquisa.

**Benefícios:**

É possível perceber a necessidade de se investigar novas estratégias de tratamento para pacientes portadores de câncer, não apenas para melhorar sua sobrevivência, mas também sua qualidade de vida durante o tratamento. As informações resultantes deste estudo provavelmente não trarão benefícios diretos aos pacientes e voluntários incluídos no mesmo, uma vez que existe um longo caminho entre a investigação de novos compostos *in vitro* e sua aprovação para ensaios clínicos. No entanto, a proposta da presente pesquisa de investigar o efeito de novos compostos promissores em amostras de pacientes portadores de neoplasias malignas poderá ser de grande importância na compreensão e no desenvolvimento futuro de novos fármacos contra neoplasias hematológicas.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata o presente de um projeto de pesquisa coordenado pela Profa. Dra. Maria Cláudia Santos da Silva do Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas da UFSC, cuja finalidade é investigar o efeito citotóxico de compostos de origem natural e sintética em amostras de SP e MO de pacientes portadores de neoplasias hematológicas atendidos no HU da UFSC e também em

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Frio do Reitoria II, R. Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401  
 Bairro: Trindade CEP: 88.040-400  
 UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS  
 Telefone: (48)3721-6034 E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 2.838.107

amostras de SP de indivíduos saudáveis, utilizados como modelos de células não neoplásicas (controle não neoplásico). Os participantes da presente pesquisa serão selecionados de acordo com os critérios de inclusão e exclusão determinados no projeto. As amostras de pacientes utilizadas para a pesquisa serão sangue periférico (SP) ou medula óssea (MO), as quais serão coletadas no momento do diagnóstico (antes do primeiro tratamento) no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). As amostras de voluntários utilizadas como controle de modelo não neoplásico serão de sangue periférico, coletado por punção venosa no Laboratório de Análises Clínicas do HU/UFSC. As amostras acondicionadas serão transportadas até o Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH) do HU/UFSC, onde serão processadas para isolamento das células neoplásicas e células mononucleadas. As células serão então incubadas com compostos de origem natural e sintética previamente selecionados em linhagens celulares e a viabilidade celular será determinada pelo método do MTT. O estudo tem relevância científica, a documentação está completa e o TCLE apresentado atende a todas as exigências da Resolução CNS nº466/12 e suas complementares. Assim, recomendamos a sua aprovação.

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

Foram apresentados os seguintes documentos obrigatórios:

- Informações básicas do projeto - formulário PB;
- Folha de rosto;
- Declaração do pesquisador;
- Declaração da instituição - HU;
- TCLE;
- Projeto de pesquisa;
- Cronograma.

O TCLE apresentado atende na íntegra a Resolução CNS 466/12.

**Recomendações:**

Não se aplica.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não foram detectadas pendências ou inadequações neste projeto.

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R. Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401  
 Bairro: Trindade CEP: 88.040-400  
 UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS  
 Telefone: (48)3721-6034 E-mail: cep.propeq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 2.838.107

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1004163.pdf	13/08/2018 11:52:19		Aceito
Outros	carta_resposta_agosto.docx	13/08/2018 11:43:45	Mariana Franzoni Maloral	Aceito
Cronograma	cronograma_modificado_agosto.docx	13/08/2018 11:42:56	Mariana Franzoni Maloral	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_modificado_agosto.docx	13/08/2018 11:42:47	Mariana Franzoni Maloral	Aceito
Folha de Rosto	folha.pdf	27/11/2017 15:16:51	Mariana Franzoni Maloral	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_maclau.pdf	06/11/2017 14:46:37	Mariana Franzoni Maloral	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao_hu.pdf	06/11/2017 14:45:24	Mariana Franzoni Maloral	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	pesquisa_PB.doc	07/10/2017 14:27:16	Mariana Franzoni Maloral	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

FLORIANOPOLIS, 22 de Agosto de 2018

Assinado por:  
**Maria Luiza Bazzo**  
 (Coordenador)

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R. Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401  
 Bairro: Trindade CEP: 88.040-400  
 UF: SC Município: FLORIANOPOLIS