



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS TRINDADE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

RODRIGO COSTA ZEFERINO

**EFEITO ANTITUMORAL DO N-BENZIL-2-NITRO-1-
IMIDAZOL-ACETAMIDA (BENZONIDAZOL) E POSSÍVEIS
MECANISMOS DE AÇÃO)**

FLORIANÓPOLIS
2019

RODRIGO COSTA ZEFERINO

**EFEITO ANTITUMORAL DO N-BENZIL-2-NITRO-1-
IMIDAZOL-ACETAMIDA (BENZONIDAZOL) E POSSÍVEIS
MECANISMOS DE AÇÃO)**

Tese submetida ao Programa de Pós graduação em
bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do título de Doutor em bioquímica
Orientador: Profa. Dra. Rozangela Curi Pedrosa
Coorientador :Prof, Dr. Claus Tröger Pich

FLORIANÓPOLIS
2019

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

Zeferino, Rodrigo Costa Zeferino
EFEITO ANTITUMORAL DO N-BENZIL-2-NITRO-1-IMIDAZOL
ACETAMIDA (BENZONIDAZOL) E POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO /
Rodrigo Costa Zeferino Zeferino ; orientador, ROZANGELA
CURI PEDROSA CURI PEDROSA, coorientador, CLAUS TRÖGER PICH
TRÖGER PICH, 2019.
126 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. Benzonidazol. 3. Atividade anti
tumoral. 4. Espécies reativas de Oxigênio. 5. In vivo -
In silico. I. CURI PEDROSA, ROZANGELA CURI PEDROSA. II.
TRÖGER PICH, CLAUS TRÖGER PICH. III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. IV.
Título.

Rodrigo Costa Zeferino

Título: EFEITO ANTITUMORAL DO N-BENZIL-2-NITRO-1-
IMIDAZOL-ACETAMIDA (BENZONIDAZOL) E POSSÍVEIS
MECANISMOS DE AÇÃO.

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Alfeu Zanotto Filho
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Profa. Dra. Karina Bettega Felipe
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Bioquímica.

Profa. Dra. Ariane Zamoner Pacheco de Souza
Coordenadora do Programa

Profa. Dra. Rozangela Curi Pedrosa
Orientadora

Florianópolis, 2019.

Este trabalho é dedicado ao meu filho Anthony
Serafin Daitx Zeferino e a minha esposa Deise
Serafin Daitx Zeferino.

AGRADECIMENTOS

Agradeço pela vida que me foi dada pelo "criador" e que me tornou parte deste complexo e magnífico Universo.

Ao meu filho Anthony que nasceu durante o doutoramento e trouxe muito mais certezas do que dúvidas, mais amor do que ódio e mais consciência da verdade de ser HUMANO. Agradeço à minha esposa Deise que sempre me apoiou acreditando em meu potencial, sendo essencial para esta conquista. Agradeço pela paciência, compaixão e sabedoria que tiveste ao meu lado e por isso, ofereço-lhe minha sincera gratidão e digo: TE AMO.

Aos meus pais Alzenir Zeferino e Terezinha Nair Costa Zeferino que sempre me ajudaram e apoiaram na busca do conhecimento tornando-se colaboradores importantes para minha formação intelectual, AMO vocês.

Aos meus sogros Antônio Norberto Daitx e Sirlei Serafin Daitx que compreenderam a importância desta busca do conhecimento e se tornaram agentes importantes para a conclusão dos meus estudos.

À minha orientadora prof^a. Dr^a. Rozangela Curi Pedrosa que nunca me abandonou e me guiou mesmo em momentos de completa escuridão. Muito obrigado por ser minha segunda MÃE professora Roza. Agradeço ao meu Co-orientador prof. Dr. Claus Tröger Pich, que desde o início incentivou-me e ofereceu apoio dando assim, meus primeiros passos na ciência. Muito Obrigado professor Claus.

Agradeço a todo o LABIOEX (integrantes), que me proporcionaram muito mais que ajuda humana, produzindo além de tudo amizades que nunca serão esquecidas. Em especial agradeço Valdelúcia, Nádia, Tânila, Gabriela, Jean, Daniela e a professora Tânia, sem a ajuda de vocês eu não chegaria até o final, muito obrigado.

Agradeço à CAPES que financiou meus estudos objetivando o aperfeiçoamento profissional e a produção tecnológica Brasileira. Finalmente agradeço à todos os animais que foram utilizados neste estudo, que sem eles não teríamos resultados tão importantes para a ciência humana.

"Na vida, não existe nada a se temer,
apenas a ser compreendido"

Marie Curie

RESUMO

O *N*-benzil-2-nitro-1-imidazol-acetamida (Benzonidazol, BZN) é um antiparasitário utilizado para o tratamento da doença de Chagas. Durante a biotransformação do BZN pelo CYP₄₅₀ ocorre a geração de radicais livres que atuam sobre o DNA, proteínas e lipídeos produzindo danos oxidativos. Por outro lado, a geração excessiva de radicais livres pode ativar os mecanismo de morte celular por apoptose. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antitumoral de BZN utilizando o modelo *in vivo* de tumor ascítico de Ehrlich (TAE) com camundongos BALB/c, além da predição computacional vislumbrando compreender o mecanismo de interação entre BZN e o DNA e a proteína Akt1. BALB/c foram tratados (i.p.) com BZN (10mg/kg/dia), BZN+NAC (10mg/kg/dia+200mg/kg/dia) ou NAC (200mg/kg/dia) por 9 dias consecutivos. Posteriormente foram avaliados sobrevida, inibição do crescimento tumoral, angiogênese, tipo de morte celular e ciclo celular. O estresse oxidativo e defesa antioxidante foram avaliados através da mensuração do conteúdo de TBARS e GSH, dano ao DNA, geração de ERO, influxo de cálcio e atividades da CAT, SOD, GPx, GST e GR. Imunoblotting foi utilizado para avaliar níveis de proteínas chaves no processo de morte celular, ciclo celular, adaptação metabólica, sobrevivência, sobretudo da via Akt/mTOR. Por fim, foi avaliado a infiltração leucocitária e a atividade da Mieloperoxidase (MPO). O BZN aumentou a sobrevida (42%) dos animais e inibiu a crescimento tumoral (79%) e angiogênese (2,8 vezes). Este antiparasitário também causou aumento no número de células em apoptose (232%) e níveis das proteínas apoptóticas p53 e BAX. Tais efeito possivelmente estão associados a maior geração de ERO (42%), influxo de cálcio (55%), conteúdo de TBARS (1,9 vezes) além das atividades da SOD (4,4 vezes), GPx (17,5 vezes), GST (3 vezes) e depleção de GSH (2,5 vezes). BZN causou danos ao DNA (7,6 vezes) resultando em aumento dos níveis de γ H2AX, além de promover a clivagem da PARP-1. Também causou maior aprisionamento das células na fase G, redução de níveis de ciclina A e aumento de CDK2. Proteínas chave da via da Akt/mTOR sofreram modulação por BZN por redução da fosforilação da Akt1 e mTOR1 e conseqüentemente redução dos níveis de HIF-1 α (65%) e GLUT-1 (76%). Estes resultados estão em acordo com simulação *in silico* (docking molecular/dinâmica molecular), onde são indicadas interações BZN-DNA que favorece o dano ao DNA além da interação com a proteína Akt1 no sitio de fosforilação modulando a via Akt/mTOR. Por fim, análise histológica mostrou aumento do infiltrado leucocitário e redução da atividade da MPO (59%) sugerindo um efeito imunomodulatório do BZN. Portanto BZN

demonstrou ser um agente indutor de ERO, causando dano ao DNA e interagindo com a proteína Akt1 reduzindo sua ativação por fosforilação e consequentemente mTOR1. Neste contexto o benzonidazol surge como uma possibilidade de reposicionamento farmacológico visando uma potencial indicação terapêutica para o tratamento do câncer.

Palavras chave: Benzonidazol, Geração de ERO, Inibição do crescimento tumoral, Apoptose, via PI3K/Akt/mTOR, Imunomodulação, Simulação *in silico*.

ABSTRACT

N-benzil-2-nitro-1-imidazol-acetamida (Benzonidazole, BZN) is a antiparasitic drug used for the treatment of Chagas' disease. During the biotransformation of BZN by CYP450 occurs the generation of free radicals that act on the DNA, proteins and lipids producing oxidative damages. On the other hand, the excessive generation of free radicals can activate the mechanisms of cell death by apoptosis. The objective of this work was to evaluate the antitumor potential of BZN using the *in vivo* model of Ehrlich ascites tumor (TAE) with BALB / c mice, in addition to the computational prediction, understanding the mechanism of interaction between BZN and DNA and Akt1 protein. BALB/c were treated (i.p.) with BZN (10mg/kg/day), BZN + NAC (10 mg/kg/day + 200 mg/kg/day) or NAC (200 mg/kg/day) for 9 consecutive days. Subsequently, survival, inhibition of tumor growth, angiogenesis, type of cell death and cell cycle were evaluated. Oxidative stress and antioxidant defense were evaluated by measuring the content of TBARS and GSH, DNA damage, ROS generation, calcium influx and CAT, SOD, GPx, GST and GR activities. Immunoblotting was used to evaluate key protein levels in the process of cell death, cell cycle, metabolic adaptation, survival, mainly of the Akt/mTOR pathway. Finally, leukocyte infiltration and Mieloperoxidase activity (MPO) were evaluated. BZN increased survival (42%) of the animals and inhibited tumor growth (79%) and angiogenesis (2.8-fold). This anti-parasitic also caused an increase in the number of cells in apoptosis (232%) and levels of the apoptotic proteins p53 and BAX. These effects are possibly associated with higher generation of ROS (42%), calcium influx (55%), TBARS content (1.9-fold) and SOD activities (4.4-fold), GPx (17.5-fold), GST (3-fold) and GSH depletion (2.5-fold). BZN caused DNA damage (7.6-fold) resulting in increased levels of γ H2AX, in addition to promoting the cleavage of PARP-1. It also caused greater cell entrapment in the G-phase, reduction of cyclin A levels and increase of CDK2. Key Akt/mTOR pathway proteins were modulated by BZN by reducing the phosphorylation of Akt1 and mTOR and consequently reduced levels of HIF-1 α (65%) and GLUT-1 (76%). These results are in agreement with *in silico* (molecular docking) simulation, where BZN-DNA interactions are indicated that favors DNA damage in addition to interaction with the Akt1 protein at the phosphorylation site modulating the Akt/mTOR pathway. Finally, histological analysis showed increased leukocyte infiltrate and reduced MPO activity (59%) suggesting an immunomodulatory effect of BZN. Therefore BZN has been shown to be an ERO-inducing agent, causing DNA damage and interacting with the

Akt1 protein by reducing its activation by phosphorylation and mTOR1. In this context benznidazole appears as a possibility of pharmacological repositioning aiming at a potential therapeutic indication for the treatment of cancer.

Key words: Benznidazole, ROS overgeneration, Inhibition of tumor growth, Apoptosis, PI3K/Akt/mTOR pathway, Immunomodulation, *In silico* simulations.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da proteína p53 e sua interação com o DNA.....	
Figura 2 - Via de sinalização de proliferação por IGF.....	
Figura 3 - Mecanismo regulatório de HIF-1 α	
Figura 4 - Ciclo celular e seus controles moleculares.....	
Figura 5 - Geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), sua regulação e efeitos.....	
Figura 6 - Geração de ERO por reação de Fenton e sua regulação por defesas enzimáticas.....	
Figura 7 - Geração de ERO e o envolvimento do cálcio (Ca ⁺).....	
Figura 8 - Geração de ERO e o envolvimento do Ca ²⁺ em diferentes compartimentos celulares.....	
Figura 9 - Representação ilustrativa do genoma humano e suas proteínas integrais.....	
Figura 10 - Sinalização celular ocasionada pela quebra dupla do DNA.....	
Figura 11 - Respostas ao dano do DNA.....	
Figura 12 - Reparo do DNA mediado pela PARP-1.....	
Figura 13 - Os diferentes tipos de morte celular.....	
Figura 14 - Morfologia celular durante o processo de apoptose.....	
Figura 15 - As principais vias de sinalização para apoptose.....	
Figura 16 - Estrutura química do Benzonidazol.....	
Figura 17 - Benzonidazole inibe o desenvolvimento tumoral de TAE em camndongos BALB/c	
Figura 18 - Benzonidazole induz a apoptose em modelo tumoral de TAE em camndongos BALB/c	
Figura 19 -. Benzonidazole induz ao aprisionamento do ciclo celular em modelo tumoral de TAE em camndongos BALB/c	
Figura 20 - O benzonidazol induz a supergeração de ERO e captação de cálcio em	

modelo de TAE *in vivo*.....

--

Figura 21- Benzonidazol induz ao dano ao DNA e clivagem da PARP-1 em modelo de TAE <i>in vivo</i>	
Figura 22 - Interações de BZN com DNA (<i>in silico</i>).....	
Figura 23 - Interações de BZN com a proteína Akt1 (<i>in silico</i>).....	
Figura 24 - Indução de apoptose por BZN em células de TAE.....	
Figura 25- Benzonidazol regula negativamente a indução da proteína Akt1.....	
Figura 26 - Sobrevida, inibição do crescimento tumoral e inibição da angiogênese.....	
Figura 27 - Quantificação de células imunes presentes no líquido ascítico coletados do TAE e atividade da mieloperoxidase.....	
Figura 28 - Suplementar	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Marcadores do estresse oxidativo e enzimas antioxidantes. Avaliação de marcadores de estresse oxidativo TBARS e avaliação da atividade de GSH e enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST), glutathione S-transferase (GST), glutathione reductase (GR) e catalase (CAT)

.....

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

•NO	Óxido nítrico
•OH	Radical hidroxila
¹ O ₂	Oxigênio singlete
Akt	Proteína cinase B
ATM	<i>Ataxia-telangiectasia mutated</i>
ATP	Trifosfato de Adenosina
BZN	Benzonidazol
CAT	Catalase
CDK	Cinase dependente de ciclina Citocromo P450 isoforma 2E1
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
CYP450	Citocromo P ₄₅₀
CTE	Cadeia Transportadora de Elétrons
DTNB	Ácido ditionitrobenzóico (5,5'-Ditiobis (2-Ácido Nitrobenzoico))
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSBs	Quebra de fita dupla
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies reativas do oxigênio
GLUT	Transportador de glicose
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa reduzida
GSK3β	Glicogênio Sintase Cinase 3 beta
GSSG	Glutationa oxidada
GST	Glutationa S-transferase
HIF-1α	Fator 1-α induzível por hipóxia

H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IARC	International Agency of Research in Cancer
HO ₂ [·]	Radical hidroperoxil
HOCl	Ácido hipocloroso
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IGFR1	Receptor do Fator de Crescimento Ligado a Insulina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MCP	Morte Celular Programada
MPO	Mieloperoxidase
MTX	Metotrexato
MT	Mitocôndria
NAC	<i>N</i> -acetilcisteína
NAD ⁺	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidado
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido
NADP ⁺	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NOX	Complexo NADPH-oxidase
MDA	Malondialdeído
OMS	Organização Mundial da Saúde
p53	Proteína p53
pAkt	Proteína cinase B fosforilada
PARP-1	Poli (ADP-ribose) polimerase
PHDs	Prolina hidroxilases
PI3K	Fosfatidilinositol-3 cinase
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-difosfato
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5- trifosfato
ONOO ⁻	Peroxinitrito

O ₂ ^{•-}	Radical ânion superóxido
SOD	Superóxido dismutase
SOD-CuZn	Superóxido dismutase-cobre-zinco
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
t-BuOOH	Tert-butilhidroperóxido
TCA	Ácido tricarboxílico
PKC	Proteína cinase C
pVHL	Proteína Von Hippel-Lindal
RE	Retículo endoplasmático
TAE	Tumor Ascítico de Ehrlich
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TLR	<i>Receptor Toll-like</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR1	Receptor do fator de necrose tumoral
TP53	Gene codificador proteína p53
VEGF	Fator de crescimento endotelial
VGIC	Canais iônicos dependentes de voltagem
VHB	Vírus da hepatite B
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	31
2. OBJETIVOS.....	34
2.1 Objetivo Geral	34
2.2 Objetivos específicos	34
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	36
3.1 As bases moleculares do câncer	36
3.2 Proliferação celular e a via PI3K/Akt/mTOR	38
3.3 Ciclo celular e pontos de restrição	42
3.4 Estresse oxidativo e câncer	44
3.5 Dano ao DNA	50
3.6 Diferentes tipos de morte celular	55
3.7 Apoptose Celular	57
3.8 Necrose	59
3.9 Terapia do Câncer	60
3.10 Benzonidazol	62
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	64
4.1 Materiais	64
4.2 Animais	64
4.3 Inibição do crescimento tumoral <i>in vivo</i> do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) e sobrevivência dos animais	65
4.4 Atividade Antiangiogênica	65
4.5 Análises de apoptose celular	66
4.6 Análise do ciclo celular	66
4.7 Defesas antioxidantes e marcadores do estresse oxidativo	66
4.8 Análise da geração de ERO (Espécies Reativas de Oxigênio)	67
4.9 Determinação do Influxo de cálcio	67
4.10 Danos ao DNA	68
4.11 Análise de Western Blot	68
4.12 Dicroísmo circular	69
4.13 Avaliação <i>in silico</i> das interações do Benzonidazol com B-DNA (Ancoramento molecular e dinâmica molecular)	70
4.14 Cálculos de energia MM-PBSA	71
4.15 Avaliação <i>in silico</i> das interações do Benzonidazol com Akt-1 (Ancoramento molecular e dinâmica molecular)	71
4.16 Avaliação imunocitológica	72

4.17 Atividade da mieloperoxidase	72
4.18 Análise estatística	72
5. RESULTADOS.....	74
5.1 Benzonidazol aumenta a sobrevivência dos animais, em associação com a inibição do crescimento tumoral e da angiogênese.	74
5.2 Benzonidazol aumenta níveis de proteínas de apoptose p53 e BAX induzido TAE.	76
5.3 Benzonidazol induz a parada do ciclo celular <i>in vivo</i> em células de TAE.	78
5.4 Benzonidazol induz ao estresse oxidativo em células de TAE.	80
5.5 Benzonidazol aumenta a geração de ERO intracelular e influxo de cálcio em células de TAE.	81
5.6 Benzonidazol induz fragmentação do DNA em células de TAE.	83
5.7 Confirmação da interação DNA-BZN por dicróismo circular.	85
5.8 Resultados <i>in silico</i> (Interação e dinâmica molecular B-DNA-BZN)	85
5.9 Resultados <i>in silico</i> (interação e dinâmica molecular BZN-Akt1).	88
5.10 Benzonidazol aumenta os níveis de p53, γ H2AX, BAX e Bcl-xL em células de TAE.	90
Desde que o BZN e o MTX induziram apoptose nas células EAC, determinamos os efeitos desses fármacos nos níveis de γ H2AX, um marcador de quebra de dupla posição do DNA nas células EAC. Após a administração de BZN, os níveis de proteína 2H2AX aumentaram (117%) (Figura 24B e 24C), enquanto o nível de proteína p53, um regulador chave da progressão do ciclo celular, apoptose e estabilidade genômica, aumentou ligeiramente (36%) (Figura 24 e Figura 24). Por outro lado, o BZN aumentou significativamente o nível de BAX em 147%, uma proteína pró-apoptótica que desempenha um papel importante na apoptose mitocondrial, quando comparada ao controle negativo. Além disso, observamos uma pequena diminuição nos níveis da proteína anti-apoptótica Bcl-xL após o tratamento com BZN (Figura 24B). Finalmente, o BZN elevou a razão BAX/Bcl-xL (indicativo de apoptose mitocondrial), sugerindo ativação intrínseca da apoptose (Figura 24E). Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que o BZN induziu apoptose por dano ao DNA e via mitocondrial de apoptose.....	
5.11 Benzonidazol modula a sinalização de Akt1 em células de TAE.	92
5.12 Benzonidazol modula a sinalização de Akt1 em células de TAE	92
5.13 Benzonidazol aumenta a sobrevivência dos animais, em associação com a inibição do crescimento tumoral, angiogênese e imunomodulação.	94
6. DISCUSSÃO.....	98
7. CONCLUSÃO GERAL.....	105
9. REFERÊNCIAS.....	108
Gorrini, C.; Harris, I. S.; MAK, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. Nat Rev Drug Discov. v. 12, n. 12, p. 931-47, 2013.....	
	114

1. INTRODUÇÃO

O câncer, do ponto de vista bioquímico, é uma doença celular caracterizada pela perda do controle de mecanismo tais como: controle do ciclo celular, diferenciação, proliferação, sobrevivência e invasibilidade a outros tecidos (metástase) (MOFFAT et al., 2000; INCA,

2018). Do ponto de vista clínico, o câncer é um conjunto de mais de 200 doenças que tem em comum o crescimento e proliferação desordenada de células que invadem os tecidos e órgãos (WEINBERG, R., 1996; COZZI, P., 2003).

Atualmente o câncer é um importante problema de saúde pública em diversos países do mundo, tendo alcançado a marca de segunda principal causa de mortes no planeta, sendo responsável por 8,8 milhões de mortes apenas no ano de 2015. Estima-se para o ano de 2025 que ocorra, 20.000.000 de novos casos de câncer nos países em desenvolvimento. Atualmente, 70% das mortes por câncer no mundo acontecem nestes países com baixa e média renda (WHO, 2017 ; INCA, 2018a).

No Brasil estimam-se para o biênio de 2018-2019, 600.000 novos casos de câncer para cada ano. Entre os homens são esperados 68.220 novos casos de câncer de próstata, havendo risco estimado de 66,12 novos casos a cada 100.000 homens. Entre as mulheres estima que surjam aproximadamente 59.700 novos casos de câncer de mama (INCA, 2018a). Os tipos de cânceres mais incidentes no Brasil para o biênio de 2018-2019 são o câncer de próstata (homens) e o câncer de mama (mulheres) com destaque destacando a região sul do Brasil com maior incidência destas duas patologias.

Da mesma forma que em outros países em desenvolvimento, o número de óbitos no Brasil pelo câncer é elevado. Além disto, a sobrevida em países como o Brasil é considerada baixa, sendo por volta de 2 a 4 anos após o início do tratamento, enquanto que em países desenvolvidos esse tempo de sobrevida é 4 vezes maior (INCA, 2018a). Muitos fatores são importantes e decisivos para entender os altos índices de óbitos e os baixos índices de sobrevida do paciente com câncer no Brasil. Entre eles podemos citar aspectos geográficos Brasileiro, onde grande parte dos serviços de diagnóstico e tratamento para o câncer em grandes cidades dificultando assim, o acesso ao cidadão Brasileiro aos serviços prestados. Na atualidade o tratamento do câncer disponibiliza (de acordo com o quadro clínico) as opções de cirurgia, imunoterapia, radioterapia e quimioterapia ou a associação delas. O tratamento com quimioterápico e a radioterapia (tratamentos convencionais), apresentam efeitos colaterais graves, induz resistência e possuem elevado grau de toxicidade, aumentando assim, a probabilidade de morte precoce do paciente (OCTAVIA et al. 2012). Desta forma, é de grande importância a busca por novas estratégias terapêuticas, objetivando maior seletividade para as células tumorais, menos toxicidade para as células não neoplásicas, levando em consideração características bioquímicas e moleculares de células tumorais (HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A., 2011).

Neste contexto, o presente estudo busca avaliar o efeito antitumoral do fármaco antiparasitário Benzonidazol em modelo de tumor ascítico de Ehrlich (TAE), servindo como base para a busca de uma reposição clínica para este composto.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial antitumoral do benzonidazol bem como investigar seus possíveis mecanismos moleculares de ação utilizando modelos experimentais *in vivo* e *in silico*.

2.2 Objetivos específicos

Caracterizar e padronizar um modelo experimental de síndrome alcoólica fetal em ratos. Desenvolver um modelo de exposição pré-natal e pós-natal ao etanol que:

- Avaliar a sobrevida, a inibição do crescimento tumoral e a atividade antiangiogênica do BZN em camundongos BALB-c transplantados com tumor ascítico de Ehrlich;
- Avaliar os marcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes em camundongos BALB-c transplantados com tumor ascítico de Ehrlich tratados com BZN;
- Avaliar o potencial de BZN de gerar espécies reativas de oxigênio (ERO) em camundongos BALB-c transplantados com tumor ascítico de Ehrlich;
- Avaliar o tipo de morte celular induzido por BZN em camundongos BALB-c transplantados com tumor ascítico de Ehrlich;
- Avaliar a possível alteração no influxo de cálcio em células de tumor ascítico de Ehrlich tratadas como BZN;

- Avaliar os índices de fragmentação do DNA e proteína de reparo γ H2AX em células de tumor ascítico de Ehrlich tratadas como BZN;
- Avaliar o efeito dos tratamentos BZN sobre no ciclo celular em células de tumor ascítico de Ehrlich;
- Avaliar *in vivo* a expressão de proteínas relacionadas à morte celular (p53 e BAX), ciclo celular (ciclina A e CDK2), dano ao DNA (PARP) induzidas pelos tratamentos com BZN;
- Estudar *in silico* a interação entre o BZN e DNA e entre BZN e a proteína Akt1;
- Investigar a correlação da via Akt/mTOR na atividade antitumoral do BZN através da avaliação da expressão de Akt, pAkt, mTOR, VEGF, GLUT, p53 e HIF-1 α ;
- Investigar o efeito imunomodulador do BZN em camundongos BALB-c transplantados com tumor ascítico de Ehrlich.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 As bases moleculares do câncer

O câncer está intimamente associado ao processo de mutagênese que acomete a estrutura primária do DNA ocasionando modificações estruturais e funcionais do mesmo (KINZLER, W.K., VOGELSTEIN, B., 2002; MERLO et al., 2006). As modificações ocasionadas por mutações no DNA determinam uma característica básica das células tumorais, que é crescimento novo e descontrolado de células do próprio organismo, nominando o termo técnico mais apropriado a doença: neoplasia (ERDTMANN, 2003). As mutações que dão origem a neoplasias são normalmente somáticas e acontecem durante o período de vida do indivíduo, mas eventualmente mutações herdadas de gerações anteriores podem participar do processo de gênese do tumor. Em muitos tipos de câncer a incidência é diretamente proporcional à idade, sugerindo que o câncer é causado pelo acúmulo progressivo de um número grande de mutações aleatórias no decorrer dos anos (ALBERTS, 2010).

As mutações adquiridas podem estar associadas às questões ambientais, como poluição e radiação ionizante. Além disso, a exposição a agentes infecciosos (*Helicobacter pylori*), Papiloma Vírus Humano e Vírus da Hepatite B (VHB) e uso de medicamentos também podem elevar o número de mutações, favorecendo o desenvolvimento do câncer. Outro fator importante associado às causas evitáveis do câncer é o fator sociocultural que está ligado diretamente aos hábitos individuais de uma população. Hábitos, como tabagismo, alimentação

pouco saudável, sobrepeso e obesidade, sedentarismo, uso frequentemente de bebidas alcoólicas e exposição ao sol sem proteção adequada, elevam o número de mutações e aumentam a chance do desenvolvimento de algum tipo de câncer (STRATTOR, 2009; PFEIFER, 2010; INCA, 2019b).

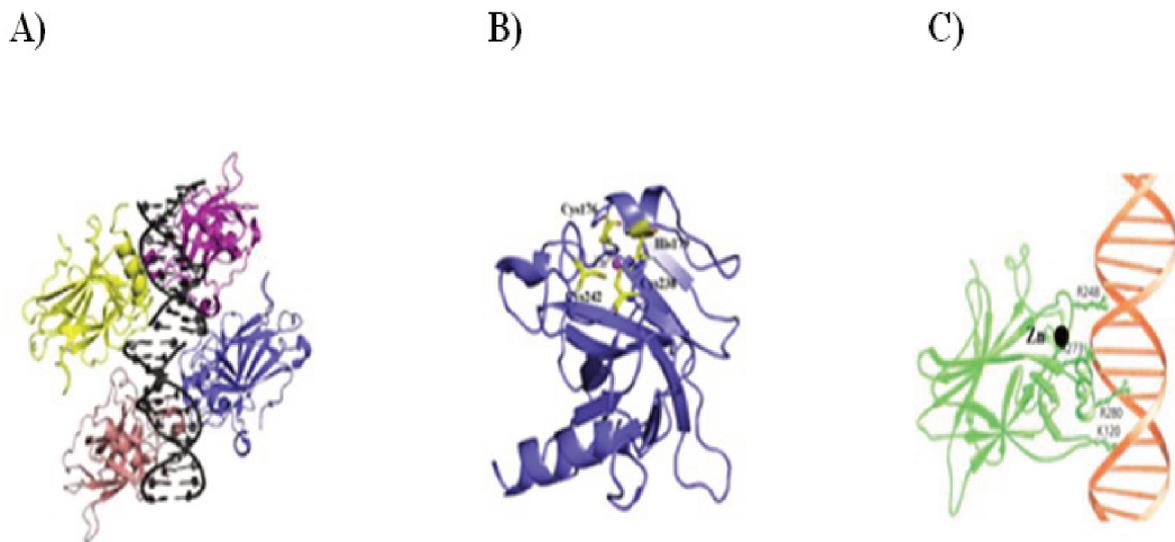
As mutações que favorecem o desenvolvimento e a propagação do câncer acontecem em genes importantes conhecidos como genes críticos para o câncer (ALBERT, 2010). Estas mutações podem direcionar a ativação de proto-oncogenes em oncogenes conferindo-lhes aumento de função. Neste caso, a mutação causa a elevação da expressão de proteínas indutoras do crescimento ocasionando uma multiplicação celular excessiva além de proteínas importantes que estão envolvidas na regulação do ciclo celular normal (DE VITA, HELMAN, ROSENBERG, 1998). Mutações também podem ocorrer em genes supressores de tumor, principalmente a perda de sua função gênica. Esta função está relacionada particularmente ao controle da divisão celular que promove a parada e a não continuidade da proliferação celular. Entre os genes importantes para a inibição do desenvolvimento do câncer estão os genes de reparo ao DNA. Quando há ocorrência de algum tipo de dano ao DNA, proteínas transcritas por genes de reparo são dirigidas ao sítio de dano e realizam o seu reparo. Quando algumas mutações não são reparadas e conseqüentemente fixadas existe a possibilidade de ocorrer conseqüências graves ao genoma que podem ser passadas posteriormente para células filhas. Caso o reparo não seja eficiente os indutores de apoptose sinalizam para que a célula mutada seja eliminada através da morte programada (apoptose). Porém, quando estes genes de indução de apoptose estão mutados, as células evadem da morte programada, promovendo assim propagação de células potencialmente anormais (WOLF; RAMIREZ, 2001; BERTRAM, 2001; RANG et al., 2004).

Diferentes tipos de genes supressores tumorais estão frequentemente mutados em diversos tipos de câncers, pode-se citar alguns genes que codificam proteínas importantes como, p53, p16, γ H2AX, família Bcl-2 (BAX, Bcl-XL, Bid), ciclinas e CDKs (SERRANO et al., 1993; REED, 1998; SAGAR SENGUPTA & CURTIS C. HARRIS, 2005; MITRA P. et al., 2016). Dentre os genes citados anteriormente, destaca-se o gene TP53 (supressor de tumor) que leva à produção da proteína p53. Esta proteína tem por função regular o reparo do DNA danificado e, no caso de ineficiência do reparo, o ciclo celular é imediatamente bloqueado, e então se desencadeia a apoptose, pelo aumento da fosforilação da proteína p53 (SAHA, T. et al. 2015). Muitos tipos de câncer como o de cólon retal, pulmão, ovário, mama e próstata, têm sido associados à mutação no gene TP53, e acredita-se que aproximadamente

95% de todos os tipos de câncer apresentam mutação neste gene, o que provoca a inibição da sinalização para a apoptose (EISINGER et al., 1998; GRETARSDOTTIR et al., 1998; OLIVIER et al, 2002).

A p53 é uma fosfoproteína de 53 kDa com estrutura composta por quatro cadeias proteicas unidas por um domínio tetramérico. Neste domínio tetramérico encontra-se um domínio de ligação com o DNA que sofre fosforilação e ativa a função de ligação específica com o DNA (Figura 1).

Figura 1- Estrutura da proteína p53 e sua interação com o DNA



Proteína p53. A) Proteína tetramérica p53 interagindo com a dupla fita de DNA. B) Domínios e resíduos que interagem com o DNA juntamente com o átomo de zinco (Zn). C) Interação com o DNA de um monômero da proteína p53 exemplificando locais e resíduos; arginina (R 248); lisina (K 120) e um átomo de zinco.

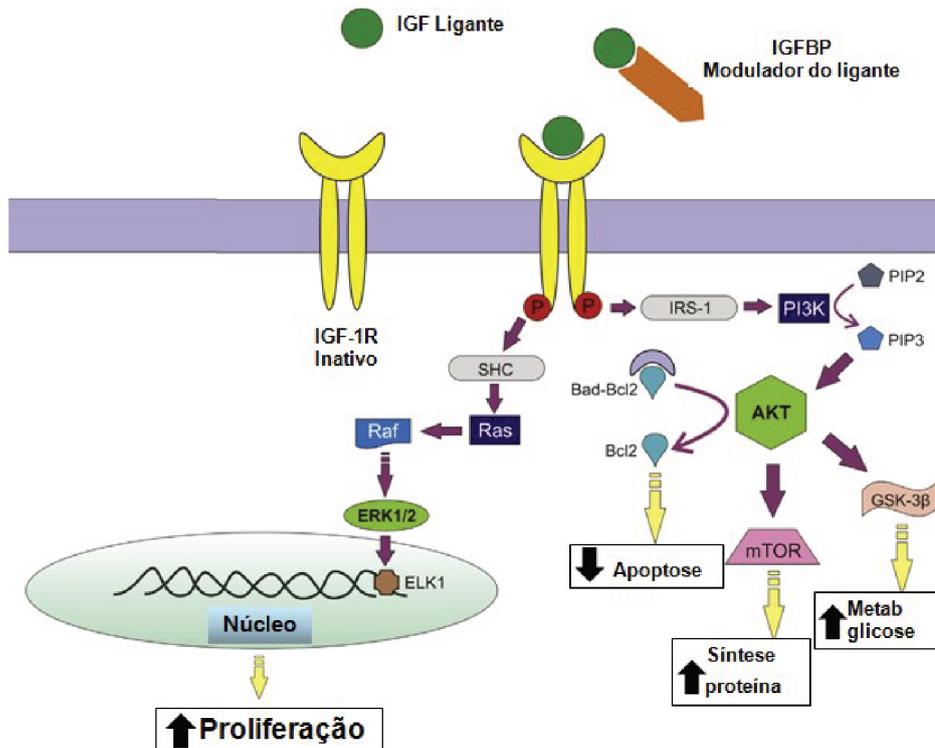
Fonte: modificado de GOODSELL, (2002); SAHA T. et al., (2015).

3.2 Proliferação celular e a via PI3K/Akt/mTOR

Em células tumorais a proliferação é constitutivamente ativa, e pode ser ativada por fatores de crescimento que se ligam a receptores com domínios intracelulares de tirosina cinase (MAYER, A.M. ARTEAGA, C.L, 2016). Entre estes, pode-se destacar o fator de

crescimento IGF (Fator de Crescimento Ligado a Insulina) que em vários tipos de cânceres como, câncer de pâncreas, cólon, próstata, osteosarcoma e mama apresentam sinalização anormal devido a sua ativação constitutiva e levando a perda do controle da proliferação celular (DENDULURI S.K. et al., 2015). O fator de crescimento IGF liga-se ao receptor IGFR1 (Receptor do Fator de Crescimento Ligado a Insulina) produzindo uma série de eventos bioquímicos que culminam na ativação de duas vias de proliferação independente MAPK/ERK e PI3K/Akt/mTOR. Após a fosforilação do receptor IGFR1 ocorre a estimulação da proteína SHC que ativa a proteína Ras e Raf que fosforilam ERK1/2. Esta fosforilação em ERK1/2 direciona a interação com o fator de transcrição ELK1 para transcrição de proteínas para proliferação celular. A via PI3K/Akt/mTOR é ativa após a fosforilação de IFGR1 que propicia a conversão de PIP2 em PIP3 que então realiza a fosforilação da proteína Akt (pAkt). A pAkt fosforila mTOR que sinaliza para a síntese de proteínas de proliferação e manutenção do ambiente de hipóxia. A pAkt eleva a atividade de Bcl2 contribuindo para o desenvolvimento tumoral, através da inibição da formação de complexo com a proteína promotora de morte celular Bad. Além disso, a ativação da proteína GSK3 β (Glicogênio sintasecinase3 beta) por pAkt, favorece a modulação do metabolismo da glicose gerando assim, um ambiente intracelular favorável para a proliferação (Figura 2).

Figura 2- Vias de sinalização de proliferação por IGF estimulando a proliferação celular e metabolismo da glicose.

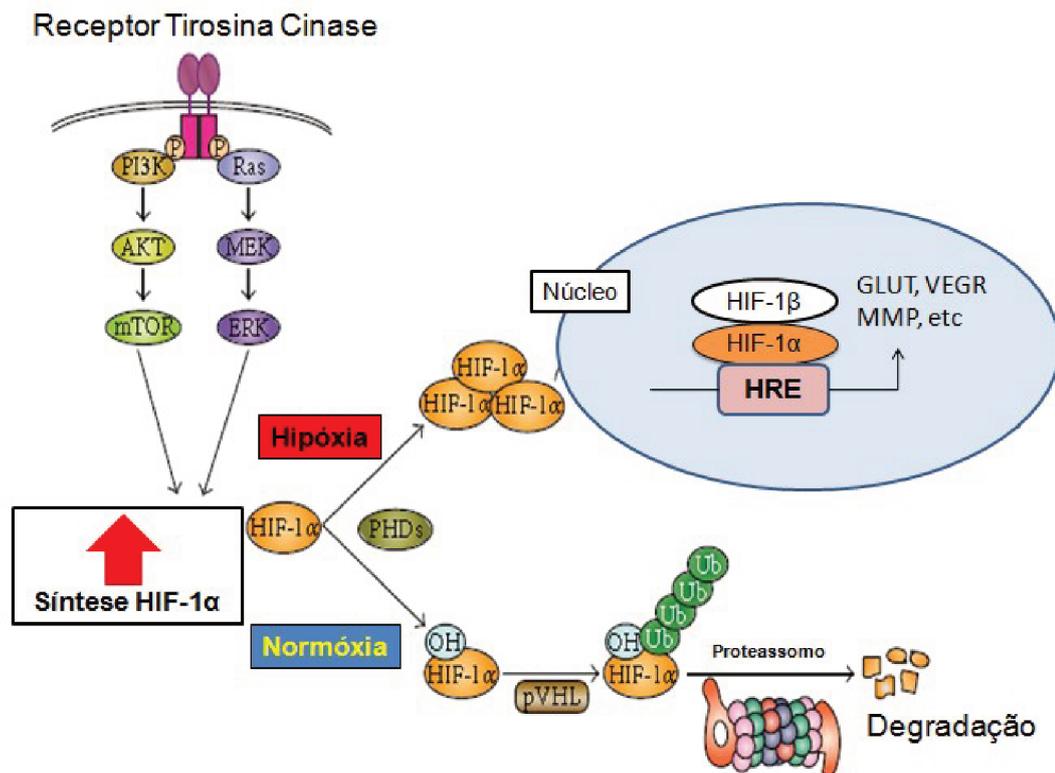


Sinalização de IGF e seus principais efeitos. A ativação do receptor IGF-1R pode ativar vias PI3K /Akt e Ras/MAPK. A ativação de Ras/MAPK leva ao aumento da proliferação celular. A via PI3K/Akt resulta em diminuição da apoptose, aumento da síntese de proteínas e metabolismo da glicose. Este efeito em cascata com aumento de fatores de transcrição, como ELK1, proteínas e modulação do metabolismo, potencializa a promoção tumoral celular.

Fonte: modificado de Denduluri S.K. et al. (2015).

A ativação da Akt por fosforilação (pAkt) promove a síntese de proteínas e fatores de transcrição, onde podemos destacar o HIF-1 α (Fator 1 α de indução de hipóxia), que é protagonista na potencialização da malignidade tumoral. A subunidade HIF-1 α que faz parte de um complexo-chave que media a resposta celular a hipóxia, complexo esse formado também pela subunidade HIF-1 β . O HIF-1 α no ambiente de normóxia têm resíduos específicos de prolina hidroxilados por prolinas hidroxilases (PHDs) que, então formam complexo com a proteína supressora de tumor pVHL (Von Hippel-Lindal). A ligação do HIF-1 α com a pVHL favorece a ubiquitinação do complexo (HIF-1 α / pVHL) direcionando HIF-1 α para a degradação proteossomal.

Figura 3- Mecanismo regulatório de HIF-1 α .



Mecanismo regulatório de HIF-1 α . Após receber estímulo do fator de crescimento, a via PI3K/Akt é ativada, aumentando a síntese de HIF-1 α . Em condições de normóxia a HIF-1 α é poli hidroxilada por PHDs e estabilizada por pVHL (proteína Von Hippel-Lindal), sendo posteriormente ubiquitinada (Ub) e direcionada ao proteassomo para degradação. Em condições de hipóxia a atividade de PHDs é reduzida gerando aumento citosólico de HIF-1 α que por consequência é ativado e translocado para o núcleo formando complexo com HIF-1 β (HIF). Este complexo interage com HRE (elemento de resposta hormonal) aumentando a transcrição de proteínas envolvidas em diversos processos que favorecem a invasão e a metástase, bem como a progressão tumoral para o início da proliferação celular tumoral.

Fonte: modificado de Ueda M., Saji H. (2014).

Com o aumento da hipóxia e menor eficiência das PHDs, ocorre acúmulo citoplasmático de HIF-1 α , que então é fosforilada por MAPK. Após a fosforilação, HIF-1 α é translocado para o núcleo celular formando complexo heterodimérico com HIF-1 β , conhecido como HIF. O HIF, por meio de HRE (elemento de resposta hormonal), liga-se à região promotora dos genes que, após serem transcritos, aumentam a expressão de proteínas de proliferação, reprogramação metabólica (transportadores de glicose-GLUT) e de proteínas envolvidas na metástase (Figura 3). Devignes et al (2017) demonstraram que o aumento de pAkt e HIF-1 α promoveu o avanço de metástase em camundongos, apresentando alta malignidade e prognóstico negativo.

3.3 Ciclo celular e pontos de restrição

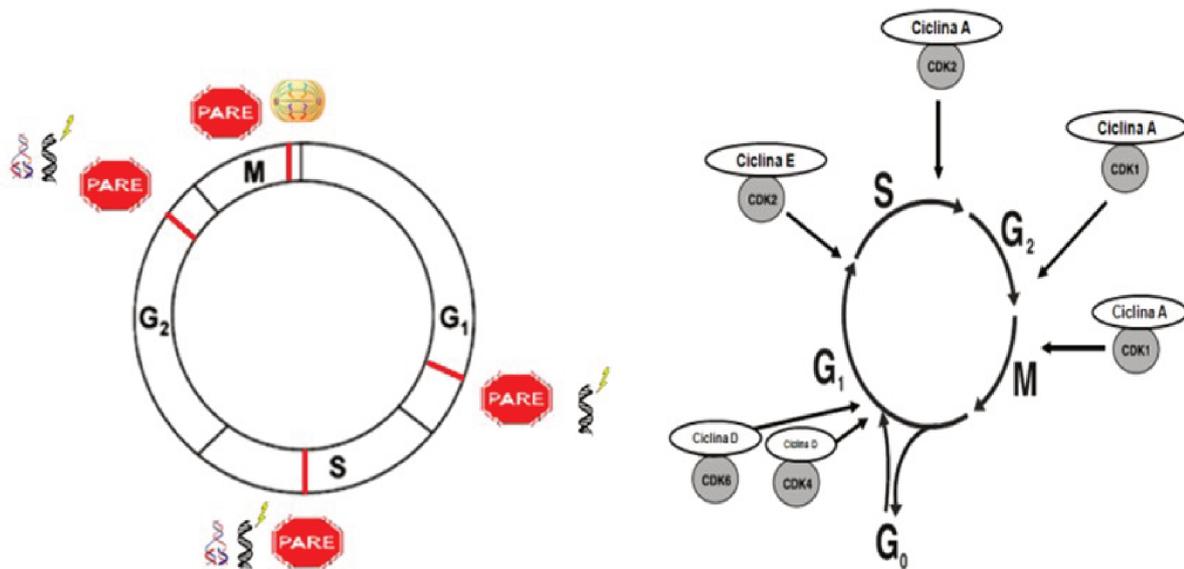
O processo de divisão celular para é um processo altamente ordenado, onde o controle do ciclo celular representa um mecanismo de vigilância com papel bem definido evitando o acúmulo de erros genéticos durante as divisões celulares.

O ciclo celular na maioria dos eucariotos consiste de 4 fases seqüenciais distintas: fase G1 (GAP1), fase S (Síntese), fase G2 (GAP2) e fase M (Mitose). As fases G1, S e G2 são em conjunto denominados de interfase. Na interfase estímulos externos e internos permitem que as células avancem para da fase G0 (quiescência) para a fase G2, iniciando a proliferação. Esta fase é de grande importância, porque é uma fase preparatória para a passagem para a fase S. A fase G1 inicia-se e tem seu prosseguimento após assegurar que condições externas e condições internas sejam favoráveis a proliferação antes que ocorra um grande comprometimento energético (ALBERTS, 2010). Se as condições do ambiente externo não estão favoráveis ao crescimento as células permanecem numa fase de quiescência conhecida como, fase G0 (repouso celular). As células podem permanecer por horas, dias, semanas e até anos nesta fase, antes que a proliferação celular seja novamente ativada. Ao contrário da situação anterior, num ambiente onde há condições externas e há sinais para o crescimento e divisão, as células de G0 avançam para a G1, sendo retidas até um ponto comum chamado de ponto de restrição ou ponto de checagem (Figura 4A, B e C).

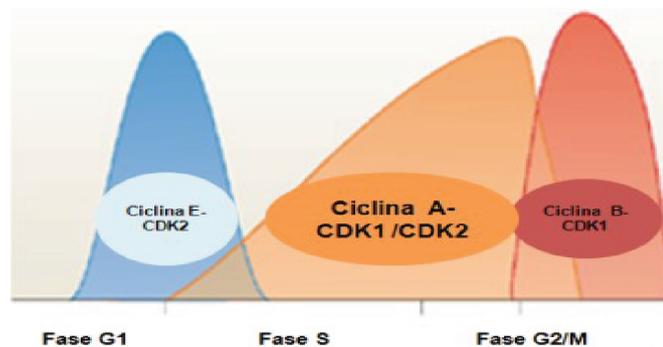
Figura 4- Ciclo celular e seus controles moleculares.

A)

B)



c)



A) Demonstra os pontos de restrição ou ponto de checagem (*check-point*) localizados na fase G₁, S, G₂ e fase M. Estes pontos de restrição verificam danos ao DNA ou problemas na separação cromossomal. B) Exibe o controle realizado entre as ciclinas e as CDKs responsáveis no controle positivo e o controle negativo para a progressão do ciclo celular. C) Exibe a sincronia entre as diferentes fases do ciclo celular relacionando a síntese e a degradação dos complexos ciclina-CDKs como controle da progressão ou inibição do progresso do ciclo. Fonte: modificado de Hochegger e colaboradores, (2008).

A fase G₁ apresenta o primeiro ponto de restrição do ciclo celular, sendo este de grande importância porque verifica a existência de dano ao DNA. Assim, as células que não apresentam nenhuma restrição (dano ao DNA), seguem para a fase seguinte. Já aquelas que apresentam dano ao DNA ficam aprisionadas na fase G₁ até que o reparo aconteça ou até que ocorra a ativação da apoptose (DIAZ-MORALLI et al., 2013).

A fase S do ciclo celular é aquele em que ocorre a replicação do DNA nuclear e, portanto mais um ponto de restrição é adicionado próximo ao final desta fase que tem a função de avaliar dano ao DNA, além de conferir o sucesso na replicação do DNA nuclear (ALBERTS, 2010; SALAZAR-ROA, M. MALUMBRES, M., 2017)

A fase G2 do ciclo celular é tão importante quanto a fase G1, pois é uma fase onde ocorre intensa síntese proteica em preparação para fase M. Como ocorre nas fases anteriores, na fase M existe um ponto de restrição próximo ao seu término. Neste ponto ocorre estímulo para a separação das cromátides irmãs ocorrendo o processo de mitose e como consequência a citocinese. Neste ponto as condições externas e internas são novamente avaliadas para a garantia e continuidade do ciclo celular, observando a possível presença de dano ao DNA e a correta replicação deste. Por conseguinte, as células que passarem por este ponto de restrição, conseguirão progredir a próxima fase. Esta fase tem como características não ocorrer o crescimento celular como nas fases anteriores, porém é o estágio final da proliferação celular (ALBERTS, 2010).

O controle molecular em todas as fases do ciclo celular é dependente de duas famílias de proteínas: as ciclinas e as cinases dependentes de ciclina (CDKs) (Figura 4b) (KASTAN et al., 2004). As CDKs são inativas até o momento que se liga a uma ciclina, tornando-se ativas e capazes de realizar a fosforilação em resíduos de serina/treonina de proteínas de determinadas etapas do ciclo. As ciclinas foram assim denominadas devido à sua periodicidade celular. A síntese de ciclinas e conseqüentemente de CDKs, em estágios específicos do ciclo celular, ordena a finalização da replicação do DNA nuclear e a divisão celular, conforme demonstra a figura 4c (SHERR, C.J. ROBERTS, J. M. 2004; BESSON, A., 2008). A atividade das CDKs é altamente regulada através de vários mecanismos que incluem:

- A abundância das subunidades reguladoras ciclina;
- Associação com a subunidade catalítica CDK;
- A abundância de membros de duas famílias de inibidores de CDK (p16^{ink4a}, p15^{ink4a}, p18^{ink4c}, p19^{ink4d}, p21^{WAF1}, p27^{Kip1} e p57^{kip2}).

Os inibidores de CDKs são formados por duas famílias. A família das INK4 e a família CIP/Kip que são importantes para controle do ciclo celular, pois as INK4 inibem a CDK4 e CDK6, já a família das CIP/Kip, suprimem a atividade da CDK2 (DE FALCO; DE LUCA, 2010; WILLIAMS; STOEBER, 2012). Assim, o sistema de controle do ciclo celular funciona como se fosse uma rede integrada de interruptores bioquímicos, onde o excesso ou a falta de um componente na via pode tornar a mesma ineficiente e inoperante (ALBERTS, 2010).

3.4 Estresse oxidativo e câncer

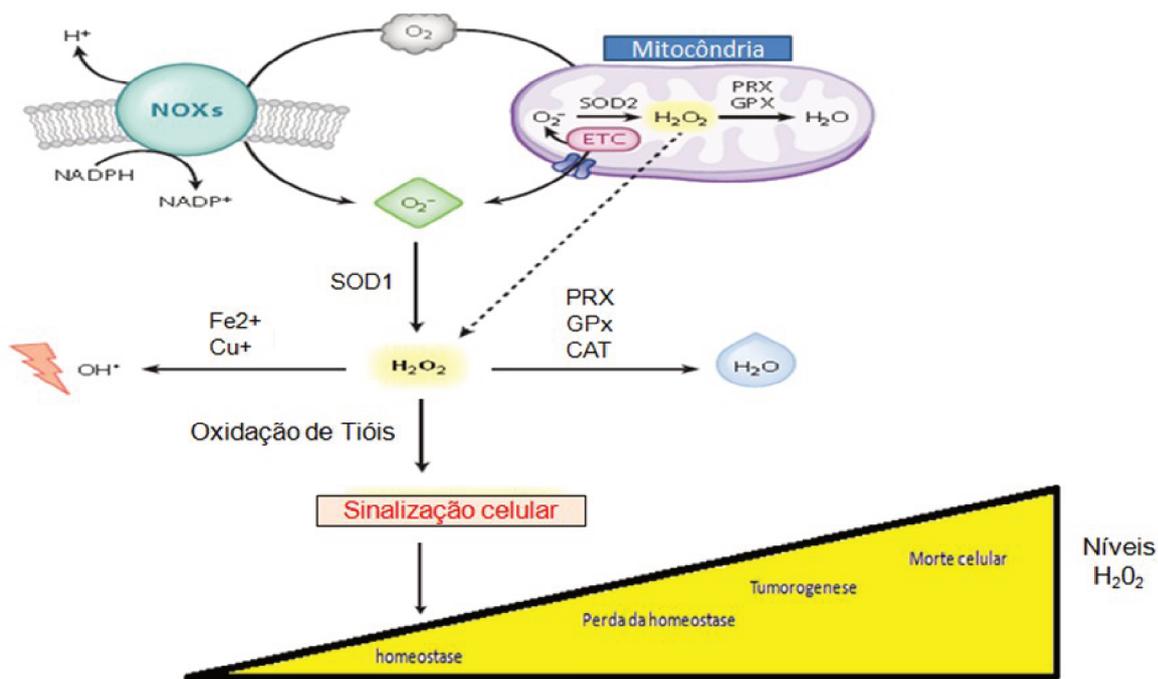
O estresse oxidativo possui um papel importante no processo de carcinogênese. Por ter a capacidade de danificar biomoléculas, incluindo o DNA, muitas vezes o estresse oxidativo é o desencadeador de muitas patologias, incluindo o próprio câncer, porém contrariamente, pode tornar-se um promissor agente terapêutico para esta doença (GORINI et al., 2013).

O estresse oxidativo é caracterizado pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou pela diminuição da efetividade das defesas antioxidantes que podem ocasionar desequilíbrio no estado redox celular (HALLIWELL, 2001; NELSON, DAVID L.; COX, 2014). As ERO, são moléculas oxidantes conhecidas também como radicais livres (exceto o oxigênio singlete e peróxido de hidrogênio H_2O_2) e que apresentam em sua estrutura química o oxigênio, incluindo o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), oxigênio singlete (oxigênio 1O_2), radical hidroxil ($\cdot OH$) e o ácido hipocloroso ($HOCl^{\cdot}$). Moléculas oxidantes quando não neutralizadas, entram em contato com biomoléculas importantes (DNA, proteínas e lipídeos) estabelecendo ligações covalentes e comprometendo a estrutura molecular e a funcionalidade das mesmas.

As ERO estão também associadas à sinalização celular basal, ou seja, são produzidas rotineiramente por células saudáveis, porém em concentrações que praticamente não causam danos à célula. A geração de ERO no estado basal é relacionada com a ativação e/ou inibição de genes importantes para a vida celular sendo capazes de modular a expressão gênica (MITTLER, 2017).

Assim, a ocorrência do estresse oxidativo dependerá principalmente da quantidade de ERO da velocidade de inibição pelo sistema antioxidante (Figura 5). As ERO são produzidas a partir de duas fontes principais: as mitocôndrias (maior produtora de oxidantes celulares) e as NADPH oxidases ligadas à membrana celular (NOX) (MURPHY., 2009; BRAND, 2010; DROSE, S. BRANDT. U., 2012; BRANDES., et al 2014; BREWER et al., 2015; GONÇALVES et al., 2015).

Figura 5- Geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), sua regulação e efeitos.



As duas principais fontes de produção de ERO a nível celular são as NADPH oxidases ligadas a membranas (NOXs) e a função mitocondrial. A superóxido dismutase citosólica (SOD1) converte derivados dos produtores de ERO em peróxido de hidrogênio (H₂O₂). No citosol o peróxido pode ser convertido em água por ação das enzimas peroxidase (PRX), Glutathione Peroxidase (GPx) e catalase (CAT). O H₂O₂ citosólico também pode sofrer ação dos íons Fe²⁺/Cu²⁺ gerando radical hidroxila (OH•) que danifica biomoléculas importantes. A atuação de todo o sistema antioxidante e a produção de ERO gera informações importantes mantendo o controle da homeostase. A redução da geração de ERO leva a perda da homeostase celular e em concentrações exacerbadas desencadeia morte celular.

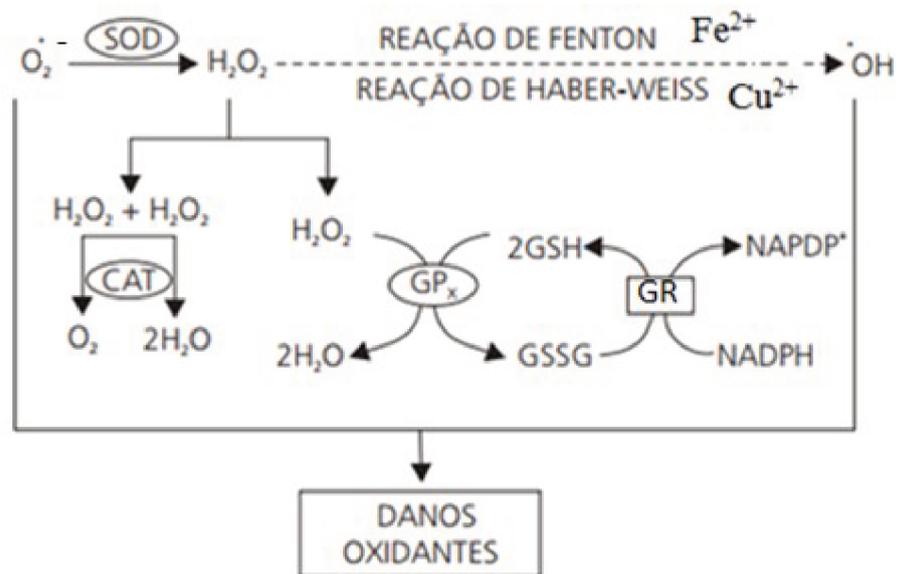
Fonte: modificado de Colleen R et al., 2017.

Nas mitocôndrias o radical superóxido (O₂^{•-}) sofre dismutação pela Superóxido dismutase mitocondrial (SOD2) que então gera H₂O₂. Dentro da mitocôndria as moléculas de H₂O₂ são reduzidas à H₂O pela catalase (CAT) ou Glutathione peroxidase (GPx), que impedem o acúmulo de H₂O₂ intracelular, que mesmo não sendo um radical livre, é igualmente reativo e promove danos celulares. A molécula de H₂O₂ é altamente difusível e atravessa a membrana plasmática utilizando os canais de aquaporinas conseguindo assim, seu acesso ao citosol (BIENERT et al., 2007). No citosol e principalmente nos peroxisomos sofre ação da CAT e GPx que então gera H₂O + O₂.

As NOXs ligadas à membrana utilizam o NADPH como o doador de elétron para gerar O₂^{•-} a partir de O₂, que é rapidamente convertido em H₂O₂ pela SOD, e posteriormente pode ser convertida em H₂O pela ação da CAT ou por ação da GPx. No entanto a ação da GPx

ocorre à custa da conversão da glutatona (GSH) para sua forma oxidada (GSSG). Quando enzimas antioxidantes são ineficientes o acúmulo de H_2O_2 possibilita, por meio das reações de Fenton e/ou Haber Weiss, a geração de $\cdot OH$, contra o qual não existe defesa enzimática, então o dano acontece. (Figura 6).

Figura 6- Geração de ERO por reação de Fenton e sua regulação por defesas enzimáticas.



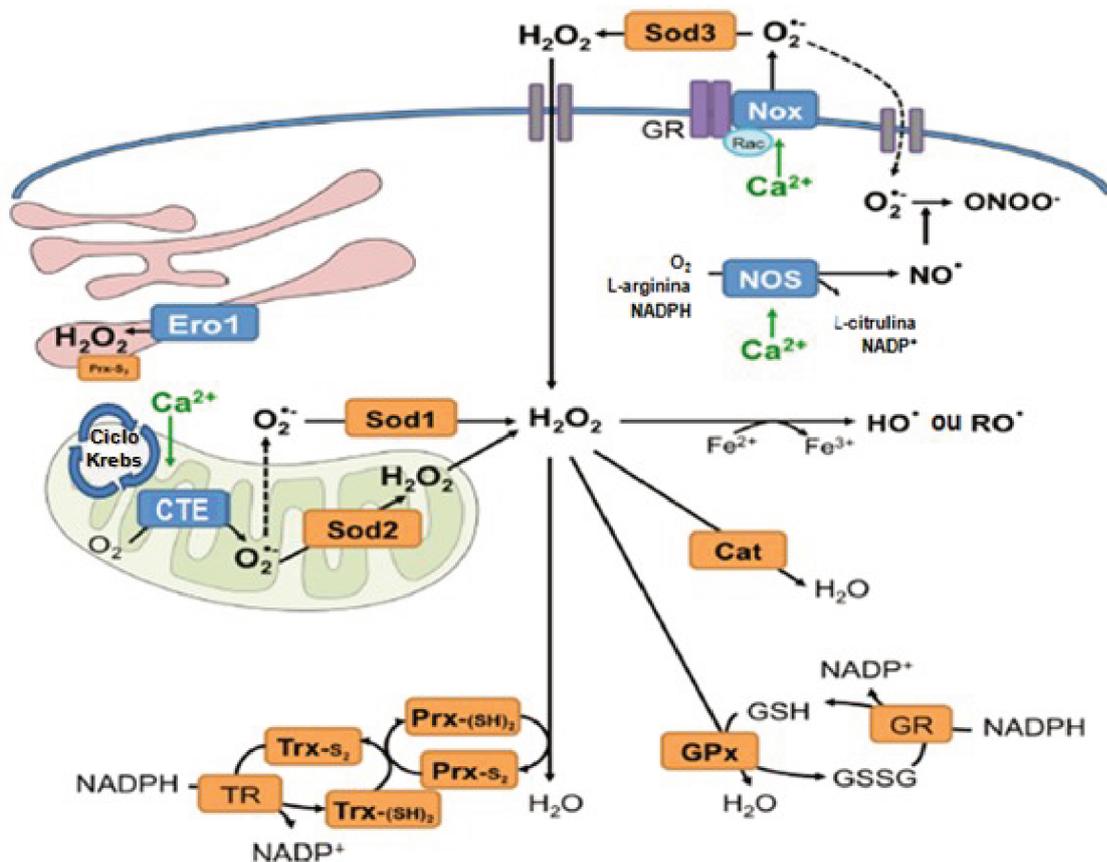
A oxidação da molécula de H_2O_2 através da reação de Fenton e Reação de Haber-Weiss produzem $\cdot OH$, extremamente danoso para macromoléculas sendo causador de danos oxidantes, porém sua inibição pelo sistema antioxidante leva a um controle da produção de ERO.

Fonte: Retirado de Barbosa K.B.F et al., 2010.

Outro componente importante que contribui para a potencialização do estresse oxidativo é o cálcio (Ca^{2+}). O Ca^{2+} está relacionado diretamente com alguns geradores de ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN) conforme a Figura 7 (ALDERTON W.K. et al., 2001; NADINE et al., 2017). Como comentado anteriormente as mitocôndrias e a NADPH oxidases ligadas à membrana são as duas principais fontes de produção de $O_2^{\cdot-}$ que sofrem interferência direta do Ca^{2+} . As enzimas NOX ativada por Ca^{2+} (Nox5, Duox1 e Duox2) são enzimas que formam complexos de sinalização nas membranas celulares, sendo reguladas por uma GTPase Rac, que é ativada por uma série de estímulos, dentre eles o Ca^{2+} (KIM et al., 2015). Estas NADPH oxidases então induzem a produção de $O_2^{\cdot-}$ que rapidamente sofre conversão pela SOD3 em H_2O_2 , caso não sofra dismutação pela SOD este $O_2^{\cdot-}$ entra na célula

sofrendo instantaneamente conversão em peroxinitrito (ONOO^-) pela reação de $\bullet\text{NO}$ (BANFI, et al., 2004; HA, et al., 2009). O Ca^{2+} também pode influenciar diretamente alguns geradores de NOS (NOS1 e NOS3) ocasionando o aumento da produção ERN (Figura 7).

Figura 7- Geração de ERO e o envolvimento do cálcio (Ca^{2+})



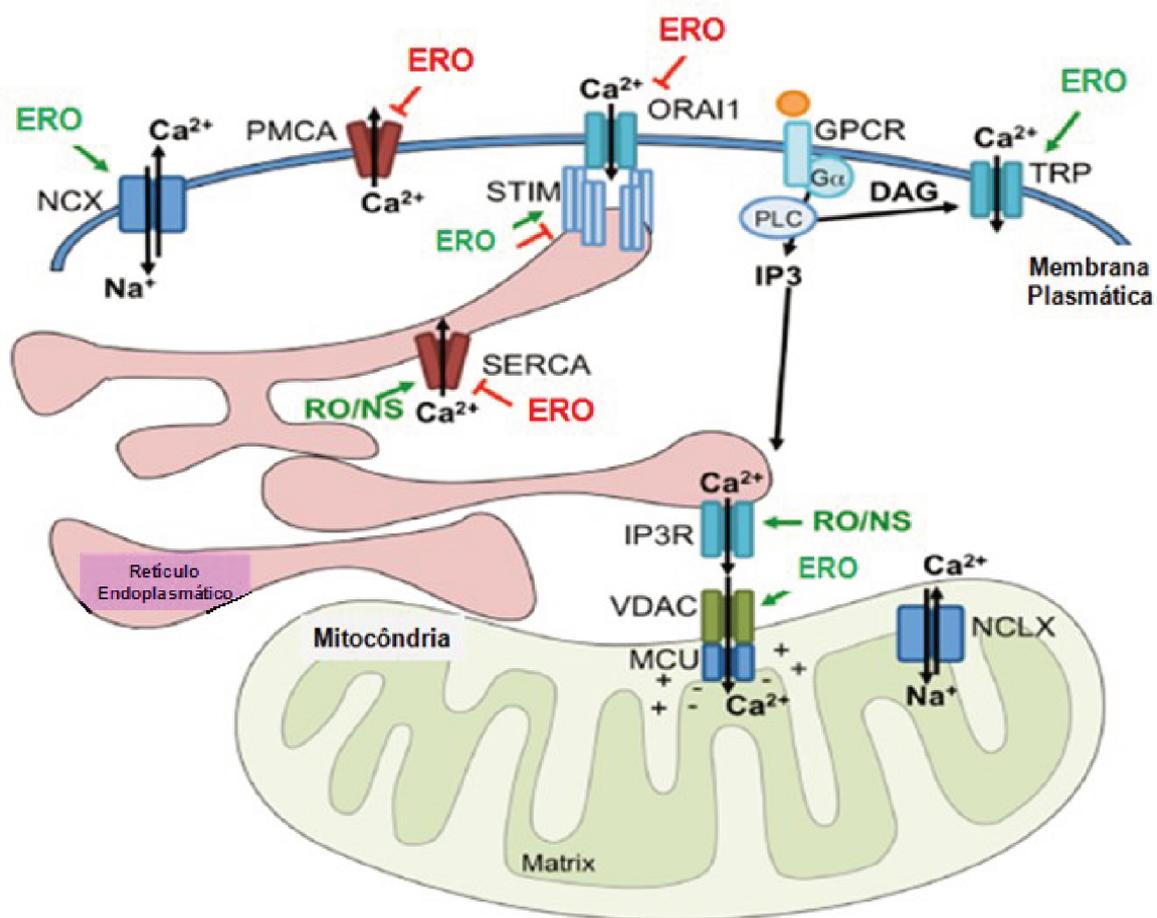
O Ca^{2+} está envolvido diretamente em geradores NOX de ERO e ERNs. Neste mesmo sentido o Ca^{2+} também influencia a produção de ERO por outras vias, por estar envolvido no ciclo do ácido tricarbóxico (Ciclo de Krebs) e na ação de proteínas da cadeia transportadora de elétrons (CTE) sendo essencial para a produção de ATP.

Fonte: Retirado de Nadine et al., 2017.

A mitocôndria também é reconhecida por ser reservatório de Ca^{2+} e ter ação de tamponamento contra a excessiva entrada de Ca^{2+} para o meio intracelular, contendo assim, os canais específicos para Ca^{2+} , que regulam a homeostase da matriz mitocondrial (BABCOCK et al., 1997; RIZZUTO, 2012). O aumento do influxo de Ca^{2+} para a mitocôndria é em grande parte, proporcionado pelo retículo endoplasmático (RE), que também é conhecido por ser um grande reservatório de Ca^{2+} . O RE é um propulsor do influxo de Ca^{2+} para a mitocôndria,

sendo componente fundamental para o aumento do estresse oxidativo mitocondrial aumentando a permeabilidade da membrana proporcionando a liberação do citocromo c, assim iniciando o processo apoptótico (Figura 8) (SZALAI et al., R., 1999; MADESH. et al., 2001; HWANG et al., 2014).

Figura 8- Geração de ERO e o envolvimento do Ca^{2+} em diferentes compartimentos celulares.



As ERO e ERN podem influenciar diretamente na atividade dos canais reguladores de Ca^{2+} que estão localizados em vários locais dentro da célula, dentre eles a mitocôndria. Canais de Potencial de membrana como Receptor Transiente (TRP), ORAI, Ca^{2+} ATPase de Membrana Plasmática (PMCA) bem como a bomba $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), os receptores de Inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3) localizados no RE (IP_3R), além do Ca^{2+} -ATPase (SERCA), bem como o canal de ânions dependente de tensão (VDAC) e Uniporter (MCU) ambos localizados na mitocôndria, respectivamente..

Fonte: Retirado de Nadine et al., 2017.

Nas mitocôndrias o Ca^{2+} pode interferir no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs) e também na cadeia transportadora de elétrons. Na cadeia transportadora de elétrons o influxo de Ca^{2+} contribui para a geração O_2^{\cdot} onde convertido no H_2O_2 pela SOD1 ou pela SOD2, tornando-se uma molécula com grande facilidade de difusão. Com a formação da molécula de H_2O_2 enzimas antioxidantes irão transformá-lo numa molécula não danosa para a célula, a H_2O . Porém quando é exacerbada a produção de ERO e as defesas antioxidantes for menos eficiente será maior o estresse oxidativo e que por conseqüência causa danos lipídicos, proteicos e em ácidos nucleicos, conduzindo à morte celular.

Sabe-se que as células tumorais podem restringir o influxo de Ca^{2+} do meio extracelular e inibir a transferência de Ca^{2+} do ER para a mitocôndria evitando a apoptose e evadindo assim, do processo de controle da morte celular (PINTON et al., 2000; RONG et al., 2009; GIORGI et al., 2012)

Este controle celular tumoral faz-se necessário, pois várias células neoplásicas apresentam irregularidades na atividade das enzimas antioxidantes, as quais podem tornar-se um importante alvo terapêutico para o tratamento do câncer (VAFA et al., 2002; VERRAX et al., 2009; WONDRAK, 2009). Neste sentido o tri peptídeo GSH composto de cisteína, ácido glutâmico e glicina é o principal peptídeo envolvido na defesa antioxidante celular. Além disso, tem sido relatado que o GSH atua no reparo do DNA no ciclo e na sinalização celular. Em muitos tipos de células tumorais o GSH apresenta-se elevado aumentando assim, a resistência ao tratamento quimioterápico e potencializando o insucesso do tratamento terapêutico. Portanto, o aumento de ERO e a depleção de GSH promovem a potencialização da ação citotóxica em células tumorais (WEYDERT et al., 2008). A depleção da GSH pode ser revertida através da utilização do antioxidante N-acetilcisteína que é desacetilada no interior celular, disponibilizando assim L-cisteína que é importante para a síntese de GSH. Neste sentido a utilização de antioxidantes como por exemplo a N-acetilcisteína, não é interessante para o tratamento tumoral, visto sua interferência negativa no processo oxidativo e citotóxico, aumentando a resistência e ineficiência farmacológica.

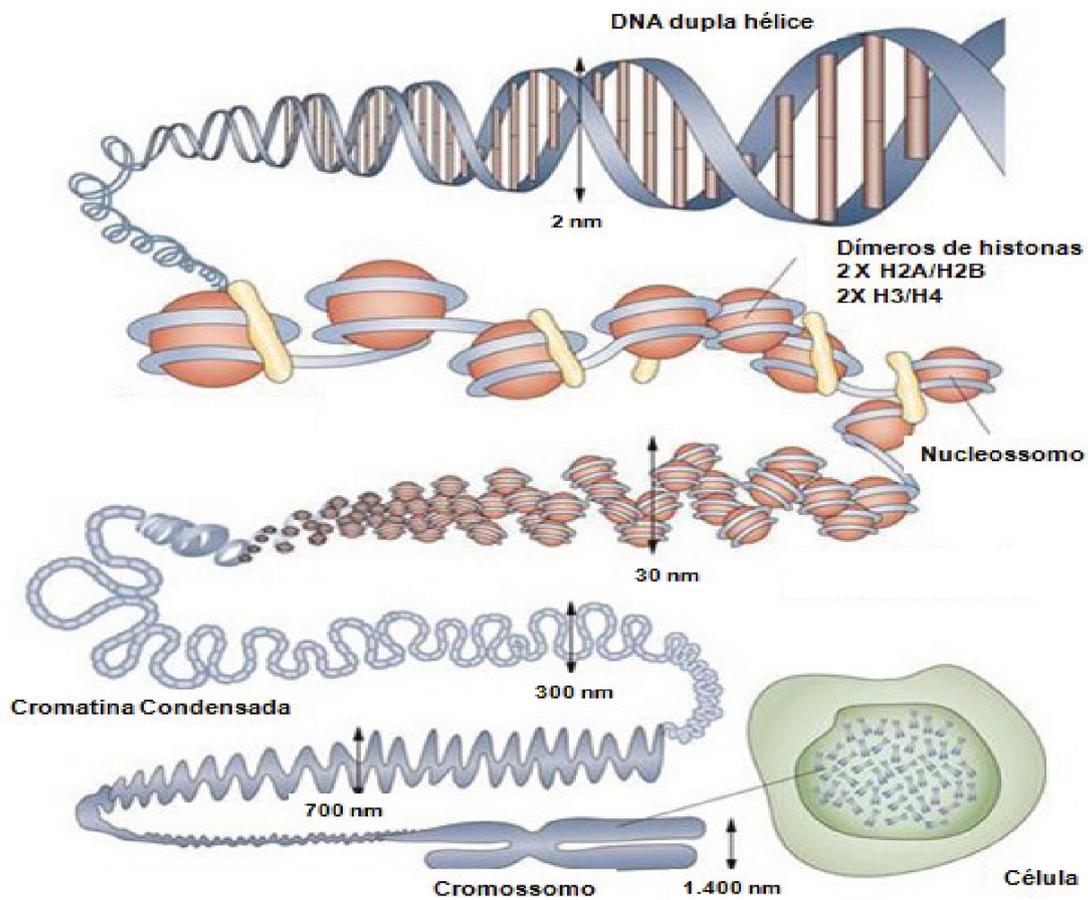
3.5 Dano ao DNA

O ácido desoxirribonucleico (DNA) é a "molécula chave" da informação gênica necessária para a construção das células, tecidos e conseqüentemente, o organismo. A

transmissão adequada destas informações é o que garante a continuidade genética ao longo das gerações e é essencial para o desenvolvimento de um indivíduo (LODISH, 2005).

A molécula de DNA não é uma molécula "solitária", pois normalmente ela está envolta por proteínas que contribuem para sua integridade estrutural e a sua compactação. Sua compactação é importante, pois forma estruturas conhecidas como cromossomos. Além disso, para a importante estabilidade genômica existe uma família de histonas, como por exemplo, as proteínas H2A que formam parte dos nucleossomas (Figura 9).

Figura 9- Representação ilustrativa do genoma humano e suas proteínas integrais.



Estrutura do DNA e proteínas (histonas), demonstrando a compactação do DNA até a formação do cromossomo.
Fonte: Tonna et al. (2010).

A família de proteínas H2A tem um grande número de isoformas com funções variáveis como, H2A1, H2A2, H2AX e H2AZ (AUSIO; ABBOTT, 2002). A proteína H2AX é a única

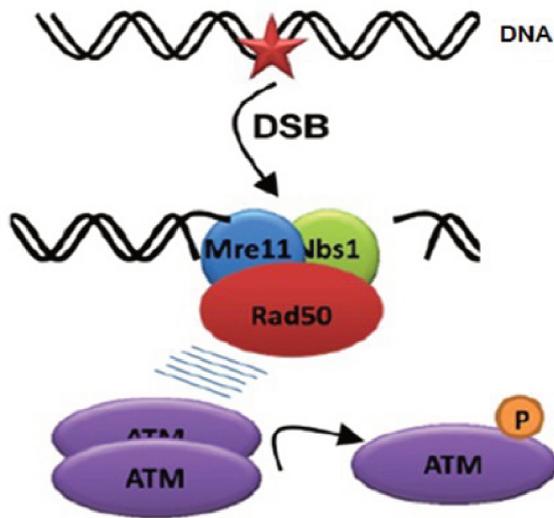
encontrada em eucariotas e tem como função sinalizar a ocorrência de dano da dupla fita do DNA. A resposta de proteínas ao dano ao DNA é uma importante ferramenta que contribui para a continuação do processo fisiológico normal ou no desenvolvimento de um quadro fisiopatológico.

Diversos agentes químicos endógenos ou exógenos podem causar modificações químicas no DNA. Os agentes endógenos são formados pelo próprio metabolismo celular, bem como os danos oxidativo ocasionados pelas ERO. Já os danos exógenos ocorrem quando células são expostas a agentes físicos e químicos como radiações ultravioleta, raios-X, exposição a agrotóxicos, fármacos, tabagismo, dentre várias outras substâncias que podem levar à quebra na dupla fita do DNA inibindo assim, a síntese de proteínas e gerando instabilidade genômica.

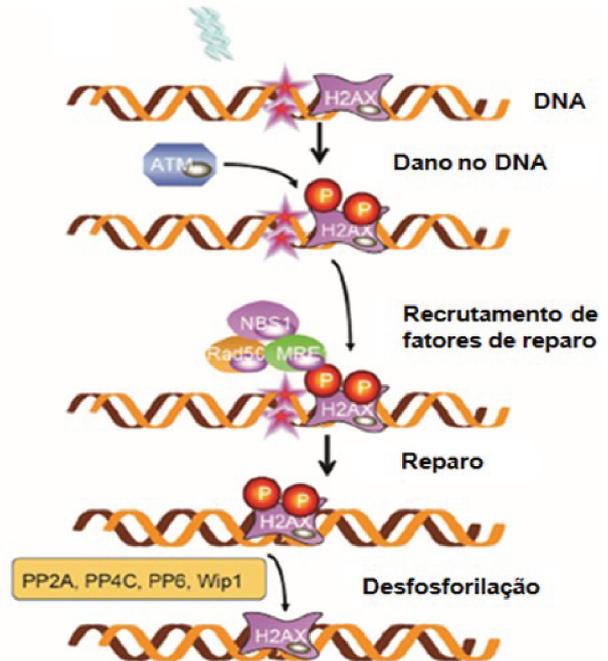
Após o dano ao DNA, principalmente na dupla fita ou DSBs (*Double-strand breaks*), rapidamente a proteína ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) que é uma proteína serina/treonina cinase, fosforilada por um conjunto de outras três proteínas (Mre11, Nbs1, Rad50) (Figura 10a). Posteriormente a proteína H2AX é rapidamente fosforilada por ATM que, passa a se chamar γ H2AX (ROGAKOU et al., 1999). A γ H2AX pode ser fosforilada em Ser 1, acetilada em Lis 5 e ubiquitinada em Lis 119, porém, na presença de danos ao DNA, é fosforilada na serina 139 (ROGAKOU et al., 1998). Após acontecer o reparo do DNA, essa proteína é desfosforilada por um conjunto de proteínas como as fosfatases PP2A, PP4C, PP6 e Wip1 (Figura 10b). Quando este reparo não acontece ou não é bem-sucedida, uma cascata de proteína é ativada para encaminhar a célula para a apoptose.

Figura 10 - Sinalização celular ocasionada pela quebra dupla do DNA.

A)



B)

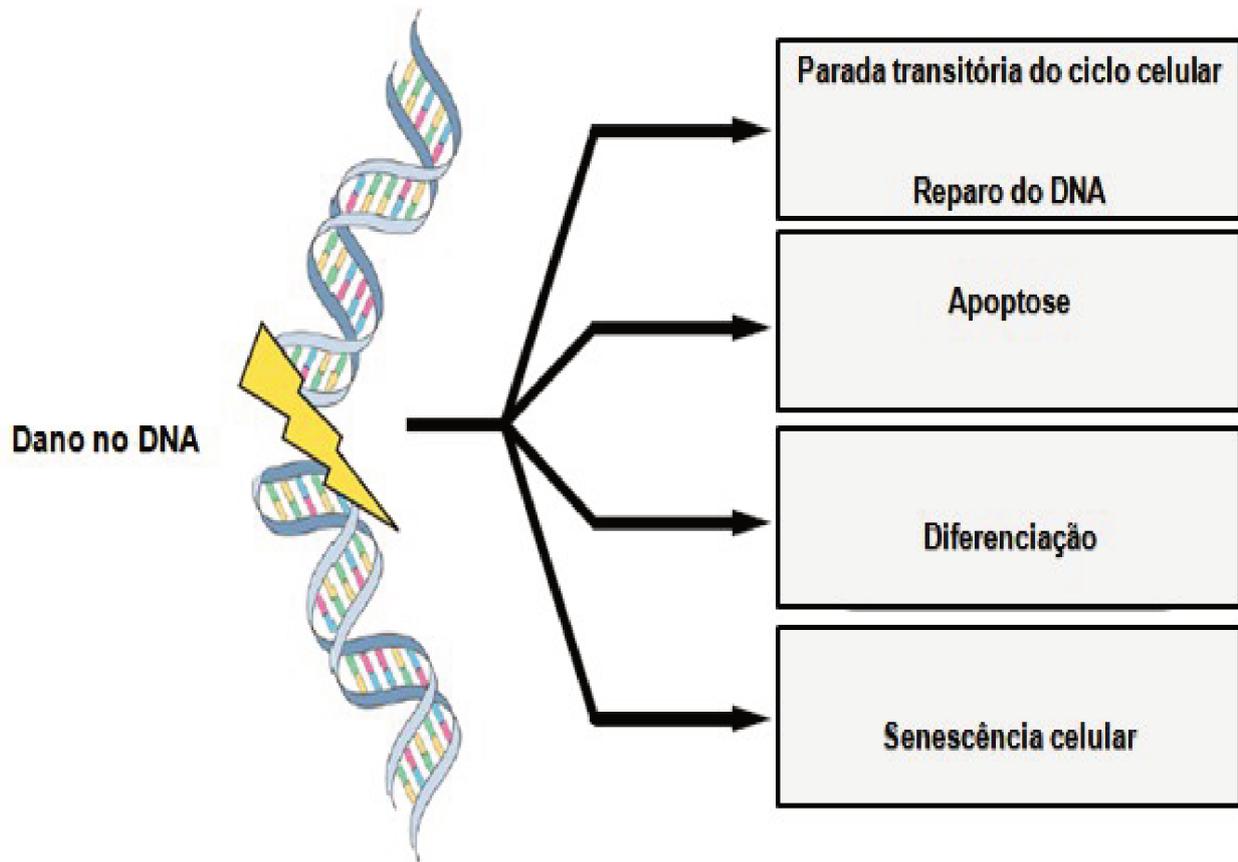


A) Após a dupla quebra (DSB) do DNA ativando o complexo proteico (Mre11, Rad50, Nbs1) produzindo a fosforilação e ativação de ATM. B) ATM fosforila da histona H2AX que sinaliza e recruta fatores de reparo ao local de dano.

Fpnte: A) Modificado de Lopez-Contreras A.J. e Fernandez-Capetillo, O. (2012); B) Cao et al., (2016).

A análise da expressão da γ H2AX é importante porque é um indicativo de quebra na dupla fita do DNA (PODHORECKA, M. et al. 2011). Esta proteína intensifica o sinal de dano ao DNA podendo levar a uma regulação de processos de morte, parada do ciclo celular, inibição da diferenciação e entrada na senescência celular. Tais eventos são produzidos com o objetivo de inibir erros genéticos e a não propagação de células anormais (Figura 11) (MATT, S. HOFMANN, T.G. 2015).

Figura 11 - Respostas ao dano do DNA.



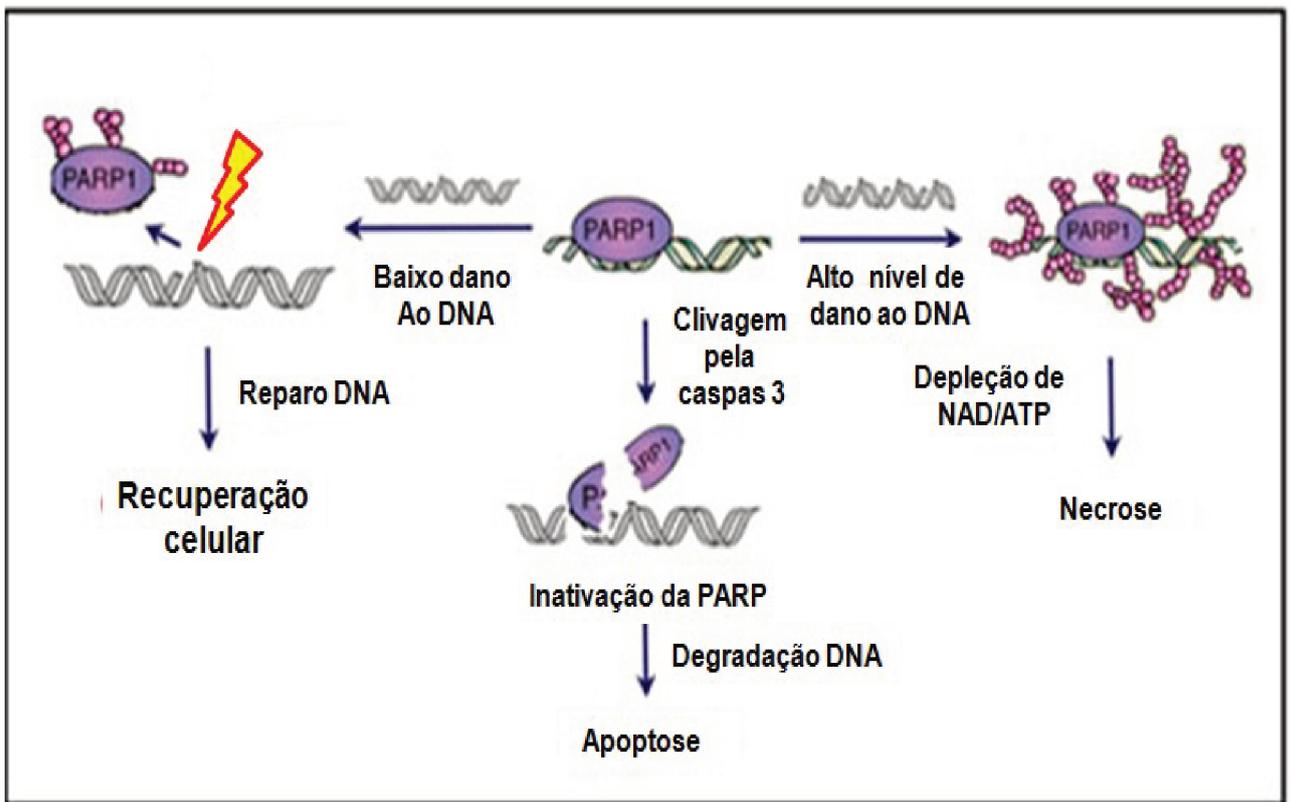
Respostas ao dano ao DNA - coordenação de diferentes resultados celulares como a prisão transitória do ciclo celular e reparo do DNA, morte celular, senescência ou diferenciação celular.

Fonte: Retirado de Matt, S.; Hofmann T.G. (2015).

A análise da expressão da proteína γ H2AX pode ser utilizada com biomarcador dos efeitos genotóxicos de diversas substâncias, além de servir como parâmetros clínicos de toxicidade no tratamento do câncer (TANEJA et al., 2004; DOWNS., 2007).

Após o aumento dos níveis de γ H2AX proteínas de reparo são recrutadas e realizam o reparo do DNA. Uma proteína importante para reparo do DNA é a proteína poli [ADP-ribose] sintase 1 (PARP-1). A PARP-1 é ativada em decorrência de quebras de fita simples que quando esta proteína é clivada a sinalização do resparo é inibida ocorrendo estímulo para a morte celular, como a figura 12.

Figura 12 - Reparo do DNA mediado pela PARP-1.



Reparo do DNA com o recrutamento de PARP-1. Danos ao DNA são reparados pela PARP-1 mantendo a integridade do DNA. Altos níveis de dano ao DNA e depleção de NAD/ATP inviabiliza a ação reparadora da PARP-1 ao DNA. Porém quando a PARP-1 é clivada (inativada) a ação reparadora do DNA pela PARP-1 fica inviabilizada, sinalizando assim, para a apoptose celular.

Fonte: Retirado de Liu (2018).

Cerca de 1% dos danos que acontecem no DNA não são reparados, e o acúmulo de danos está diretamente relacionado ao desenvolvimento de mutações e aparecimento de neoplasias. Estes erros genéticos interferem diretamente na transcrição e tradução correta de proteínas importantes para o crescimento, controle e desenvolvimento celular (TAKAHASHI, A. OHNISHI, T. 2005).

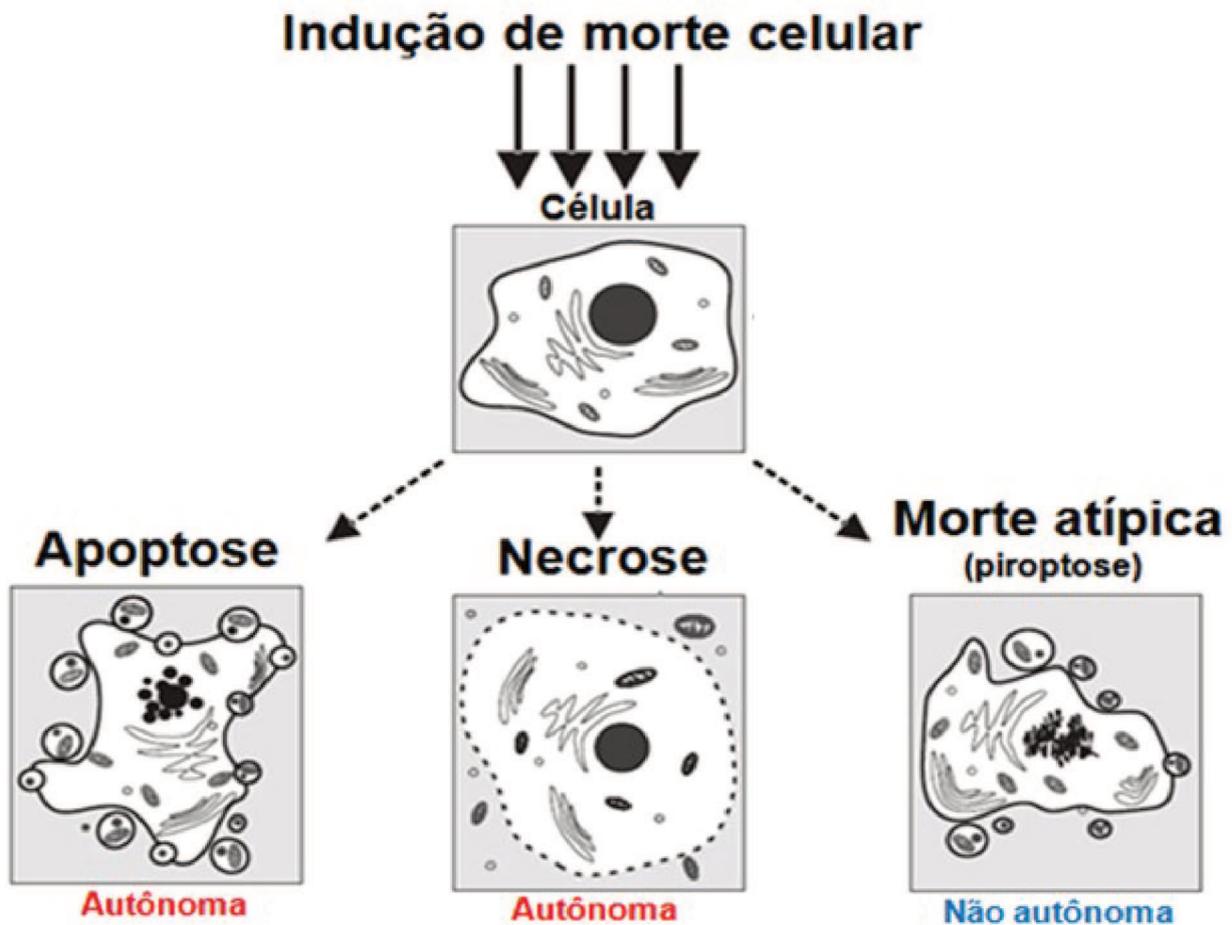
3.6 Diferentes tipos de morte celular

A morte celular constitui um processo muito importante para o desenvolvimento e manutenção da vida de animais e plantas. A morte celular pode funcionar como um processo

de qualidade celular eliminando células potencialmente danosas ao organismo, além disso, funciona como fator preponderante na eliminação de células desnecessárias a vida deste organismo (ALBERTS, 2010).

Classicamente são caracterizados 2 principais tipos de morte por programação celular: apoptose e a necrose. Estes processos de morte celular dependem apenas da autonomia celular, porém algumas outras formas de morte podem ocorrer por vias não autônomas tendo a participação de células vizinhas realizando como, por exemplo, a entosi (canibalismo celular) e piroptose (Figura 13) (WALTON, 2017).

Figura 13 - Os diferentes tipos de morte.



Classificação dos tipos de morte celular autônoma e não autônoma.

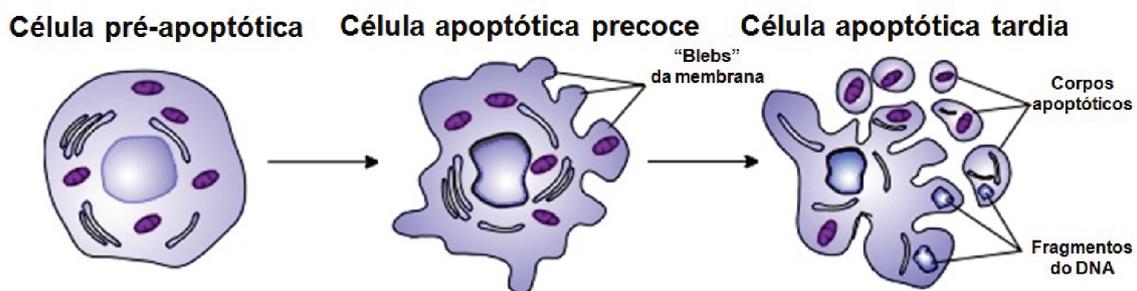
Fonte: Retirado de Walton, 2017.

3.7 Apoptose Celular

A apoptose, também conhecida como morte celular programada (MCP), tem características distintas em diferentes eventos morfológicos e bioquímicos, com contração da membrana plasmática, condensação da cromatina, evaginação da membrana plasmática, fragmentação do DNA e sinalização através do fosfolípídeo fosfatidilserina usado para sinalizar a fagocitose. Podemos distinguir cada estágio de uma célula que entra em apoptose por aspectos morfológicos importantes, como a formação de "blebbing" da membrana, indicando uma célula apoptótica em estado precoce de morte. Já uma célula com apoptose tardia caracteriza-se principalmente pela formação de corpos apoptóticos e pela expressiva fragmentação do DNA (WALKER et al., 1988) (Figura 14).

A apoptose é um evento em cascata, sendo completamente regulada. Esta cascata de eventos inicia-se com a ativação de proteínas que compõem a família de proteínas das cisteíno-proteases mais conhecidas como caspases. Essas enzimas podem ser classificadas como caspases iniciadoras (iniciam o processo) ou caspases efetoras (efetivam a morte celular). Tal cascata de evento é importante para o controle da proliferação e morte, mantendo assim, a homeostase entre células vivas e células marcadas para morrer (WALKER et al., 1988) (Figura 15).

Figura 14 - Morfologia celular durante o processo de apoptose.



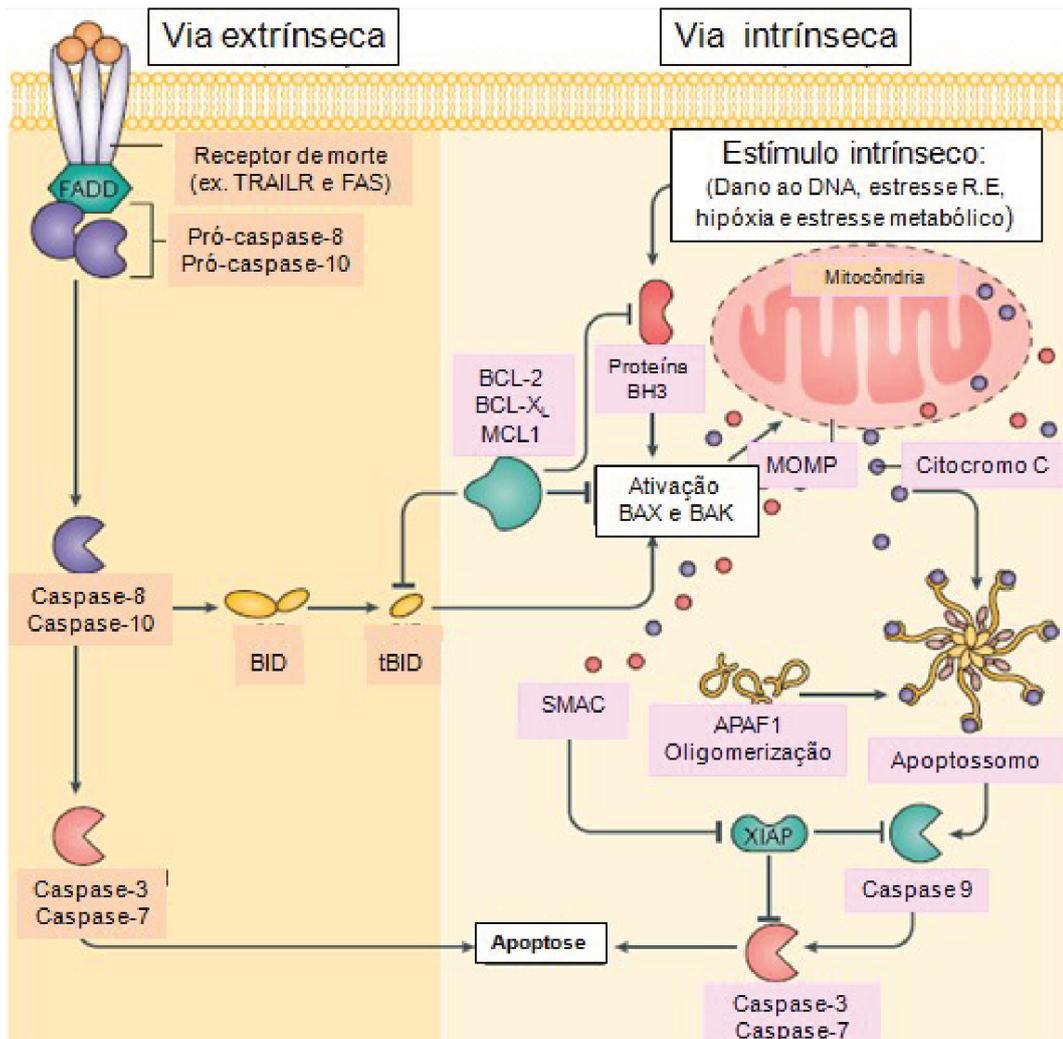
Fonte: Modificado de Walker et al., 1988.

A ativação das caspases pode ocorrer por três vias distintas, via extrínseca (ou receptor de morte) e via intrínseca (ou mitocondrial), ambas levam a uma via comum final para a execução da apoptose. Uma terceira via distinta, porém, pouco conhecida, é a via intrínseca do retículo endoplasmático (WONG, 2011).

Vários receptores de morte já foram descritos, porém o mais estudado é o receptor TNFR1 que tem como ligante o TNF. A ligação do TNF ao receptor resulta na formação de um sítio de ligação de proteínas adaptadoras (TRADD, FADD), ocorrendo o recrutamento de pro-caspases 8 e 10 são recrutadas formando um complexo proteico. Este complexo formado pelo domínio transmembranar da proteína TNFR1 com as proteínas adaptadoras e as pró-caspases é conhecido como Complexo Indutor de Morte (DISC). Este complexo inicia a ativação das caspases através da clivagem das pró-caspases 8 e 10, tornando-as ativas, as quais promovem clivagem e a ativação de caspases efetoras (caspase 3). Neste sentido, estas caspases têm caminhos distintos, enquanto a caspase 8 atua clivando e ativando as caspases 3 e 7, a caspase 10 atua ativando o agonista da morte (BID) aumentando a permeabilidade mitocondrial e inibindo proteínas anti-apoptóticas como BcL-2, BcL-X_L, Mcl-1. Quando tBID ativa proteínas pró-apoptóticas (BAX, BAK) presentes na membrana mitocondrial e levando a formação de poros que favorecem a saída do citocromo c para o citossol, inviabilizando assim produção de ATP pela organela (Figura 15). O BID permite a conexão entre a apoptose extrínseca e intrínseca.

A via intrínseca da apoptose pode ser estimulada por dano ao DNA, estresse do retículo endoplasmático, concentrações elevadas de Ca⁺², hipóxia e estresse metabólico. Estes estímulos propiciam o aumento da permeabilidade da mitocôndria (MOMP) acarretando no extravasamento da proteína pró-apoptótica citocromo c. No citoplasma o citocromo c associa-se a Apaf-1, pró-caspase 9 e ATP formando o apoptossomo desencadeando a apoptose (Figura 15) (ICLIM, G, TAIT, S.W. 2016).

Figura 15 - As principais vias de sinalização para apoptose



Via de sinalização para a apoptose pela via extrínseca através de receptor de morte celular que ativa as pró-caspase 8 e 10 que, por sua vez, ativam as caspases-3 e 7 efetivando a morte por apoptose. A via de sinalização intrínseca acontece quando dano ao DNA, estresse do retículo endoplasmático, hipóxia ou estresse metabólico são responsáveis pelo aumento de níveis de BAX/BAK levando assim, à liberação do citocromo c o qual ativa uma cascata de eventos que culmina na ativação das caspases-3 e 7, efetivando a morte celular por apoptose.

Fonte: Modificado de Iclim, G e Tait, S.W., 2016., 2016.

3.8 Necrose

A necrose é classificada como uma MCP do tipo III que classicamente, é uma morte mais "danosa" ao microambiente celular, quando comparado as MCP do tipo I e II. Esta tem por características morfológicas o inchaço celular, degradação irregular do DNA, disfunção

de organelas e lise celular (MCCALL, 2010; WU et al., 2012). A morte celular por necrose, quando não programada, tem como resultado uma morte catastrófica ocasionada normalmente por condições externas ou fisiopatológicas como, por exemplo, calor, agentes químicos, anóxia, inflamação, infecção e isquemia. Esta forma passiva de morte celular (necrose) é diferente da MCP do tipo III, por não utilizar mediadores de ativação de morte, gerando assim, grande sinalização pró-inflamatória sendo resultado do extravasamento do material intracelular para o ambiente extracelular (EDINER A.L; THOMPSON C.B., 2004).

É importante salientar a existência de uma relação íntima entre MCP I e a MCP III no processo de morte celular programada. Nesta relação íntima os mesmos receptores de morte (TNF α , FasL e TRAIL), podem ativar MCP I e MCP III mas é a atividade das caspases que faz a diferenciação entre estes processos de morte celular (KISCHKEL et al., 1995; KAWAHARA et al., 1998). Atualmente já são conhecidos e caracterizados alguns outros tipos de MCP do tipo III como, por exemplo, ferroptose, piroptose e necroptose. A ferroptose é uma morte celular necrótica dependente de ferro e que pela capacidade de gerar ERO, atua depletando a GSH e, posteriormente desencadeando a peroxidação lipídica causando danos irreversíveis à célula. A piroptose é uma morte atípica, porém, acontece principalmente em resposta a patógenos intracelulares, promovendo ativação em massa de fagócitos. A ativação da piroptose sistêmica pode contribuir para piorar o quadro geral do organismo e promover a ocorrência de sepse. (JORGENSEN, I. MIAO, E.A., 2015; YANG W. S; STOCKWELLB.R, 2016). A necroptose é uma morte programada do tipo necrótica sendo ativada pelo receptor de morte TLR (*Toll-likereceptor*), provocando uma resposta imune potente para ajudar na eliminação de mutações causadoras de tumor e eliminação de patógenos (vírus, bactérias e fungos) (HERNANDEZ et al., 2016; KRYSKO et al., 2017).

3.9 Terapia do Câncer

Na atualidade, os principais tratamentos para o câncer são cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal e imunoterapia. É importante notar que o tratamento do câncer exige uma análise cuidadosa caso a caso sempre evidenciando o bem-estar do paciente e eliminação completa do tumor. Geralmente, devido ao aumento da resistência das células tumorais frente a determinados fármacos, tem a necessidade de realizar terapia combinada, diminuindo assim, a chance de insucesso contra o tumor (INCA, 2018; WHO, 2018).

O procedimento cirúrgico é importante para contenção do tumor objetivando a extração total de células tumorais, porém existem casos onde o procedimento cirúrgico não é

recomendado ou muitas vezes o local não é acessível para a retirada do tumor. Assim, a terapia sistêmica é a mais utilizada contra células tumorais, estes quimioterápicos são essenciais no combate das mesmas, porém estes apresentam efeitos colaterais graves que em muitos casos também podem ser letais (NIH, 2018). Como exemplo de quimioterápicos clássicos para o tratamento de alguns tipos de câncer, podemos citar a doxorubicina (DOXO) e o metotrexato (MTX) como tratamento de neoplasias. A DOXO é indicada para o tratamento contra vários tipos celulares neoplásicos, incluindo alguns tipos de linfomas, carcinoma de mama, osteosarcoma, câncer de bexiga e carcinoma de ovário. O mecanismo de ação da DOXO inclui a interação com o DNA através da Topoisomerase II, além da geração de ERO (WHO, 2015). O MTX é um fármaco antimetabólico que é amplamente utilizado para o tratamento de vários tipos de cânceres, porém também é utilizado para alguns tipos de doenças auto-imunes. O MTX é um análogo do ácido fólico que atua inibindo competitivamente e irreversivelmente a diidrofolato redutase (DHFR) enzima importante nos mecanismos de síntese, reparo e replicação do DNA (CHIBBER et al., 2011). Apesar da eficácia terapêutica anti-tumoral destes dois fármacos, muitos efeitos adversos graves são provocados por ambos, tais como: cardiotoxicidade (ocasionada pela DOXO), nefrotoxicidade e hepatotoxicidade ocasionada por ambos. No caso do MTX os efeitos colaterais ocorrem principalmente pela inibição de enzimas importantes, através da depleção de NADPH, o que induz ao aumento do estresse oxidativo (VOGEL et al., 1963; PRZYBYTKOWSKY E, BATES-AVERILL., 1996)

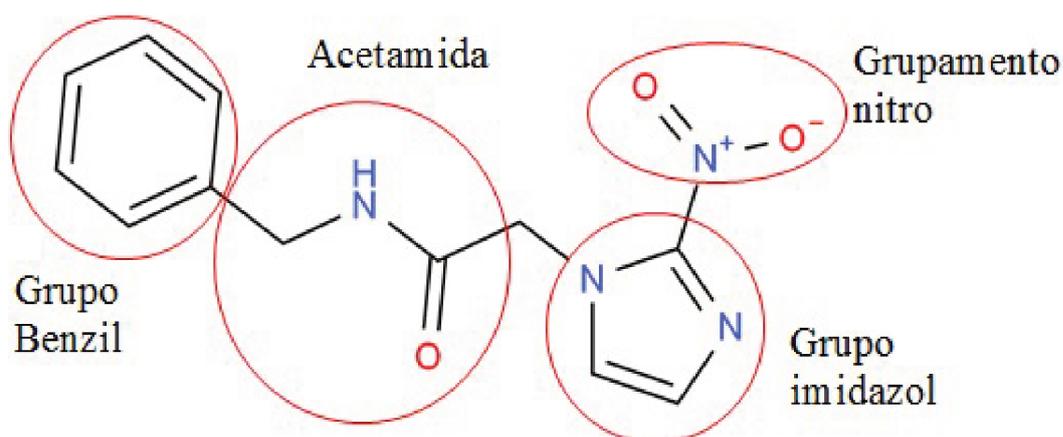
Alguns tratamentos inovadores como a imunoterapia e terapia-alvo estão conseguindo boas respostas contra determinados tipos de tumores, porém são pouco viáveis economicamente para a maior parte da população brasileira. Neste sentido, um "movimento" que ganha muita força na pesquisa farmacêutica é a reposição de fármacos. Este movimento visa o reaproveitamento de fármacos através da busca de uma segunda indicação clínica, tendo como característica a redução dos custos de desenvolvimento de novos fármacos e tornando estes viáveis economicamente para a maior parte da população (EMMERT-STREIB et al., 2013).

Assim, para o reaproveitamento de fármacos contra o câncer se faz necessário o conhecimento das principais características farmacológicas (fármaco), biológicas e bioquímicas em células tumorais, direcionando, para um alvo terapêutico com o objetivo de atingir seus pontos fracos viabilizando assim, maior chance para o sucesso terapêutico e menor efeito colateral (CASTRO et al., 2016; ZEFERINO et al., 2019).

3.10 Benzonidazol

O *N*-benzil-2-nitro-1-imidazol-acetamida também denominado como Benzonidazol (BZN) é um antiparasitário utilizado para o tratamento da doença de Chagas que tem uma taxa de eficácia de aproximadamente, 80% quando administrado na fase aguda da doença. O BZN é composto por uma molécula com três fragmentos planares constituídos pelo grupo imidazol, grupo benzil e pelo fragmento acetamida (Figura 16) (BUSCHINI et al., 2007). É um composto nitro heterocíclico com peso molecular de $260,25\text{g mol}^{-1}$, sendo um pó cristalino, levemente amarelado, insípido e estável em contato com o ar. É pouco solúvel em água, porém solúvel em dimetilsufóxido (DMSO), e possui uma temperatura de fusão de 188°C a 190°C (Farmacopéia Brasileira, 2003).

Figura 16 - Estrutura química do Benzonidazol



Fonte: Adaptado de Chembase.cn (CID 31593) (acesso em 20/05/2018 às 14:00 horas. <http://en.chembase.cn/molecule-146922.html>).

A dose terapêutica do BZN proposta para adultos para o tratamento da doença de Chagas é de 5-7mg/kg/dia por via oral durante 60 dias. Porém, para crianças o tratamento recomendado é de 5-10mg/kg/dia, também por via oral. As duas propostas de posologia são de duas ou três administrações diárias, dependendo da reação individual de cada paciente (Ministério da Saúde, 2005).

No ano de 2003, o controle da síntese do BZN da indústria farmacêutica Roche foi transferido para o governo brasileiro (Laboratório Farmacêutico LAFEPE, Pernambuco, Brasil, sendo transferidos também os direitos e a tecnologia de fabricação do Rochagan[®] (Benzonidazol).

O BZN por via oral é quase totalmente absorvido pelo trato-gastrointestinal, tendo sua ligação plasmática com a albumina sérica atingindo 44%, com concentração plasmática máximo de 2,22 a 2,81µg/mL num espaço de tempo de 2 a 4 horas. Sua meia vida plasmática é de aproximadamente 12 horas sendo que seus metabólitos são excretados pela urina e fezes. O BZN é metabolizado pelo sistema citocromo P450 através das enzimas xantinas oxireductase e aldeído-oxidase. No sistema citocromo P450, o BZN é biotransformado pela nitroreductase tipo I dependente de NADH e gera glioxal, porém quando biotransformado por nitroreductase do tipo II na presença de oxigênio, a geração de ERO é favorecida (BARTEL et al., 2010; RIGALLI et al., 2012)

O mecanismo de ação do BZN ainda não está totalmente elucidado, porém existem estudos mostram que o mesmo atua formando ERO e/ou metabólitos nucleofílicos. Este processo inicia-se com a reação catalisada pela NADPH-citocromo P-450 reductase, que atua sobre o grupo nitro da molécula de BZN (R-NO₂) levando à formação de radicais intermediários (R-NO₂[·]). Paralelamente, o O₂ é reduzido originando O₂^{·-} pela transferência de um elétron para o O₂ sob a ação da NADPH desidrogenase. A produção de H₂O₂ ocorre por dismutação do O₂^{·-}. Por fim, o O₂^{·-} e o H₂O₂, na presença do íon férrico formam o radical HO[·] (TEMPERTON et al., 1998; PEDROSA et al., 2001). Os radicais livres produzidos atuam sobre o DNA, proteínas e lipídeos levando a danos oxidativos importantes para as macromoléculas biológicas (URBINA; DO CAMPO, 2003).

Alguns trabalhos têm demonstrado a capacidade do BZN de rearranjar e contribuir para a completa eliminação (infecção aguda) do parasita com a contribuição essencial da resposta imune. Esta capacidade de modular a resposta imune mostrou ser importante para controlar a morbidade humana na fase aguda e crônica desta parasitose (SATHLER-AVELAR, R. et al., 2006; LAUCELLA, S.A. et al., 2009)

Pelo exposto anteriormente, o BZN surge como fármaco promissor para atuar como agente antineoplásico, sabendo que muitos tipos celulares tumorais tendem a ter defesas antioxidantes irregulares tornando viável a indução de estresse oxidativo letal como estratégia de morte de células neoplásicas. Assim, o BZN torna-se, um importante protagonista para possível reposição de fármaco no tratamento do câncer.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Os antibióticos foram adquiridos na Gibco (EUA). Benznidazol (BZN, PubChem CID: 31593), NAC (N-acetilcisteína), 5,5'-ditio-bis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB), iodeto de propídio (PI), coquetel inibidor de protease, peróxido de hidrogênio, tricloroacético ácido, ácido tiobarbitúrico, NADPH, epinefrina e metotrexato foram adquiridos na Sigma Aldrich (Brasil). O cocktail inibidor da fosfatase utilizado foi da Calbiochem (Merck Biosciences). Os anticorpos contra CDK2, Ciclina A, p53, PARP, BAX, γ H2AX, Akt1, pAkt1, Bcl-xL, HIF-1 α , GLUT-1 e foram obtidos de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (EUA), enquanto anticorpos contra mTOR e p-mTOR foram adquiridos na Cell Signaling Technology (EUA). O anticorpo de camundongo contra β -actina era de Millipore (EUA) e Santa Cruz Biotechnology, Inc. (EUA). Os anticorpos secundários e o kit para detecção por quimioluminescência de anticorpos acoplados a HRP eram da Millipore (EUA) e o kit de solução PI/RNase era da Immunostep (Salamanca, Espanha).

4.2 Animais

Camundongos isogênicos machos BALB/c (*Mus musculus*) (20 ± 2 g de peso), com idade aproximada de 60 dias, foram obtidos de uma instalação de reprodução controlada no Laboratório de Bioquímica Experimental (LABIOEX), CCB, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil. Os animais foram pesados, divididos em grupos e mantidos em gaiolas plásticas em condições controladas (ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura de 22 ± 2 °C e umidade de 60%), recebendo comida comercial autoclavada e água ad libitum. Seis animais foram mantidos em cada gaiola e as gaiolas foram limpas duas vezes por semana. O estudo com animais seguiu as diretrizes do National Institutes of Health Guide para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (NIH Publications No. 8023, revisado em 1978). O protocolo experimental foi previamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal

(CEUA; UFSC PP00784). Para minimizar o sofrimento dos animais e melhorar a qualidade de vida dos animais experimentais, foram utilizados parâmetros humanos. Os parâmetros utilizados foram > 75% de ganho de peso ou > 25% de perda de peso, variações de $\pm 2^\circ \text{C}$ na temperatura corporal ou alterações no comportamento das espécies, status de epilepticus e hemi-paralisia (MORTON, 2000; WALLACE, 2000)

4.3 Inibição do crescimento tumoral *in vivo* do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) e sobrevivência dos animais

A indução do tumor foi realizada inoculando animais com 200 μl de meio contendo 5×10^6 células do Tumor ascítico de Ehrlich (TAE). Vinte e quatro horas após a inoculação do tumor, os camundongos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos ($n = 6$) para análises bioquímicas e celulares, e em quatro grupos para a análise da sobrevivência animal ($n = 12$). Os tratamentos duraram nove dias e consistiram em injeções intraperitoneais, de acordo com cada grupo: Grupo 1 (controle negativo) recebeu 1% de DMSO (veículo de diluição); O grupo 2 recebeu N-acetilcisteína-NAC a 200 mg/kg/dia; O grupo 3 recebeu 10 mg/kg/dia de BZN e o grupo 4 recebeu 200 mg/kg/dia de NAC + 10 mg/kg/dia de BZN. NAC é um antioxidante importante que bloqueia o efeito de ERO gerado pelo BZN (SANTRA et al., 2007). Outra estratégia experimental utilizada foi a utilização de 3 grupos sendo, grupo 1, Controle negativo (1% DMSO); grupo 2, metotrexato (2.5 mg /kg/dia) e BZN 10 mg/kg/dia. A dose de BZN foi escolhida com base em estudos anteriores, considerando o ponto máximo de solubilização e a baixa toxicidade desse medicamento. A circunferência abdominal e o peso de todos os animais foram medidos no décimo dia. Os camundongos ($n=12$) de cada grupo foram mantidos vivos para determinar o tempo de sobrevivência e os animais jovens BALB/c sem TAE foram considerados padrão para 100% de sobrevivência por 30 dias (MEIER e KAPLAN, 1958).

4.4 Atividade Antiangiogênica

A atividade antiangiogênica do BZN foi medida em animais inoculados com TAE, de acordo com os grupos mencionados acima. Os animais foram anestesiados com xilazina (15 mg/kg) e cetamina (90 mg/kg) (i.p.). Posteriormente, a atividade angiointerceptória do BZN foi avaliada e uma punção foi realizada para a coleta de líquido ascítico. Para minimizar o

sofrimento dos animais, o deslocamento cervical foi realizado rapidamente após a coleta do líquido. A região do peritônio subcutâneo de cada camundongo tratado com TAE foi fotografada e a área e a densidade dos microvasos tumorais foram quantificadas usando a Imagem J. Os resultados são expressos como a porcentagem de inibição da angiogênese em relação ao grupo controle negativo (AGRAWAL et al., 1934).

4.5 Análises de apoptose celular

As células tumorais (5×10^6 células/mL) de camundongos tratados com TAE foram coradas com uma solução (5 μ l) de 100 μ g/mL de iodeto de propídio e 100 μ g/mL de acridina laranja (1: 1) para visualizar alterações nucleares que caracterizam necrose e apoptose. As células foram observadas em lâminas sob um microscópio de fluorescência. Para cada amostra, 300 células foram contadas em triplicado. Os resultados são expressos como porcentagens de células viáveis, apoptóticas e necróticas (MASCOTTI et al., 2000).

4.6 Análise do ciclo celular

A parada do ciclo celular foi avaliada usando um kit da Immunostep (Salamanca, Espanha) contendo solução de PI/RNase. As células tumorais de Ehrlich (5×10^5 células/mL) foram lavadas com PBS e os grânulos foram fixados por submersão em etanol gelado (70%). Após 24 horas de fixação a 20°C, as células foram lavadas com PBS, suspensas e incubadas (15 min, em temperatura ambiente) com a solução PI/RNase. A parada do ciclo celular foi avaliada com um citômetro FACS Canto II (BD Biosciences) e os dados foram processados usando o Flowing Software 2.5.1® (NUNEZ., 2001).

4.7 Defesas antioxidantes e marcadores do estresse oxidativo

O fluido ascítico de camundongos portadores de tumor de Ehrlich ascites foi coletado e os marcadores de estresse oxidativo foram analisados. A peroxidação lipídica foi avaliada pela medida de substâncias que reagem com o TBA (TBARS ou substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), utilizando o método descrito por Ohkawa (OHKAWA et al., 1979). O conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) foi determinado, conforme descrito por Beutler e colaboradores (BEUTLER et al., 1963). A atividade da catalase (CAT) foi determinada

cineticamente usando um método baseado na decomposição de H₂O₂ (AEBI, 1984). A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi medida monitorando a oxidação da adrenalina em adrenocromo, conforme descrito por Misra e Fridovich (MISRA e FRIDOVICH, 1972). A atividade da glutatona peroxidase (GPx) foi determinada pela medição do NADPH (FLOHÉ e GUNZLER, 1984). A atividade da glutatona S-transferase (GST) foi determinada usando CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno), como descrito por Habig (HABIG et al., 1976). A atividade da glutatona redutase (GR) foi determinada medindo a taxa de oxidação do NADPH (CALBERG e MANNERVIK, 1985). A atividade enzimática foi normalizada pelo teor de proteínas, que foi determinado pelo método de Lowry (LOWRY e ROSEBROUGH, 1951).

4.8 Análise da geração de ERO (Espécies Reativas de Oxigênio)

Os níveis intracelulares de ERO foram avaliados usando uma sonda não fluorescente (DCFH-DA), que após a oxidação por H₂O₂ forma o composto fluorescente, 2', 7'-dicloro-fluoresceína (DCF). As células TAE (1x10⁶ células) foram lavadas várias vezes com PBS e incubadas com DCFH-DA 5 mM por 30 min a 37 °C. Os níveis intracelulares de ERO foram avaliados usando um espectrofluorímetro Spectramax Paradigm, medindo excitação a 485 nm e emissão a 529 nm (BASU et al., 2015).

4.9 Determinação do Influxo de cálcio

Inicialmente, uma curva de equilíbrio foi realizada para permitir a caracterização do influxo de cálcio em células de TAE (sem qualquer tratamento). As células de TAE (8 x 10⁵ células) de animais dos diferentes grupos de tratamento foram coletadas e centrifugadas (1000 g por 10 min) para a separação de células tumorais do fluido ascítico. As células foram suspensas e incubadas em tampão de bicarbonato de Krebs Ringer (NaCl 122 mM, KCl 3 mM, MgSO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 1,3 mM, KH₂PO₄ 0,4 mM, NaHCO₃ 25 mM) suplementado com 0,1 µCi / mL ⁴⁵Ca²⁺ a 37 °C, pH 7,4, em um atmosfera de O₂: CO₂ (95: 5; v/v) por 0, 15, 60 e 120 minutos. A incubação foi interrompida usando a técnica descrita por Batra e Sjögren, 1983, com modificações, conforme descrito por Frederico et al., 2012 (BATRA e SJÖGREN, 1983; FREDERICO et al., 2012). Foi adicionado tampão frio (1 mL com cloreto de lantânio 10 mM a 2 ° C) às amostras para bloquear o fluxo de cálcio. Os tubos

foram centrifugados por 2 min a 5.000 g, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado duas vezes em tampão de cloreto de lantânio. Seiscentos μL de NaOH 0,5 M foram adicionados às células de TAE e a digestão alcalina (a 100 ° C) foi realizada por 10 minutos. Posteriormente, foram colhidas alíquotas de 100 μL de cada amostra para quantificação de isótopos no líquido de cintilação Optiphase Hisafe III (Wallac Oy, Turku, Finlândia) usando um espectrômetro de beta-cintilação líquida (modelo LS6500; cintilador de múltiplos propósitos Counter-Beckman Coulter, Boston, EUA) e alíquotas de 2 μL foram usadas para quantificação de proteínas (método de Lowry) (LOWRY e ROSEBROUGH, 1951).

4.10 Danos ao DNA

Para avaliar o efeito do BZN no DNA, foi utilizado o ensaio Cometa, de acordo com Singh et al. com modificações (SINGH et al., 1998). As células tumorais foram suspensas em agarose de baixo ponto de fusão 0,75% (p/v) e depositadas na superfície de uma lâmina coberta com uma camada fina de 1,5% de agarose. Após a solidificação, as lâminas foram colocadas em tampão de diálise (2,5 M NaCl; 10 mM Tris; 100 mM EDTA; 1% [v/v] Triton X-100 e 10% [p/v] DMSO; pH 10,0) por um mínimo de 1 hora e máximo de 1 semana a 4°C. Subseqüentemente, as lâminas contendo DNA foram incubadas em tampão alcalino feito na hora (NaOH 300 mM; EDTA 1 mM, pH > 13) por 20 minutos a 4 ° C. Após a submissão à eletroforese horizontal a 300 mA e 25V (0,90V/cm) por 15 minutos, as lâminas foram neutralizadas (Tris-Cl 0,4 M; pH 7,5) e coradas com nitrato de prata e analisadas em microscópio óptico com ampliação de 200x. Cem imagens (50 células de cada uma das duas lâminas replicadas) foram selecionadas aleatoriamente e analisadas em cada amostra. As células foram pontuadas visualmente, de acordo com o tamanho da cauda, em quatro classes, variando de: intacta (0) a maximamente danificada (3). O índice de danos pode variar de 0 (completamente intacto, 100 células x 100) a 300 (dano máximo). Os comprimentos das imagens dos cometas também foram medidos em unidades arbitrárias, com uma escala calibrada na lente ocular (Figura 21A).

4.11 Análise de Western Blot

Os parâmetros dos níveis de proteínas associadas à sobrevivência celular, ciclo de proliferação celular, apoptose e de proteínas da via Akt/mTOR (CDK2, ciclina A, p53, PARP,

BAX, γ H2AX, Akt1, pAkt1, mTOR, p-mTOR, Bcl-xL, HIF-1 α e GLUT-1) foram avaliados por imune eletroforese. As células tumorais de Ehrlich foram cuidadosamente lavadas com PBS e lisadas em tampão RIPA (Tris-Cl 50 mM pH 7,4; NaCl 150 mM; NP40 1%; Na-desoxicolato a 0,25% e fluoreto de fenilmetilsulfonil a 0,25%) e suplementado com inibidor de protease a 1% e fosfatase a 3% coquetéis inibidores. Após desnaturação em tampão Laemmli (Tris-Cl 60mM, pH 6,8; SDS a 2%; glicerol a 10%, β -mercaptoetanol a 5%; azul de bromofenol a 0,01%), quantidades iguais de proteína (25 μ g) de homogenatos celulares inteiros foram submetidas a SDS- Eletroforese PAGE, seguida por eletrotransferência em membranas de nitrocelulose. Após o bloqueio e a lavagem, as membranas foram incubadas durante a noite com os anticorpos primários, lavadas novamente e posteriormente incubadas com os anticorpos secundários (LAEMMLI, 1970). Os anticorpos primários utilizados foram: coelho policlonal anti-CDK2 (sc-163), anti-ciclina A (sc-596), anti-PARP-1 (sc-7150). Foram utilizados anticorpos primários anti-p53 (sc-6243), anti-BAX (sc-7480), anti- β -actina (sc-7210), anti- γ H2AX (sc-101696), anti-Akt1 (cs-C67E7), anti-pAkt1 (sc-7985), anti-mTOR (cst-2972S), anti-pmTOR (cst-2971S), anti-Bcl-xL (sc-8392), anti-HIF-1 α (sc-10790) e anti-GLUT-1 (sc-7903) seguidos por anticorpos secundários. Um kit de detecção de quimioluminescência foi utilizado para visualizar anticorpos acoplados a HRP.

4.12 Dicroísmo circular

O ensaio de interação com dicroísmo circular DNA (CD) é um método usado para detectar alterações na atividade óptica de moléculas quirais, avaliando sua interação com raios eletromagnéticos polarizados circularmente. A conformação da forma B do CT-DNA mostra duas bandas de CD na região UV, uma banda positiva em λ 278 nm, devido ao empilhamento de bases, e uma banda negativa em λ 246 nm, devido a helicidade do polinucleotídico (LI et al., 2008). Os experimentos foram realizados conforme descrito na literatura, com pequenas alterações (BORTOLOTTO et al., 2016). Uma amostra de 200 μ mol L⁻¹ CT-DNA em 10 mmol L⁻¹ de tampão HEPES foi titulada com benzonidazol em concentrações variando de 19,80 a 333,33 μ mol L⁻¹ (razões molares de 0,1 a 2,0) e 0 (controle negativo). Os exames foram realizados de 220 a 420 nm, a 37 ° C, imediatamente após a adição das amostras. Os resultados foram plotados em tabelas e gráficos para apresentar as regiões de maior interesse. Os espectros contendo apenas benzonidazol ou DNA, com concentrações crescentes de solvente (ACN), foram realizados como reações de controle (dados não mostrados).

4.13 Avaliação *in silico* das interações do Benzonidazol com B-DNA (Ancoramento molecular e dinâmica molecular)

As interações computacionais foram realizadas com a sequência da estrutura do modelo B-DNA d (CGTGAATTCACG) (PDB ID 1G3X) do Protein Data Bank e o arquivo do ligante BZN.mol2, recuperado do banco de dados do ZINC (<http://zinc.docking.org/substance/56949>). Este arquivo de ligante foi minimizado com o Open Babel 2.3.2 e seus parâmetros foram fornecidos pelo campo de força GAFF (O'BOYLE et al., 2011). Além disso, a topologia da molécula foi gerada com o ACPYPE, uma ferramenta baseada em Python que usa a Antechamber para gerar topologias GROMACS para compostos químicos (WANG et al., 2006).

As preparações das moléculas de DNA usaram a USCSF Chimera 1.13 para remover ligantes co-precipitados originais e moléculas de água do DNA (PETTERSEN et al., 2014; MCELFRISH e DELIGKARIS, 2018). O AutoDock MGL Tools 1.5.6rc3 gerou o arquivo de entrada de DNA (.pdbqt) e o AutoDock Vina 1.2.2 calculou as geometrias e as energias livres (FORLI et al., 2016; TROTT e OLSON, 2010). Vina previu ligações H e/ou interações hidrofóbicas entre resíduos de nucleotídeos de DNA e 9 poses de BZN. Todas as poses foram analisadas usando o software livre PyMOL 1.8.7.0 para Python 3.6 e LigPlot + 2.1, embora apenas a pose de BZN com a menor energia de afinidade de ligação e RMSD, prevista por Vina, tenha sido usada para simulações de dinâmica molecular. Antes de iniciar as simulações de dinâmica molecular (MD), Avogadro converteu esse arquivo (.pdbqt) em outro (.pdb) compatível com GROMACS (SCHRÖDINGER, 2015; LASKOWSKI e SWINDELLS, 2011; HANWELL et al., 2012).

Finalmente, a ligação flexível do complexo de DNA e ligantes foi simulada usando o GROMACS versão 2018.4 com o campo de força AMBER99bsc1 (VAN DER SPOEL; 2009; HORNACK et al., 2006). A dissolução e a neutralização com dois íons Na⁺ ocorreram dentro de uma caixa de octaedro, aplicando o modelo de água TIP3P (JORGENSEN et al., 1983). O tempo adotado para as simulações foi de 1 fs. Foram realizadas execuções de minimização de energia e equilíbrio de solvente sob condições de conjunto NVP e NPT (T = 300 K, P = 1 bar) e aplicando restrição de posição para átomos pesados de DNA acessíveis ao solvente, sem perturbar a estrutura complexa.

4.14 Cálculos de energia MM-PBSA

O próximo passo foi executar os cálculos da área de superfície de Poisson – Boltzmann da Mecânica Molecular (MM-PBSA), que aprimoraram as simulações de MD, permitindo a incorporação de flutuações conformacionais e contribuições para estimar a energia livre da ligação do ligante (KUMARI e KUMAR, 2014). O MM-PBSA calculou as trajetórias de DNA e ligante e energias relacionadas a potenciais não ligados (Eletrostática e van der Waals) usando solvente explícito e mantendo os parâmetros padrão. Os resultados foram visualizados com Visual Molecular Dynamics (VMD) para LINUXAMD64, versão 1.9.4a12. Além disso, a pesquisa de vizinhos MD e o esquema de corte vdW usaram cálculos de trajetórias de Verlet (HSIN et al., 2008; VERLET, 1967)..

4.15 Avaliação *in silico* das interações do Benzonidazol com Akt-1 (Ancoramento molecular e dinâmica molecular)

Os dados 3D estruturais (.mol2) do benzonidazol (ZINC56949) foram minimizados com o UCSF Chimera e sua topologia foi gerada pelo acpype/AnteChamber (WANG et al., 2006; SOUZA DA SILVA et al., 2012). Os modelos de isoformas da proteína Akt1 foram recuperados do PDB (PDB ID) para avaliação do domínio quinase e do domínio peckstrin (PDB ID: 3o96; 3mv5 e 3cqW). Cada uma das seqüências de resíduos cristalográficos da isoforma Akt foi verificada usando a quimera UCSF; O código PDB 3o96 demonstrou a mais alta qualidade e foi selecionado. O servidor de modelagem de homologia da estrutura da proteína do Modelo Suíço (<https://www.swissmodel.expasy.org/>), gerou um novo arquivo, baseado no arquivo PDB 3o96, que possuía 100% de homologia com Akt1 (WATERHOUSE et al., 2018) . Este arquivo foi submetido aos preparativos padrões da UCSF Chimera (AMBER ff14SB). Finalmente, Akt e BZN foram acoplados ao UCSF Chimera/AutoDock Vina, mantendo os parâmetros padrão (WATERHOUSE et al., 2018). Os arquivos de interação previstos do AutoDock Vina (.pdbqt) foram convertidos (.pdb) usando o Sistema de Molecular Molecular de Código Aberto PyMOL (DE LANO, 2002; SCHRÖDINGER, 2018) e visualizados com LigPlot + (LASKOWSKI e SWINDELLS, 2011), sob licença acadêmica. Além disso, simulações dinâmicas moleculares (GROMACS; campo de força CHARMM) (LEMKUL, 2019) foram usadas para avaliar a estabilidade da posição de ligação ao ligante

(prevista pelo AutoDock Vina) com a menor energia de ligação (RMSD = 0,0000) (HART et al., 2012) . Aplicamos o software Visual Molecular Dynamics (VMD) para LINUXAMD64, versão 1.9.4a12 (2017) nas análises de trajetórias previstas pelo GROMACS usando um protocolo publicado anteriormente (HSIN et al., 2008).

4.16 Avaliação imunocitológica

Os esfregaços de suspensão de células obtidos foram submetidos a um procedimento de panótico usando para visualização microscopia de campo claro. As características celulares foram determinadas diferenciando entre células tumorais de outros tipos de células presentes na amostra usando uma objetiva de imersão (aumento de 1000 x). A análise histológica do fluido ascítico foi realizada usando o kit panótico rápido descrito pelo fabricante LB-Larboclin (GURR, 1971). Contou-se um número de 100 células por amostras e seus valores expressos como porcentagem, significa \pm S.E.M. (erros padrão da média).

4.17 Atividade da mieloperoxidase

A atividade da mieloperoxidase (MPO) no tumor de ascites de Ehrlich foi medida de acordo com o método descrito por Rao e colaboradores (RAO et al., 1993). Primeiramente, 100 μ L do tumor foram homogeneizados em 400 μ L de solução de brometo de hexadecil trimetil amônio a 0,5% (HTAB). Eles foram subseqüentemente centrifugados a 10.000 g por 5 minutos, e 20 μ L dos sobrenadantes foram transferidos para microplacas contendo 150 μ L de meio de reação (0,166 mg. mL⁻¹ de o-dianisidina 2HCl, 0,0005% H₂O₂, H₂O₂ destilado e NaH₂PO₄ 50 mM) . Após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente, a reação foi interrompida com a adição de 30 μ L de diumazida a 1%. Após 10 minutos à temperatura ambiente, a densidade óptica foi medida a 450 nm em um leitor de microplacas e comparada com uma curva padrão de atividade MPO conhecida (0,7 a 140 mU. mL⁻¹). Os resultados foram expressos em mU. mL⁻¹.

4.18 Análise estatística

Os dados são relatados como médias \pm S.E.M, ou porcentagens, e foram analisados pelo teste ANOVA, seguido pelo teste post hoc de Tukey, usando o software Graph Pad Prism (versão5.01). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

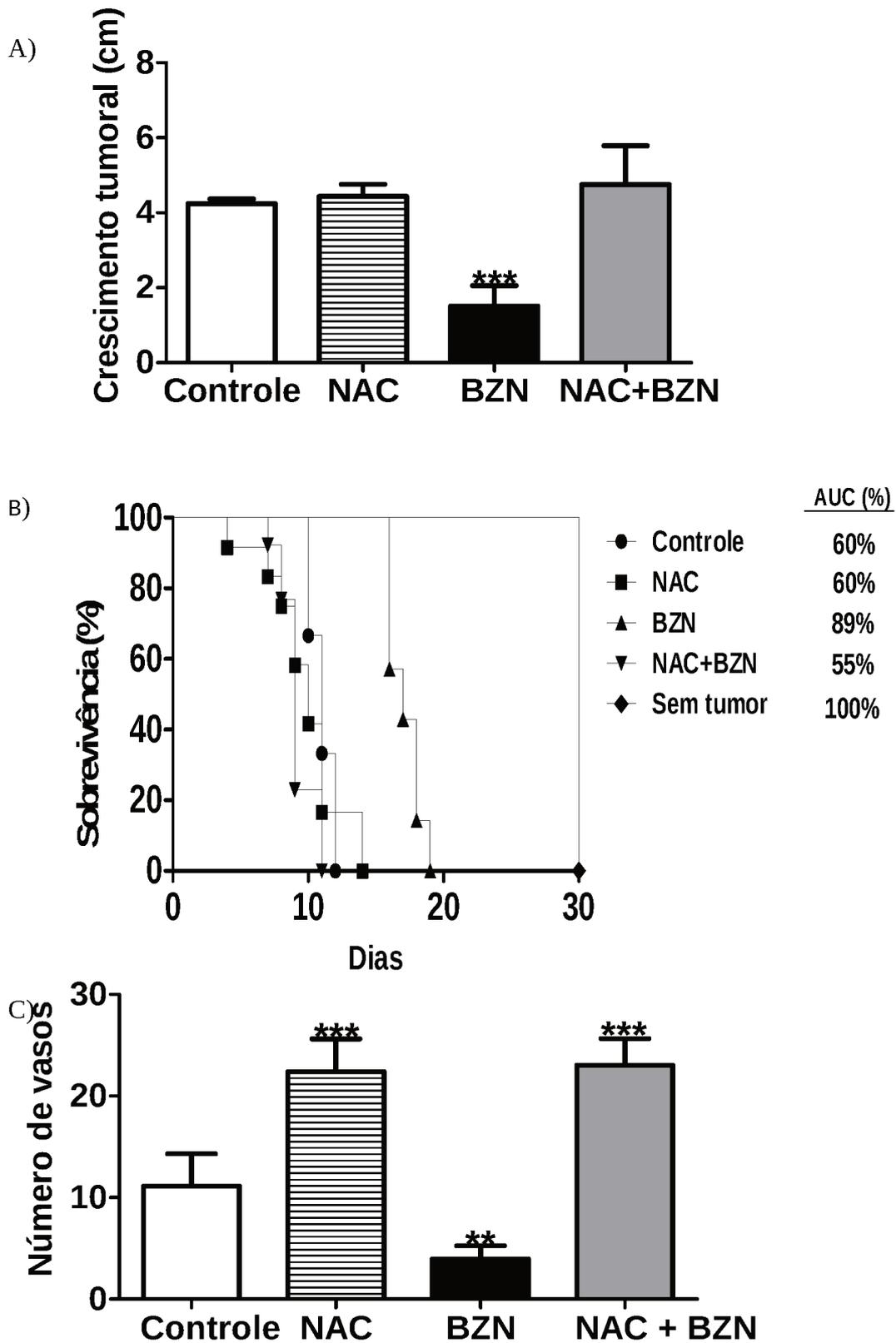
5. RESULTADOS

5.1 Benzonidazol aumenta a sobrevivência dos animais, em associação com a inibição do crescimento tumoral e da angiogênese.

O tratamento com BZN diminuiu o crescimento tumoral em 79% nos animais, comparado ao grupo controle negativo, 82,5% comparado ao grupo NAC e 88,5% comparado à associação de NAC + BZN (Figura 17A). Além disso, a administração de BZN aumentou a sobrevivência de camundongos implantados com TAE, como mostra a área da curva de sobrevivência (Figura 17B). O tratamento com BZN aumentou a sobrevivência dos camundongos em 29%, quando comparado ao grupo Controle Negativo e tratamento com NAC. Quando comparado com o tratamento NAC + BZN, o aumento na sobrevivência animal foi ainda maior (34%).

O ensaio de angiogênese mostrou que o BZN diminuiu a formação de novos vasos no peritônio dos animais tratados, mas esse efeito foi revertido pelo antioxidante NAC (Figura 17C). O BZN também promoveu uma diminuição de 2,8 vezes no número de vasos em relação ao grupo não tratado. Por outro lado, o tratamento com NAC e NAC + BZN apresentou um aumento de 2,0 vezes na formação de novos vasos, quando comparado ao controle negativo.

Figura 17 - Benzonidazole inibe o desenvolvimento tumoral de TAE em camndongos BALB/
c.



(A) aumento da taxa de sobrevivência animal **(B)** Redução da angiogênese **(C)**. Efeitos revertido por NAC (200 mg/kg/day). (**) and (***) denotam diferença estatística quando comparado ao controle negativo, ($p < 0.01$) e ($p < 0.001$), respectivamente. Valores são expressos em médias \pm S.E.M, $n=6$

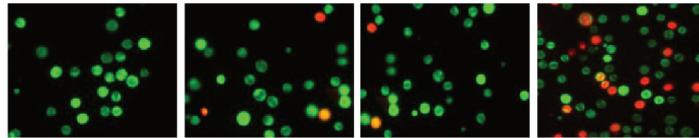
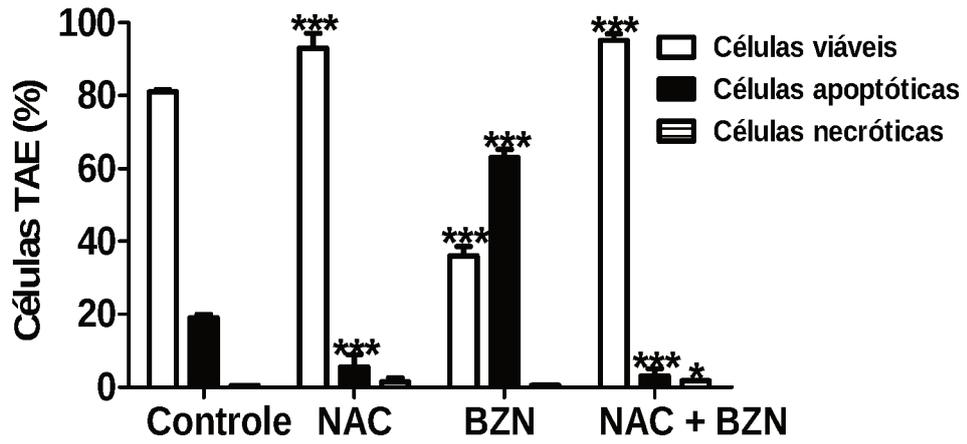
Fonte: do autor

5.2 Benzonidazol aumenta níveis de proteínas de apoptose p53 e BAX induzido TAE.

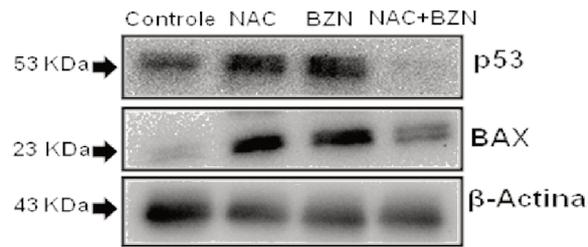
O tratamento com BZN aumentou as células apoptóticas em 232% e a viabilidade celular diminuiu em 44% (Figura 18A), quando comparado ao grupo controle negativo, mas ambos os efeitos foram revertidos pelo tratamento com NAC. Além disso, o tratamento com NAC e NAC + BZN diminuiu drasticamente o número de células apoptóticas em 71% e 84%, em comparação com seus respectivos controles. Confirmando esse efeito, o tratamento com BZN aumentou os níveis da proteína de sinalização apoptótica p53 nas células EAC em 57%, quando comparado ao controle negativo (Figura 18B e 18C). Da mesma forma, o nível da proteína BAX pró-apoptótica nas células de Erlich tumor aumentou em 90% após o tratamento com BZN, quando comparado ao grupo não tratado (Figura 18D).

Figura 18 - Benzonidazole induz a apoptose em modelo tumoral de TAE em camndongos BALB/c.

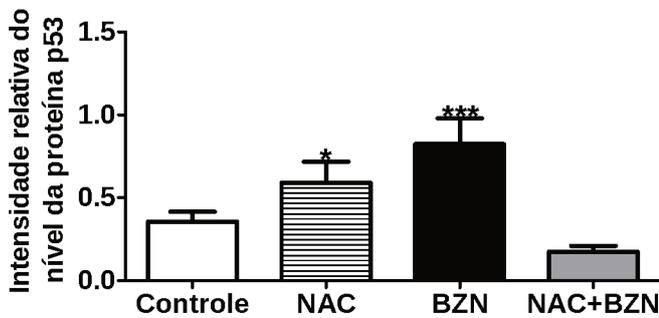
A)



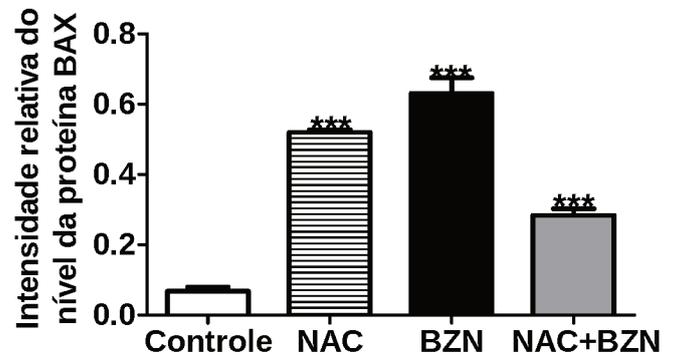
B)



C)



D)



(A) Tipo de morte celular induzida por BZN (10 mg/kg/dia) em TAE de camundongos BALB/c e reversão desse efeito por NAC (200 mg / kg / dia), com as porcentagens correspondentes de células tumorais mostradas como viáveis, apoptótico ou necrótico (B) Dados para imunoelctroforese de proteínas envolvidas no controle de células mortas; p53 (C) e BAX (D). (*), (**) e (***) denotam diferenças estatísticas quando comparados ao Controle

Negativo, ($p < 0,05$), ($p < 0,01$) e ($p < 0,001$), respectivamente. Os valores são expressos como média \pm S.E.M, n = 6

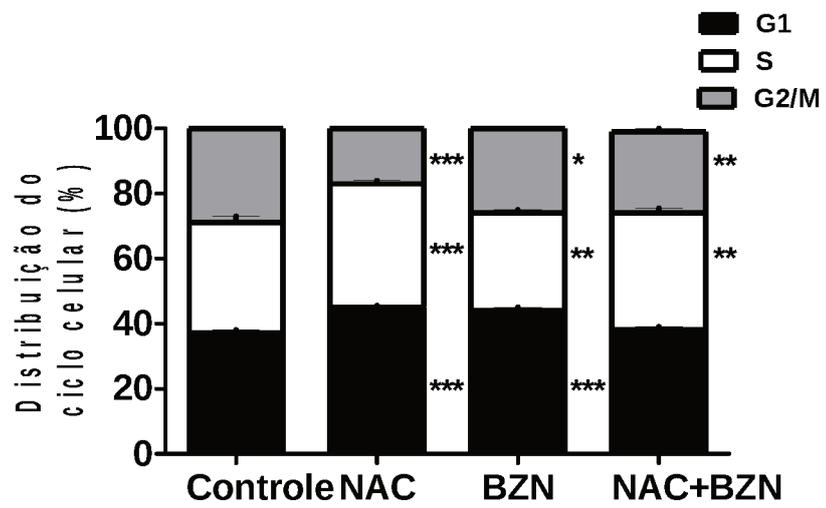
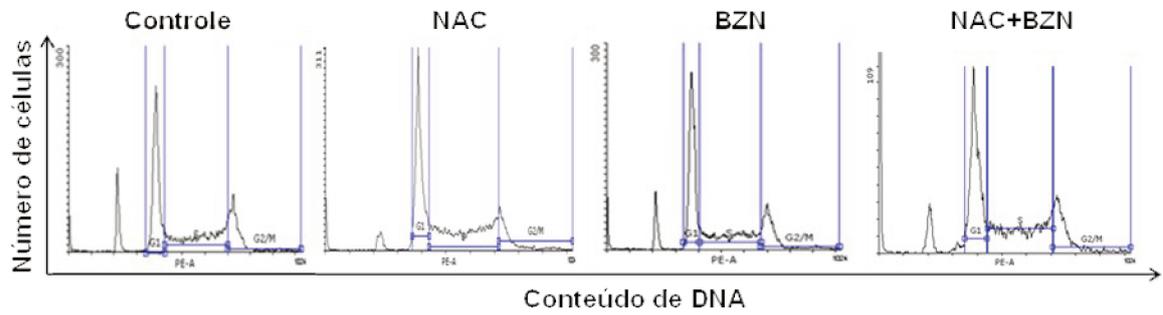
Fonte: do autor

5.3 Benzonidazol induz a parada do ciclo celular *in vivo* em células de TAE.

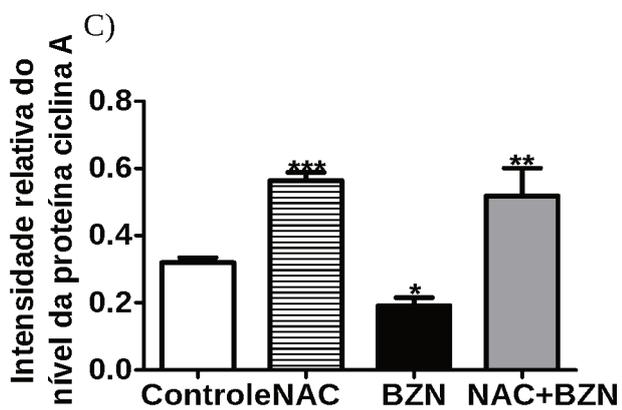
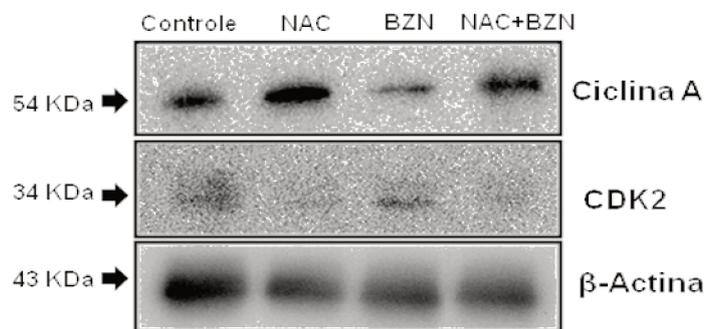
A análise do ciclo celular mostrou que o tratamento com BZN aumentou o número de células do TAE na fase G1 em 18%, quando comparado às células do grupo controle negativo (Figura 19A). O tratamento com BZN diminuiu o número de células na fase S em 12% e de 10% na fase G2 / M, enquanto que no tratamento com NAC + BZN houve aumento do número de células na fase G1 em 2% e o aumento de células na fase S de 5% e aumento de células na fase G2/M de 14%. De acordo com esses dados, houve uma redução no nível de ciclina A, com um aumento no número de células na fase G1 (Figura 19B e 19C), em associação com CDK2 reduzida, em animais tratados com BZN (Figura 19D).

Figura 19 - Benzonidazole induz ao aprisionamento do ciclo celular em modelo tumoral de TAE em camndongos BALB/c.

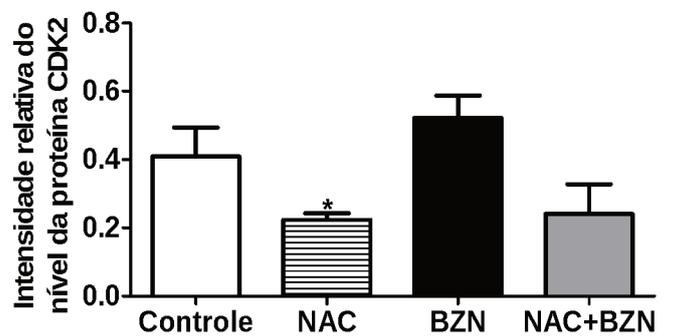
A)



B)



D)



(A) Histograma e distribuição de células de TAE nas fases SubG1, G1, S e G2/M no ciclo celular. Dados para imunoeletroforese de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, nomeadamente ciclina A (C) e CDK2 (D). (*), (**) e (***) denotam diferenças estatísticas em relação ao controle negativo ($p < 0,05$), ($p < 0,01$) e ($p < 0,001$), respectivamente. Os valores são expressos como média \pm S.E.M, $n = 6$.

Fonte: do autor

5.4 Benzonidazol induz ao estresse oxidativo em células de TAE.

A análise de lipoperoxidação mostrou que o BZN aumentou o conteúdo de TBARS em 1,9 vezes nas células do TAE, em comparação com o grupo controle negativo. Por outro lado, a administração de NAC e NAC + BZN diminuiu os níveis de TBARS. A associação de NAC + BZN diminuiu a formação de TBARS em 54%, demonstrando a capacidade do NAC de proteger contra a lipoperoxidação e de reverter a ação pró-oxidante do BZN (Tabela 1). O tratamento com BZN diminuiu o conteúdo de GSH em 2,5 vezes nas células do TAE, quando comparado ao grupo não tratado, mas a associação de NAC + BZN causou uma diminuição de 6,4 vezes nesse antioxidante (Tabela 1). Concomitantemente, a atividade da SOD nas células aumentou 4,4 vezes no grupo tratado com BZN, enquanto o tratamento com NAC + BZN diminuiu a atividade da SOD em 3,4 vezes, demonstrando novamente a capacidade dessa associação de reverter o processo pró-oxidativo promovido por BZN (Tabela 1). Por outro lado, as atividades de CAT e GR não mudaram após o tratamento com BZN, em relação ao grupo controle negativo. No entanto, o tratamento com BZN resultou em um aumento notável na atividade da GPx (17,5 vezes) nas células do TAE, quando comparado com a atividade nas células do controle. Por outro lado, o tratamento com NAC + BZN diminuiu a atividade da GPx em 1,5 vezes, quando comparado com o das células do grupo controle negativo (Tabela 1). Além disso, a atividade de GST nas células do TAE aumentou em três vezes quando os animais foram tratados com BZN, quando comparados aos controles. Por outro lado, o tratamento com NAC + BZN promoveu uma diminuição significativa (18 vezes) na atividade de GST nessas células (Tabela 1).

Tabela 1. Marcadores do estresse oxidativo e enzimas antioxidantes

Marcadores de estresse oxidativo	Controle	NAC	BZN	NAC+BZN
TBARS (nmol MDA.mg proteína ⁻¹)	5.93±0.20	3.19±0.38**	11.43±0.06***	2.73±0.12***
GSH conteúdo (pMol.mL ⁻¹ .mg proteína ⁻¹)	0.32±0.00	0.10±0.03***	0.11±0.00***	0.05±0.00***
SOD (U.mg proteína ⁻¹)	5.04±1.39	1.49±0.14***	21.91±1.13***	2.16±0.96***
CAT (mmol.min.mg proteína ⁻¹)	2.00±0.30	0.15±0.05***	1.79±0.07	0.14±0.01***
GPx (µmol min.mg proteína ⁻¹)	0.50±0.01	1.09±0.06	8.70±0.09***	0.32±0.57
GST (µmol min.mg proteína ⁻¹)	10.85±0.50	1.50±0.39***	32.65±1.50***	0.59±0.17***
GR (µmol min.mg proteína ⁻¹)	0.34±0.04	0.41±0.07**	0.31±0.03	0.43±0.15***

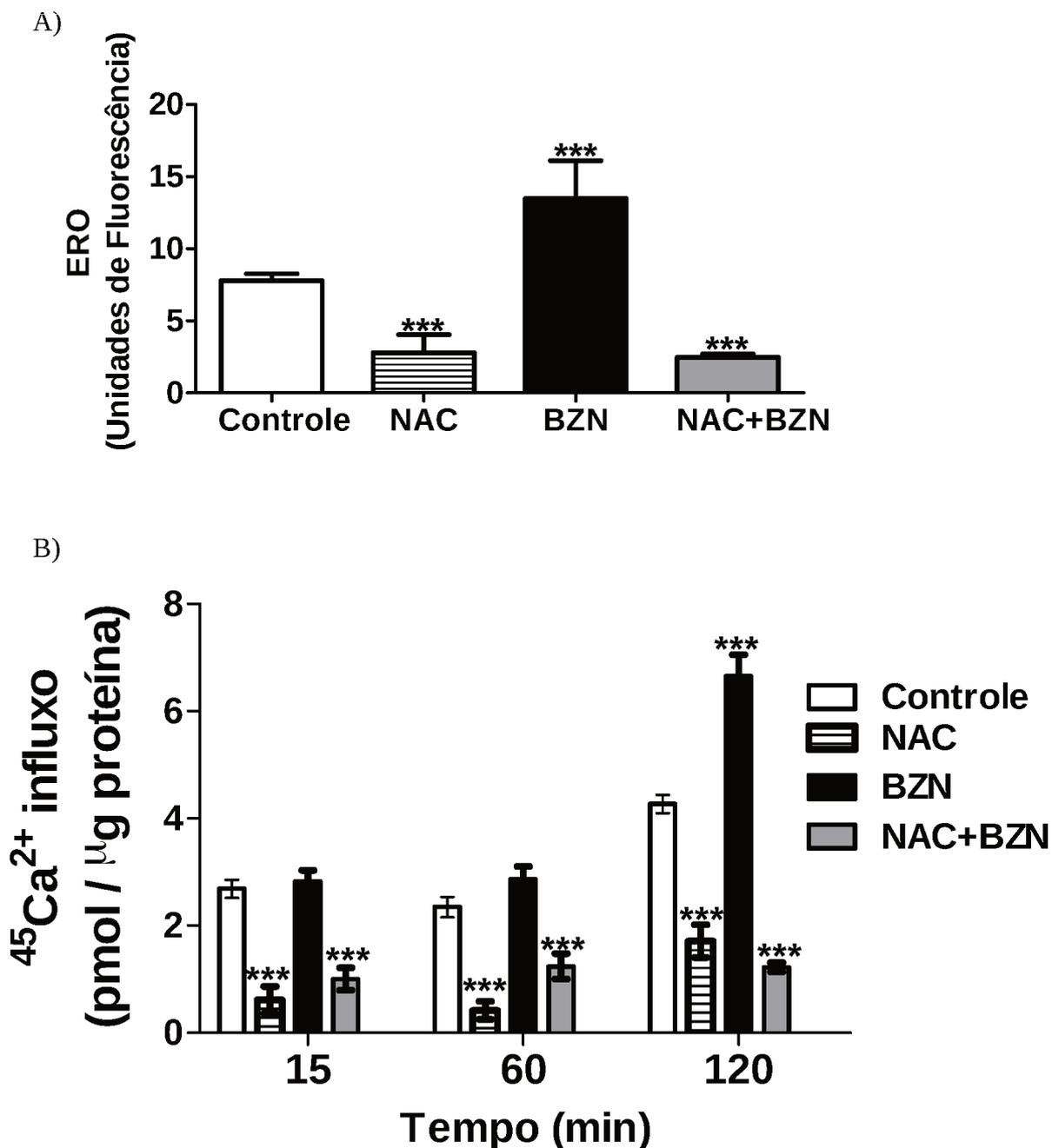
(**) e (***) denotam diferenças estatísticas em relação ao controle negativo (p <0,05), (p <0,01) e (p <0,001), respectivamente. Os valores são expressos como média ± S.E.M, n = 6.

Fonte: do autor

5.5 Benzonidazol aumenta a geração de ERO intracelular e influxo de cálcio em células de TAE.

A ERO intracelular foi avaliada em células do TAE usando o composto não fluorescente, DCFH-DA, que gera fluorescência (DCF) após a oxidação. O BZN induziu uma geração excessiva de ERO nas células (aumento de 42%), quando comparado ao grupo controle negativo. Novamente, a associação de NAC + BZN diminuiu a formação de ERO em 3,5 vezes, revertendo a atividade pró-oxidante do BZN (Figura 20A). Em associação com a maior geração de ERO, o influxo de cálcio foi maior nas células dos animais tratados com BZN (Figura 20B). As células do TAE tratadas com BZN apresentaram um aumento de 55% no influxo de cálcio após 120 minutos. Por outro lado, células de animais tratados com NAC + BZN apresentaram uma diminuição no influxo de cálcio durante os primeiros 15 minutos do ensaio 63%, demonstrando menor influxo quando comparado aos controles e indicando uma reversão do estresse oxidativo induzido pelo BZN.

Figura 20 - O benzonidazol induz a supergeração de ERO e captação de cálcio em modelo de TAE *in vivo*.



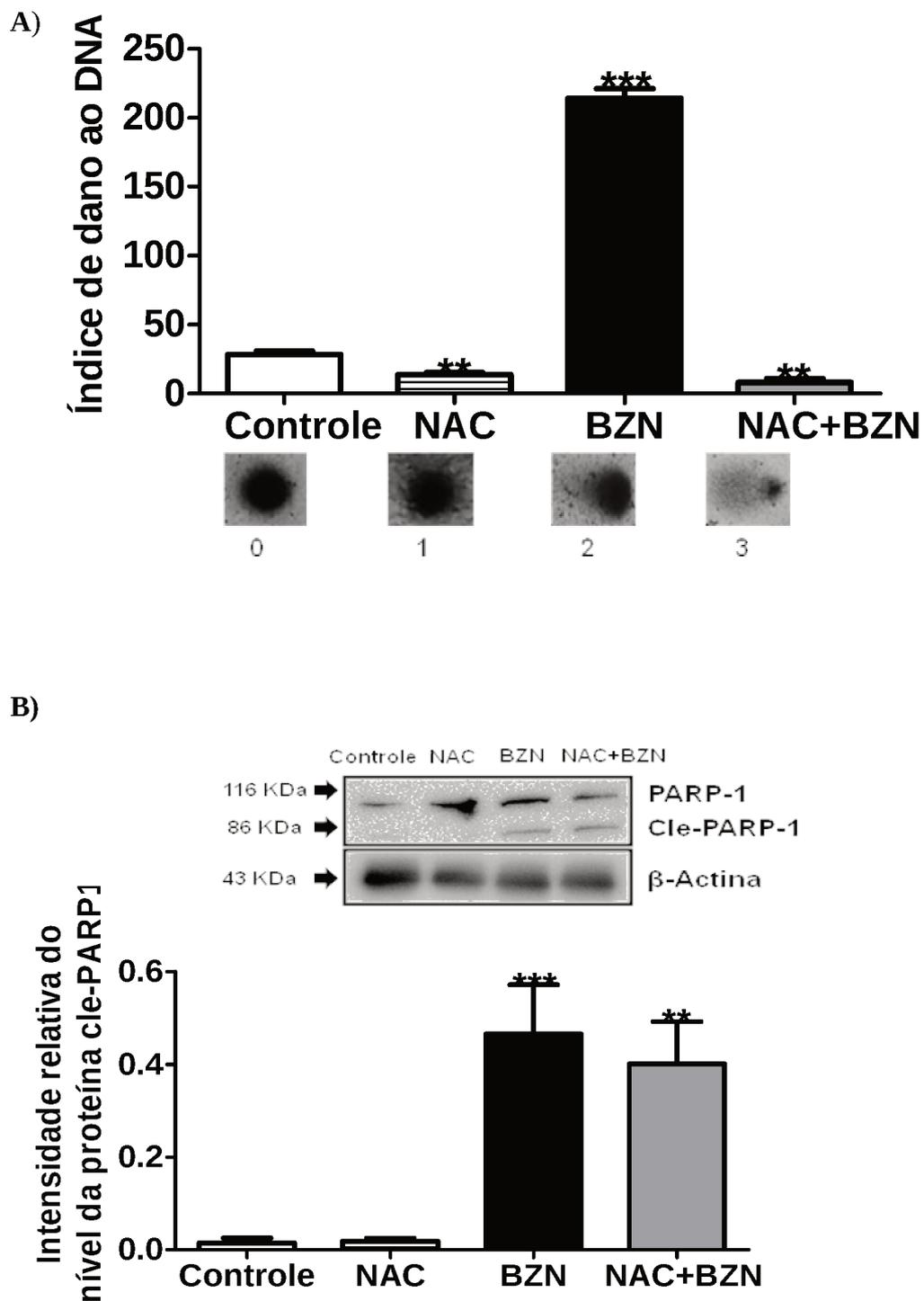
Medição dos níveis intracelulares de ERO produzidos por BZN e reversão desse efeito por NAC (A). Influxo de cálcio em células de TAE de camundongos tratados. (***) denota diferença estatística em relação ao controle negativo ($p < 0,001$). Os valores são expressos como média \pm S.E.M, $n = 6$.

Fonte: do autor

5.6 Benzonidazol induz fragmentação do DNA em células de TAE.

O tratamento com BZN causou fragmentação significativa do DNA nas células do TAE, que exibiram um índice de danos 7,6 vezes maior, em comparação com as células do controle negativo (Figura 21A). Por outro lado, as células de camundongos tratados com NAC apresentaram uma diminuição significativa na fragmentação do DNA, demonstrando um índice de dano 2 vezes menor em comparação ao controle. Por outro lado, células de animais tratados com a associação de NAC + BZN apresentaram um índice de dano ao DNA 3,5 vezes menor, indicando anulação do processo oxidativo produzido apenas pelo BZN. Consistente com esses achados, foi observada uma maior clivagem por fosforilação da PARP-1 nas células de animais tratados com BZN (Figura 21B), enquanto NAC + BZN forneceu proteção contra danos no DNA.

Figura 21 - Benzonidazol induz ao dano ao DNA e clivagem da PARP-1 em modelo de TAE *in vivo*.



Fragmentação de DNA promovida por BZN em células de TAE de camundongos BALB/c e a reversão desse efeito por NAC, como demonstrado pelo ensaio Comet (A). Dados para imunoeletroforese de proteínas envolvidas na fragmentação e apoptose de DNA, nomeadamente PARP-1 (B). (**) e (***) denotam diferenças

estatísticas quando comparados ao controle negativo ($p < 0,01$) e ($p < 0,001$), respectivamente. Os valores são expressos como média \pm S.E.M, $n = 6$

Fonte: do autor

5.7 Confirmação da interação DNA-BZN por dicróismo circular.

O efeito do benzonidazol na estrutura secundária do DNA foi verificado por espectroscopia de dicróismo circular (CD). Esta substância promoveu um efeito hipocrômico na concentração mais baixa, apenas na banda λ 245. Também promoveu desvios de vermelho nas bandas positiva e negativa e esses resultados, juntos, indicam interação eletrostática (GANESHPANDIAN et al., 2013). Em concentrações mais altas, ambas as bandas (λ 245 e 275 nm) apresentaram hipocromismo e essas reduções de intensidade em ambas as bandas indicam a ocorrência de eventos de ligação ao sulco (BORTOLOTTO et al., 2016). Esses resultados mostram que o BZN possui uma forte capacidade de interagir com o DNA, devido a interações eletrostáticas, e é um ligante fraco do sulco, realizando esse tipo de interação apenas em concentrações mais altas.

5.8 Resultados *in silico* (Interação e dinâmica molecular B-DNA-BZN)

O ligante BZN interagiu e formou ligações de Hidrogênio com resíduos dentro de sulcos menores, que foram visualizados através de simulações de MD (1 ns) usando a estrutura complexa B-DNA-BZN (Figura 6A). As simulações de MD mostraram que o átomo doador de BZN, O_2 , formava uma ligação de Hidrogênio com o átomo aceitor (N3) no resíduo de nucleotídeo da17 (1.977 Å) (Figura 22A), com uma ocupação de 81,4% (Figura 22B). Embora o mapa de existência de ligações de hidrogênio tenha mostrado outros nucleotídeos, apenas o dg16 apresentou 73,9% de ocupação (Figura 22B, abaixo).

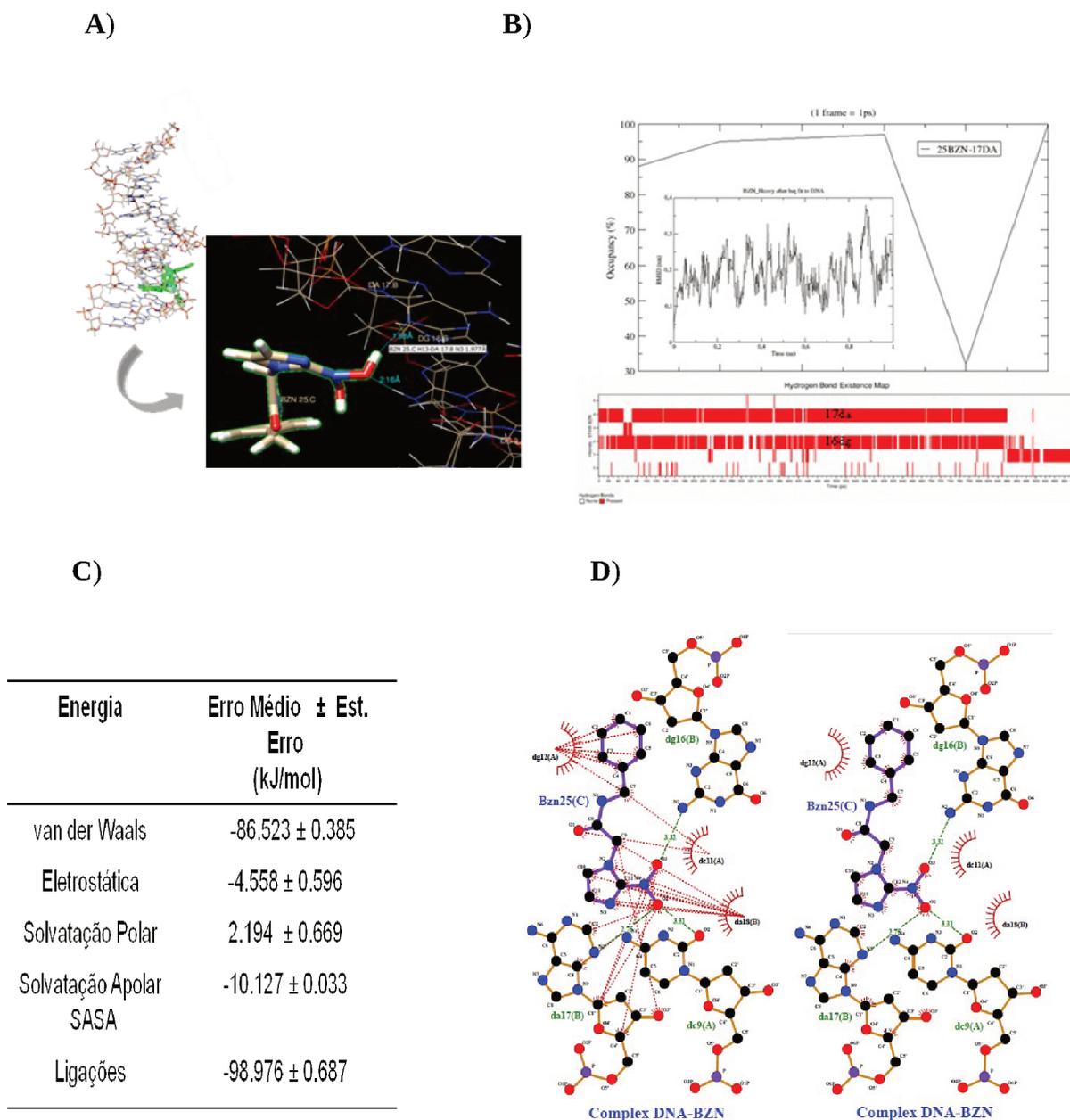
Variações no número de ligações de Hidrogênio formadas entre BZN e o resíduo de nucleotídeo da17 ocorreram durante o tempo de simulação de MD (Figura Suplementar 2A). Além disso, a análise realizada para BZN, a ligação de Hidrogênio com da17, mostrou a convergência da distribuição do ângulo da ligação de Hidrogênio (Figura Suplementar 2B). Assim, o número previsto de ligações de Hidrogênio (4) (Figura Suplementar 2A) e o ângulo médio (146.251o) (Figura Suplementar 2B) contribuíram definitivamente para a estabilidade geral do BZN-da17 e para a convergência da energia de ligação ΔE do complexo DNA-BZN

(Figura 2C complementar). Além disso, a progressão calculada pelo RMSD, correspondente a átomos pesados (C, O e N) da trajetória BZN, confirmou sua convergência durante a simulação MD. Após a estabilização do sistema, o RMSD apresentou aproximadamente 2,0 Å de variação. Esses valores concordaram com os dados cristalográficos obtidos dos modelos de DNA (PDB 5T4W) com uma resolução de 2,3 Å. As energias envolvidas no complexo DNA-BZN foram calculadas com MM-PBSA e correspondem ao potencial não ligado relacionado à energia de van der Waals ($-86,523 \pm 0,385$ kJ / mol) e energia eletrostática ($-4,558 \pm 0,596$ kJ / mol) (Figura 22C). Além disso, o MM-PBSA também forneceu a Energia de solvatação polar ($2,194 \pm 0,669$ kJ / mol) e Energia de solvência apolar associada à Área de superfície acessível por solvente (SASA) ($-10,127 \pm 0,033$ kJ / mol) (Figura 22C). O MM-PBSA calculou a energia de ligação complexa ($-98,976 \pm 0,687$ kJ / mol) (Figura 6C) que foi associada à soma dos valores das energias mencionadas (van der Waals; eletrostática; SASA polar e apolar). A Energia da Mecânica Molecular, calculada em vácuo, mostrou uma contribuição significativa da energia de van der Waals para a energia total do complexo DNA-BZN (Figura 2D suplementar).

Por outro lado, o resíduo dt17 contribuiu para a Energia Mecânica Molecular ($-17,2741 \pm 0,1723$ kJ / mol), Energia polar ($-0,1756 \pm 0,11183$ kJ / mol) e energia apolar ($-0,8943 \pm 0,0082$ kJ / mol) (Tabela Suplementar 1). Essas energias, combinadas, resultaram na contribuição total de energia relacionada ao dt17 ($-18,3389 \pm 0,1330$ kJ / mol) (resíduo 17) (Figura Suplementar 2 E; mais detalhes na Tabela Suplementar 1). Enquanto BZN (resíduo 25) apresentou contribuições energéticas correspondentes à Energia da Mecânica Molecular ($-45,5408 \pm 0,3436$ kJ / mol), energia polar ($31,8615 \pm 0,2515$ kJ / mol) e energia apolar ($-5,7239 \pm 0,0222$ kJ / mol), esses componentes da contribuição total de energia de BZN ($-19,3829 \pm 0,2618$ kJ / mol) (Figura 2 E complementar; mais detalhes na Tabela complementar 1). Essa energia correspondeu ao menor valor de contribuição no complexo DNA-BZN (Figura Suplemento 2 E complementar; Tabela Suplementar 1). Assim, as representações gráficas da energia total de contribuição mostraram o papel significativo de dt17 e BZN (Figura Suplementar 2 E), onde BZN, representado em vermelho, teve a menor pontuação de energia. Além disso, a afinidade de ligação ao DNA-BZN possuía um componente de energia livre de solvatação ΔG não polar, que foi calculado usando MM-PBSA e considerando a Área de Superfície Acessível a Solventes (SASA) (Figura Suplementar 2 F). Finalmente, a manutenção do complexo DNA-BZN apresentou contribuições previstas através de

simulações de MD, que correspondiam às interações hidrofóbicas entre BZN e nucleobases (Figura 6D).

Figura 22 - Interações de BZN com DNA (*in silico*).



Interações de BZN com nucleotídeos de DNA (PDB 5T4W) (A). Ocupação das ligações H (superior) (cada quadro = 2 ps), RMSD da trajetória dos átomos pesados de BZN (C, O e N) (inserção) e mapa de existência das ligações H dentro do ângulo diédrico (<180o) e Distância da ligação H (<3,5 Å) (parte inferior) B). Energias do complexo calculadas pelo método MM-

PBSA (C). Interações hidrofóbicas (linhas vermelhas tracejadas) e ligação H (linhas verdes tracejadas) entre os nucleotídeos BZN e DNA (D).

Fonte: do autor

5.9 Resultados *in silico* (interação e dinâmica molecular BZN-Akt1).

A simulação de acoplamento molecular demonstrou a capacidade do BZN de interagir com a proteína Akt1 no domínio alostérico (Figura 23A). A interação na posição L1 ocorreu através de ligações de hidrogênio formadas entre o oxigênio doador de BZN e os resíduos de aminoácidos Asn51 e Gln76, ambos dentro do domínio PH, com distâncias de ligação H de 3,17 e 3,22 Å, respectivamente (Figura 23B). Esta posição tinha a menor afinidade de ligação (-8,6 kcal / mol) e RMSD (0,0000). Numerosas interações hidrofóbicas ocorreram entre os resíduos Akt1 (Asn51, Gln76, Trp77, Thr79 e Ile81) localizados no domínio PH e o BZN também interagiu com resíduos de aminoácidos dentro do domínio quinase (Ser202, Leu261, Val267, Tyr269 e Asp289) (Figura Suplementar S 1A). Além disso, o BZN na posição 1 mostrou interações hidrofóbicas principalmente com aminoácidos polares (Asn, Gln, Ser, Thr, Trp e Tyr), dentro da bolsa de ligação do ligante original. Investigações posteriores da estrutura do modelo Akt1 (código PDB 3o96) revelaram ligações H e interações hidrofóbicas entre o ligante original e resíduos de aminoácidos não polares e polares na bolsa de ligação (Figura Suplementar S 1B).

Simulações dinâmicas moleculares, no entanto, revelaram outra ligação H entre o aminoácido Tyr272 e o átomo de nitrogênio do grupo acetamida BZN (3,11 Å).

Esta ocorrência de ligação H no mapa de existência de ligação de hidrogênio revelou sua importância (Figura 23D). De fato, a ligação H formada entre o Tyr272 e o BZN teve a maior taxa de ocupação (71,3%) em simulações (1000ps) (Figura 23E) quando comparada com duas ligações de hidrogênio previstas entre a molécula de BZN e o mesmo resíduo Asn54. Essas ligações H apresentaram baixas taxas de ocupação (2,1 e 5,7%) (Gráfico não mostrado), enquanto as interações hidrofóbicas previstas pela dinâmica molecular mostraram que o BZN interagiu com os resíduos Akt1 dentro dos domínios PH (Asn 54, Gln 79, Ile 84) e quinase (Arg272, Asp274, Val270, Val271 e Tyr272) (Figura Suplementar S 1C).

Além disso, o GROMACS mostrou variações discretas nos valores de BZN RMSD (aproximadamente 1 Å). Esses achados indicaram a estabilidade do ligante dentro dos locais de ligação às proteínas (Figura Suplementar S 2A). O GROMACS previu até 3 ligações H entre BZN-Akt1 (Figura Suplementar S 2B). A estabilidade do complexo BZN-Akt1 foi

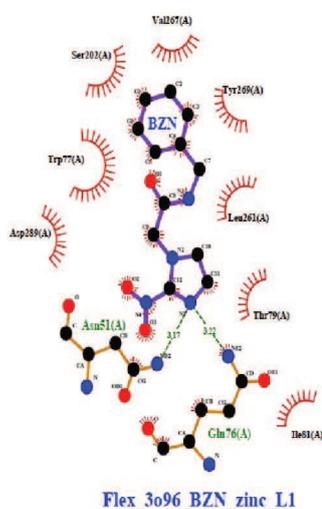
mantida pelas contribuições das ligações H formadas entre BZN e Akt1 (resíduo Tyr272), fornecendo uma boa distribuição do ângulo da ligação H (média 148,6o) para o complexo Doador-H-Aceitador (DHA), enquanto a distância das ligações H (até 3,0 Å) foi favorável à estabilidade complexa (Figura Suplementar S 2D)

Figura 23 - Interações de BZN com a proteína Akt1 (*in silico*).

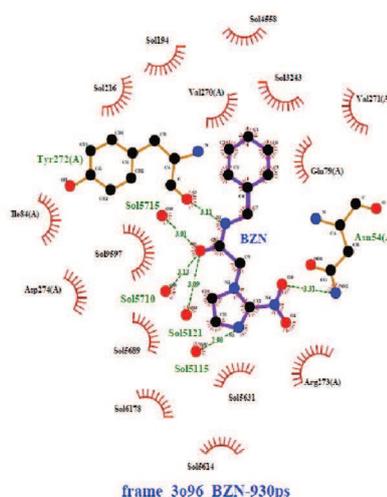
A)

Search box centre Coordinates (Size)	(BZN) Position	Affinity energy (kcal/mol)	RMSD	Hydrophobic Interactions	Hydrogen bonding	Residues of Akt			
						H-bond predicted by AutoDock Vina	H-bond predicted by GROMACS		Pi-stacking
							120 ps	930 ps	
x = 37.87 y = 43.33 z = 21.03	L1	-8.6	0.000	42.16297	1.37353	Gln ⁷⁶ Asn ⁵¹	Tyr ²⁷²	Asn ⁵⁴ Tyr ²⁷²	Trp ⁸⁰
	L2	-8.2	7.073	45.14457	0.89033	Ser ³⁰⁵			
(x-y-z = 22 Å)	L3	-8.1	1.249	29.48709	1.02433	-			

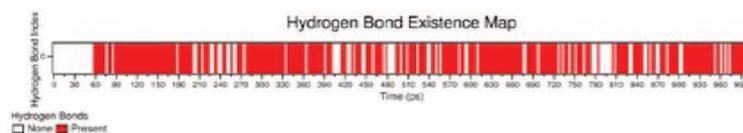
B)



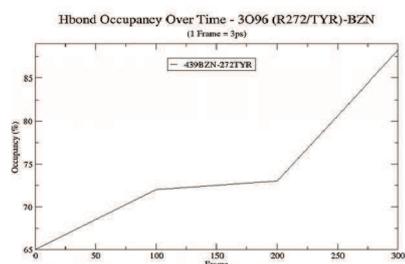
C)



D)



E)



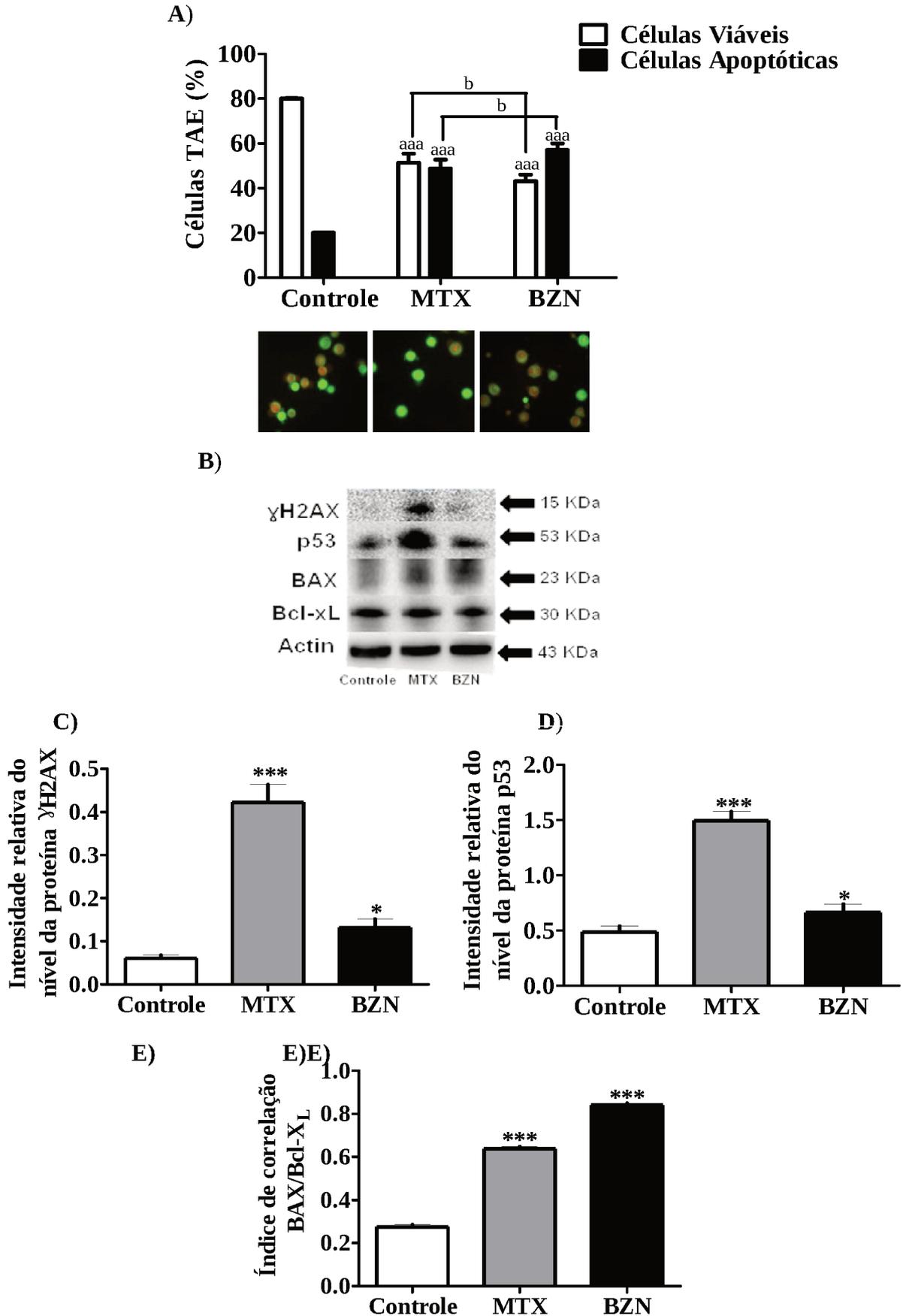
Energia de ligação e interações previstas pelo Autodock Vina e GROMACS (A). O complexo Akt1-BZN teve uma interação de empilhamento Pi entre o grupo benzila do BZN e as ligações Trp77 e H do resíduo mantêm o BZN junto com os resíduos de aminoácidos Asn54 (3,31 Å) e Gln76 (3,22 Å) previstos pelo AutoDock Vina (B). GROMACS previu interações que contribuíram para a estabilidade complexa por meio de ligações H formadas entre BZN-Tyr272 (3,11 Å) e BZN-Asn54 (3,31 Å) e por meio de interações hidrofóbicas (solvente-Akt1; resíduos de solvente-BZN e BZN-Akt1) (C). Mapa das ligações de hidrogênio formadas entre o resíduo específico Tyr272 e BZN durante o tempo de simulação da dinâmica molecular (D). O resíduo Tyr272 teve a maior ocupação de ligação H (71,3%) (E).

Fonte: do autor

5.10 Benzonidazol aumenta os níveis de p53, γ H2AX, BAX e Bcl-xL em células de TAE.

Desde que o BZN e o MTX induziram apoptose nas células EAC, determinamos os efeitos desses fármacos nos níveis de γ H2AX, um marcador de quebra de dupla posição do DNA nas células EAC. Após a administração de BZN, os níveis de proteína 2H2AX aumentaram (117%) (Figura 24B e 24C), enquanto o nível de proteína p53, um regulador chave da progressão do ciclo celular, apoptose e estabilidade genômica, aumentou ligeiramente (36%) (Figura 24 e Figura 24). Por outro lado, o BZN aumentou significativamente o nível de BAX em 147%, uma proteína pró-apoptótica que desempenha um papel importante na apoptose mitocondrial, quando comparada ao controle negativo. Além disso, observamos uma pequena diminuição nos níveis da proteína anti-apoptótica Bcl-xL após o tratamento com BZN (Figura 24B). Finalmente, o BZN elevou a razão BAX/Bcl-xL (indicativo de apoptose mitocondrial), sugerindo ativação intrínseca da apoptose (Figura 24E). Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que o BZN induziu apoptose por dano ao DNA e via mitocondrial de apoptose.

Figura 24 - Indução de apoptose por BZN em células de TAE



Tipo de morte celular induzida por BZN em TAE com camundongos BALB-c machos, $n = 6$; 20 ± 2 g de peso, quando comparado ao controle negativo (1% DMSO ip) e ao controle positivo (A). Imunoeletroforese de proteínas envolvidas no controle de células mortas (B), γ H2AX (C), p53 (D) e da correlação BAX / Bcl-xL (E). (b) denotam diferenças estatísticas quando comparados ao controle positivo e (*) e (aaa) denotam diferenças estatísticas quando comparados ao Controle Negativo ($p < 0,05$) e ($p < 0,001$), respectivamente. Os valores são expressos como média \pm S.E.M, $n = 6$. Isogênico, Balb / cmice masculino (*Mus musculus*), 20 ± 2 g de peso, com idade aproximada de 60 dias.

Fonte: do autor

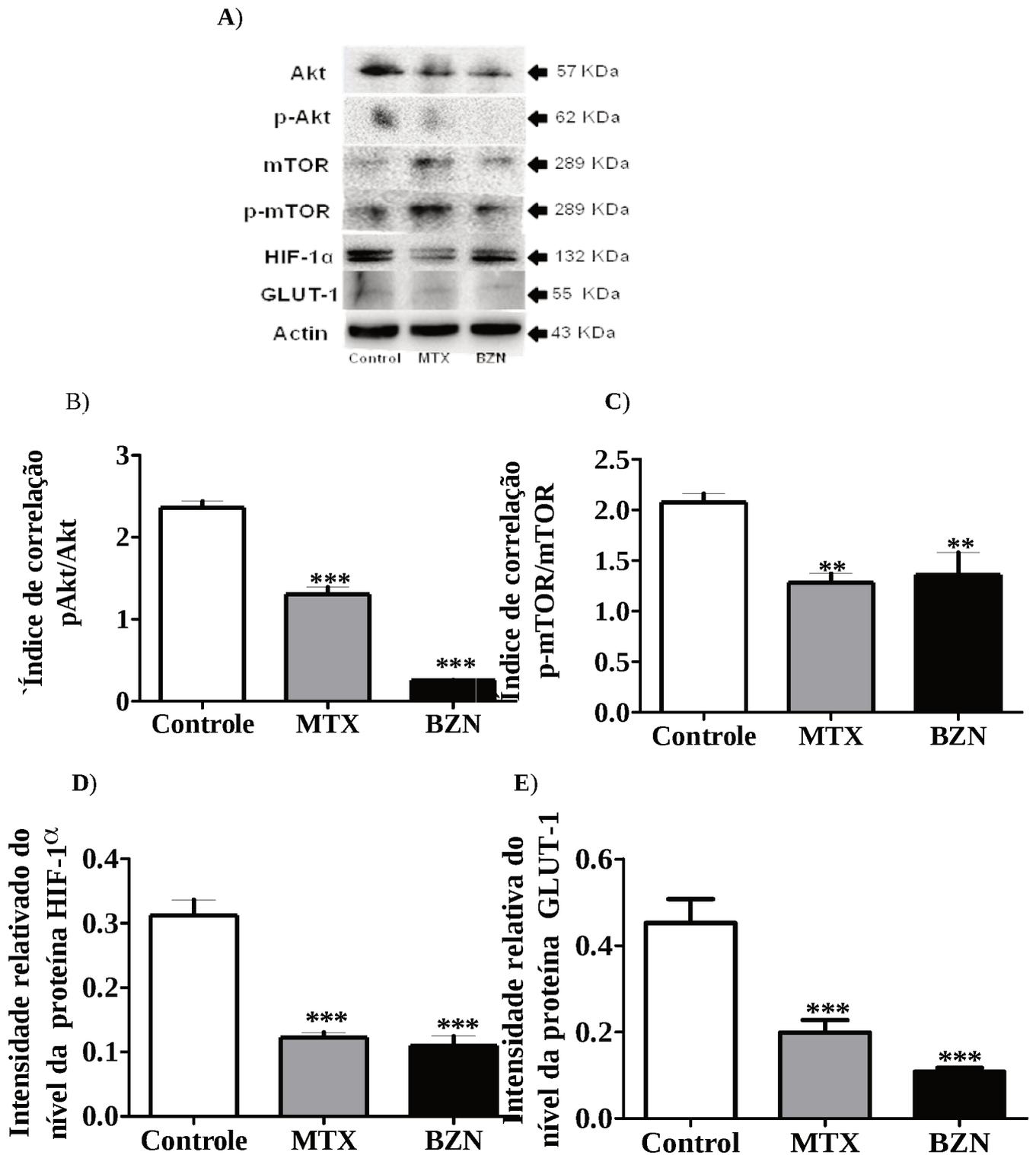
5.11 Benzonidazol modula a sinalização de Akt1 em células de TAE.

Nossa hipótese foi de que o BZN poderia inibir o comportamento maligno das células cancerígenas através da modulação da sinalização de Akt. Em apoio a essa ideia, o tratamento com BZN reduziu significativamente os níveis de Akt1 (54%) e p-Akt1 (76%), quando comparado ao controle negativo. Além disso, o índice de fosforilação, representando a razão entre a forma fosfo ativa e a forma inativa não fosforilada desta cinase, foi significativamente menor após o tratamento com BZN (Figura 25A e 25B). Consistente com esses resultados, níveis da proteína p-mTOR diminuiu em camundongos tratados com BZN e todos os tratamentos mantiveram níveis semelhantes de mTOR (Figura 25A e 25C). Novamente, a taxa de fosforilação da forma ativa e inativa desta última quinase foi significativamente menor nas células TAE de camundongos tratados com BZN, quando comparados aos controles.

5.12 Benzonidazol modula a sinalização de Akt1 em células de TAE

Para verificar se BZN teve algum efeito a regulatório na via Akt/mTOR, avaliamos os níveis de HIF-1 α . Curiosamente, nossos resultados mostraram que o BZN reduz os níveis de HIF-1 α em células de TAE em 65%, quando comparado ao controle negativo (Figura 25A e Figura 25D). Dessa forma, observamos uma diminuição de 76% nos níveis de GLUT-1, um transportador de glicose regulado pelo HIF-1, nas células EAC de animais tratados com BZN (Figura 25A e Figura 25E).

Figura 25 - Benzonidazol regula negativamente a indução da proteína Akt1.



O benzonidazol induziu a regulação negativa da proteína Akt 1, interferindo na via Akt e inibindo sua ativação nas células de TAE coletadas de camundongos BALB-c (machos, n = 6; 20 \pm 2g de peso). Imunoelctroforese das proteínas da via Akt de células de Tumor ascítico de Ehrlich (TAE) de camundongos proteína Akt, p-Akt (A),

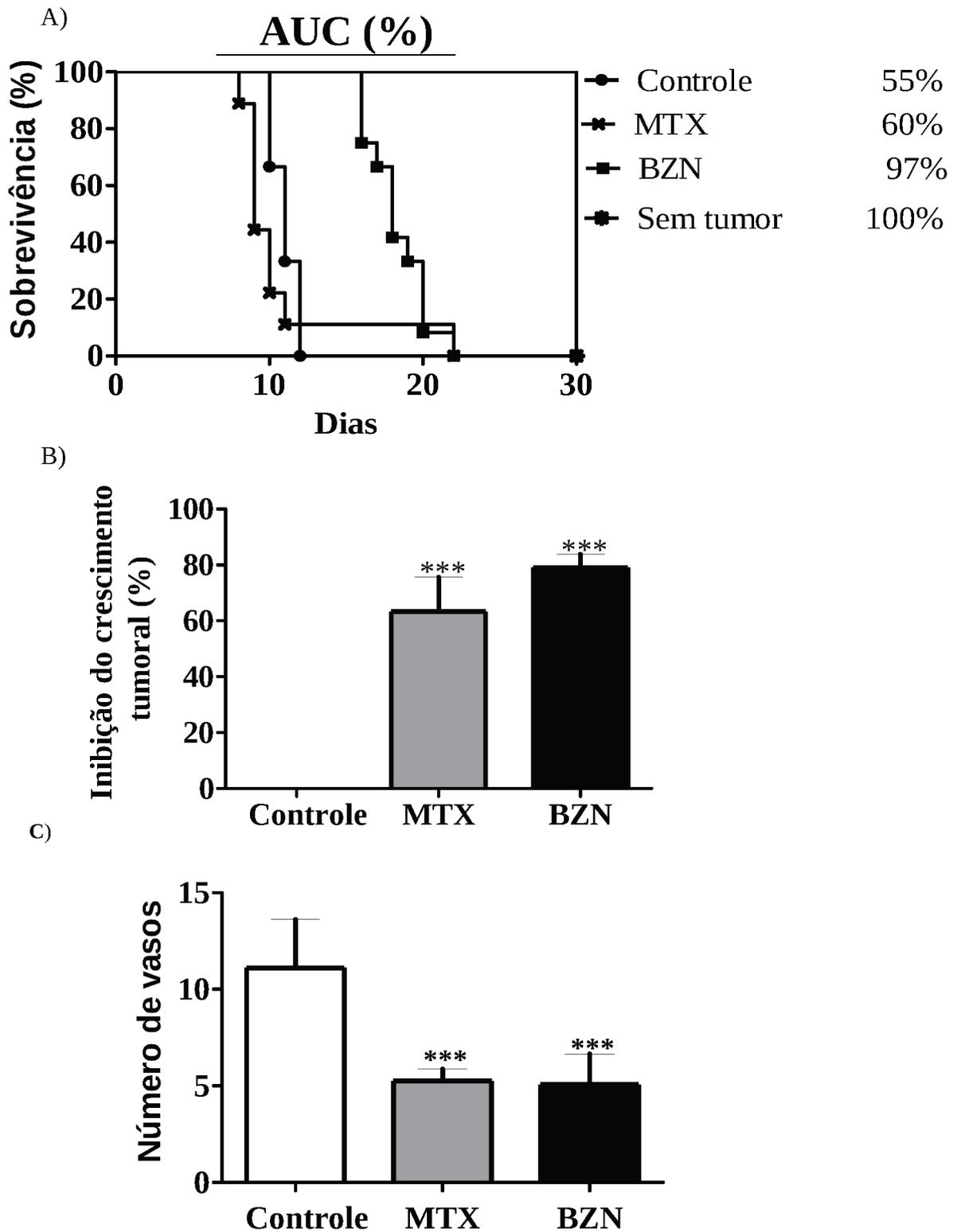
mTOR, p-mTOR (A, B), fator de transcrição HIF-1 α (A, C) e GLUT-1 (A, D).. (**) e (***) denotam diferenças estatísticas quando comparados aos controles ($p < 0,01$) e ($p < 0,001$), respectivamente. Os valores são expressos como médias \pm S.E.M, n = 6.

Fonte: do autor

5.13 Benzonidazol aumenta a sobrevivência dos animais, em associação com a inibição do crescimento tumoral, angiogênese e imunomodulação.

Os camundongos tratados com BZN apresentaram uma sobrevida significativamente aumentada (42%), em comparação com o grupo controle negativo. Além disso, o grupo BZN a sobrevivência foi significativamente maior (37%) do que o grupo controle positivo-MTX (Figura 26A). Consistente com esse achado, o BZN reduziu o desenvolvimento do tumor (79%), comparativamente ao controle negativo (Figura 26B). Nesse sentido, observamos uma diminuição significativa de 54% no número de vasos após o tratamento com BZN, em comparação ao controle negativo (Figura 26C), observando que a angiogênese é um evento celular regulado, em grande parte, pelo fator de transcrição HIF-1 α .

Figura 26 - Sobrevida, inibição do crescimento tumoral e inibição da angiogênese.



Camundongos portadores de TAE após tratamento de 9 dias consecutivos: Taxa de sobrevivência, segundo o método de Kaplan-Meier (A). Atividade antitumoral de MTX e BZN contra o TAE em camundongos (B) e a inibição da angiogênese (C). (***) denota diferença estatística quando comparado aos controles ($p < 0,001$). Os valores são expressos como média \pm S.E.M.

Fonte: do autor

A caracterização histológica do líquido ascítico através da rápida apresentação panóptica detectou dados relevantes sobre a infiltração de células do sistema imunológico nos animais tratados (Figura 6A e B). O tratamento com BZN aumentou o número de células segmentadas quando comparado aos camundongos controle (69%). Além disso, houve um aumento de hastes (Bad) (86%) e neutrófilos (77%) após o tratamento com BZN. Os linfócitos e monócitos presentes nas amostras revelaram valores semelhantes para controles e tratamento com BZN. Por outro lado, o tratamento com MTX não mostrou infiltrado de células imunes.

De acordo com os dados de infiltração celular, a atividade de mieloperoxidase diminuiu após os tratamentos com BZN (Figura 6C). Considerando que não houve infiltração de células imunes nos animais tratados com MTX, não foi possível avaliar a análise da atividade enzimática nesse grupo. O tratamento com BZN foi capaz de atenuar a atividade da MPO em 59% quando comparado ao controle, demonstrando a importância do BZN na modulação da atividade da MPO enquanto o MTX causa imunossupressão.

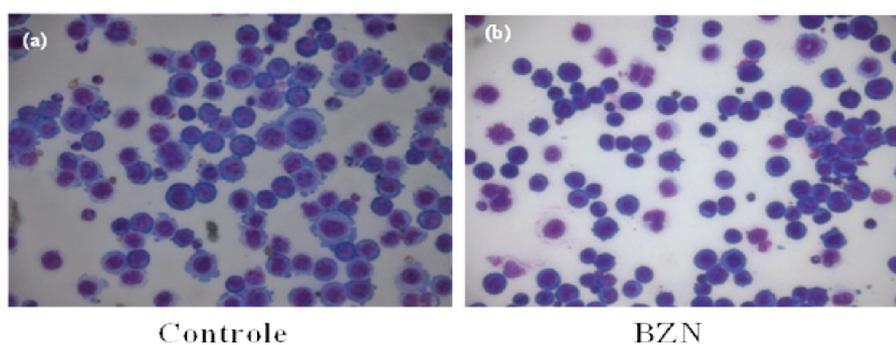
Figura 27 - Quantificação de células imunes presentes no líquido ascítico coletados do TAE e atividade da mieloperoxidase.

A)

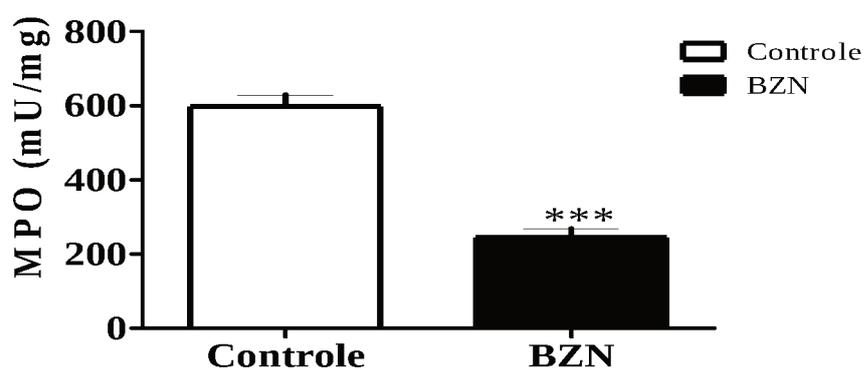
Células (%)	TAE células	Neutrófilos		Linfócitos	Monócitos
		Segmentados	Basófilos		
Controle	97.50±1.00	1.25±0.50	0.25±0.30	0.33±0.57	1.00±0.57
MTX	97.30±0.56	ND	ND	ND	ND
BZN	92.50±0.57	5.35±1.25 ^a	1.75±0.95	0.33±0.47	1.00±0.50

ND = Não detectado

B)



C)



As imagens mostram a presença de células infiltradas no ambiente tumoral nos controles (A, a) e no tratamento com BZN (A, b). A atividade da mieloperoxidase (MPO) foi atenuada após o tratamento com BZN (C). (***) denota diferença estatística quando comparado aos controles ($p < 0,001$). Os valores são expressos como média \pm S.E.M, $n = 6$.

Fonte: do autor

6. DISCUSSÃO

O benzonidazol é o fármaco de primeira escolha para o tratamento da doença de Chagas no Brasil, sendo utilizado na clínica médica para combater o agente etiológico dessa doença, o *Trypanosoma cruzi*. Apesar de ser utilizado há muitos anos, pouco se sabe sobre o mecanismo de ação deste fármaco, porém o BZN trata-se de um pró-fármaco que necessita sofrer biorredução catalisada pelo citocromo P450 (CYP450) para tornar-se farmacologicamente ativo. O CYP450 reduz o BZN gerando os metabólitos intermediários que, juntamente com as ERO, aumentam o estresse oxidativo, responsáveis pelo efeito citotóxico e genotóxico (MORENO et al., 1982; MONICA et al., 1984; PEDROSA et al., 2001).

Os resultados obtidos com a presente pesquisa demonstraram que os animais tratados com BZN tiveram uma redução significativa no crescimento tumoral, maior sobrevida e redução da angiogênese (Figura 17A, B, C). Esses resultados podem estar diretamente relacionados a elevação do estresse oxidativo, uma vez que a adição do NAC, um conhecido antioxidante, promoveu reversão dos efeitos antitumorais observados no tratamento com BZN. Savin et al. (2014) demonstraram que NAC acelerou a progressão tumoral reduzindo a sobrevida de camundongos com câncer de pulmão. Além disso, a administração de NAC demonstrou reduzir a expressão de genes associados ao sistema de defesa endógeno contra ERO, diminuindo o dano oxidativo ao DNA, reduzindo estímulos importantes para a ativação e estabilização de proteínas de sinalização para a morte celular (SAHA, T. et al., 2015).

O BZN também elevou níveis da proteína p53 (Figuras 18B, 18C, 24B e 24D) e BAX resultando na efetiva da sinalização da apoptose (Figuras 18A, B, D). As proteínas BAX e p53 são importantes agentes supressores do desenvolvimento tumoral uma vez que são pró-apoptóticas, regulando a morte celular fisiológica ou fisiopatológica (ADAMS, J.M. CORY, S. 1998).

Ortmann et al. (2014) mostraram a interrelação positiva entre as proteínas de adaptação e morte celular com a progressão do ciclo celular. Nesse sentido, investigou se o tratamento com BZN poderia causar interferência no ciclo celular, e de fato verificou-se o “aprisionamento” de células do TAE na fase G1 do ciclo celular (Figura 19A). Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Calvo et al., (2013), que demonstraram a capacidade *in vitro* de BZN de “aprisionar” células leucêmicas na fase G1, processo este ocasionado à redução de níveis de ciclina A (Figuras 19A, B e C). Assim, os dados obtidos sugerem que o BZN pode interferir na regulação do ciclo celular, reduzindo níveis de ciclina

A tendo aumento compensatório dos níveis de CDK2 (Figuras 19A, B e D). Desta forma, BZN provavelmente interfere no ciclo celular que constitui um promissor alvo terapêutico para o controle antitumoral (OWA, T. et al. 2001).

Danos ao DNA geralmente levam à parada do ciclo celular e à inibição de vários importantes fatores de transcrição e a expressão de proteínas que são necessárias para o progresso do ciclo celular, como a ciclina A e CDK2. Foi verificado que tais mudanças envolvendo eventos celulares inteiros ocorreram sob o tratamento com BZN a partir do aumento intracelular ERO (Figura 20A). Esta elevação das ERO intracelular pode influenciar no aumento do influxo de cálcio através da atividade dos reguladores de Ca^{2+} ou de modo mais intenso, promovendo a lipoperoxidação da membrana celular. Estes efeitos por sua vez podem elevar diretamente o estresse oxidativo potencializando o sinal de morte celular. Canais reguladores de Ca^{2+} são potencializadores de ERO, permitindo assim que o influxo de Ca^{2+} influencie no aumento de ERO através das duas principais organelas reguladoras deste íon, o retículo endoplasmático (RE) e mitocôndrias (MT). O aumento no influxo de Ca^{2+} intracelular potencializa a geração de ERO, colapsando o RE e as MT. De acordo com Hempel, N., Trebak, M., (2017), o estresse oxidativo produzido pela metabolização do BZN pode gerar várias conseqüências que incidem sobre o ciclo celular e ativam a morte celular por ativação da apoptose. Rao, V.R et al. (2015) descreveram o envolvimento dos canais iônicos dependentes de voltagem (VGIC) durante o início e a progressão do ciclo celular em células tumorais. Canais iônicos de Ca^{2+} e Na^+ hiperpolarizam o espaço citoplasmático promovendo a transição do G0/G1 para Fase S. Nas fases subseqüentes, o processo é revertido quando o canal de Ca^{2+} é bloqueado gerando despolarização celular e parada do ciclo celular. Nossos resultados são similares aos obtidos por Rao, V.R et al. (2015), que demonstram a habilidade de BZN em possibilitar o influxo de Ca^{2+} nas células de TAE, através do aumento de ERO, provavelmente prevenindo a progressão do ciclo celular e promovendo o aprisionamento na fase G1 (Figura 20B). O colapso mitocondrial foi também evidenciado pelo aumento de níveis da proteína BAX, gerando um aumento do sinal de ativação da morte celular pelo tratamento com BZN (Figura 18B e D). Gogvadze, V. et al (2001), demonstraram que BAX aumenta a liberação de citocromo c pelo influxo de Ca^{2+} nas mitocôndrias causando potencialização da morte celular, revelando uma relação íntima desta proteína e o influxo de Ca^{2+} do espaço extracelular para o espaço intracelular. Adicionalmente, Dubrez, L. et al. (2001), demonstraram um sinergismo entre mobilização de Ca^{2+} para mitocôndrias, translocação de BAX para a membrana mitocondrial e aumento de níveis da

proteína p53. Neste contexto, é importante notar que o tratamento com BZN causou elevação do nível de p53 e mais uma vez tal efeito foi revertido pela adição de NAC (Figura 18B e C).

O tratamento com BZN também causou aumento da lipoperoxidação (Tabela 1), efeito este que foi revertido pelo tratamento com NAC evidenciando o papel do BZN na geração de ERO. Por outro lado, as defesas antioxidantes endógenas foram acionadas, uma vez que foi detectado uma diminuição significativa no conteúdo de GSH sugerindo um estado de insulto oxidativo (Tabela 1). Adicionalmente, os dados sugerem que não houve reciclagem de GSH, uma vez que a atividade de GR não se alterou em relação ao grupo controle (Tabela 1). É importante notar que houve uma forte atividade da GPx porém não houve nenhuma alteração significativa nos níveis de CAT em animais tratados com BZN, o que foi revertido pela associação com NAC (Tabela 1). É importante observar que a GPx utiliza GSH para a conversão de H_2O_2 em H_2O (HALLIWELL, B. GUITTERIDGE, J.M.C. 2007). A atividade da GST também utiliza GSH como cofator (HALLIWELL, B. GUITTERIDGE, J.M.C. 2007), e o aumento da atividade da GST sugere uma tentativa de proteção celular contra a toxicidade oxidativa causada pelos metabólitos reativos do BZN e ERO (Tabela 1). Além de seu papel na desintoxicação de hidroperóxidos derivados da lipoperoxidação, a GST também faz parte do processo de neutralização e excreção de metabólitos altamente reativos originados da fase I de biotransformação realizada pelo citocromo P450, como é o caso do BZN que sofre uma reação oxi-redutiva por este sistema enzimático. Além disso, depois do tratamento com BZN, foi detectada maior atividade da SOD nas células tumorais, quando comparada controle negativo, e novamente o NAC foi capaz de reverter esse processo oxidativo. Por fim, todos estes resultados corroboram os obtidos anteriormente por Pedrosa, R.C. et al. (2001), utilizando ratos sem tumor, gerando um perfil muito semelhante de defesas antioxidantes após o tratamento com benzonidazol, reforçando a conclusão de que este fármaco aumenta o estresse oxidativo.

De acordo com Diaz de Toranzo, et al. (1988), os metabólitos de BZN também são capazes de interagir e causar danos ao DNA do *Trypanosoma cruzi*. De forma semelhante ao parasita, as células de TAE também apresentaram alto índice de dano ao DNA após o tratamento com BZN, além disso, este dano foi caracterizado pelo clivagem da proteína PARP-1 (Figura 21A e B). Além disso, Diurez e Shah (1997) demonstraram que a presença de PARP-1 clivada é um marcador importante de apoptose celular. Conseqüentemente, o tratamento com BZN aumentou o dano ao DNA promovendo aumento da sinalização da apoptose. Ainda que, a bioatividade do BZN dependa da geração de ERO, simulações

computacionais demonstraram outro possível mecanismo de ação. Nossos resultados de simulações previram ligação de hidrogênio entre BZN e o DNA, além de interações hidrofóbicas com as bases nitrogenadas. (Figura 22). As ligações de Hidrogênio mantêm as bases nitrogenadas do DNA emparelhadas através de seus grupos funcionais carbonilo e/ou amina exocíclica. As interações do BZN e sua inserção no sulco menor da molécula de DNA poderiam favorecer o dano ao DNA inibindo o crescimento do TAE e aumentando a sobrevivência de camundongos. Estudos corroboram com nossos resultados demonstrando que a atividade antitumoral e antiprotozoárias podem ser atribuídas a interações entre o DNA e compostos baseados em bisbenzimidazole onde estão interagindo fisicamente (MANN J, et al. 2001; WILSON W.D., et al. 2008). Após a formação do complexo BZN-DNA, alterações de conformação do DNA provavelmente ocorreram e a probabilidade de dano foi aumentada pela hidrólise, possivelmente através de ataque nucleofílico de ERO pelo benzonidazol. Além do mais, o estudo *in silico* BZN demonstrou em simulação de ancoragem molecular a capacidade de interagir com a proteína Akt1 no domínio alostérico (Figura 23A). A interação ocorreu através de pontes de hidrogênio formadas entre o oxigênio doador BZN e os resíduos de aminoácidos Asn51 e Gln76, ambos dentro do domínio PH (Figura 23B e C). Inúmeras interações hidrofóbicas ocorreram entre os resíduos Akt1 (Asn51, Gln76, Trp77, Thr79 e Ile81) localizados no domínio PH. O BZN também interagiu com resíduos de aminoácidos dentro do domínio cinase (Ser202, Leu261, Val267, Tyr269 e Asp289). As simulações de dinâmicas moleculares, por outro lado, revelaram outra ligação H entre o aminoácido Tyr272 e o átomo de nitrogênio do grupo acetamida BZN. Essa ocorrência de ligação-H no mapa de existência de ligações de hidrogênio revelou sua importância para a estabilidade do complexo BZN - proteína (Figura 23D). Realmente, a ligação hidrogênio formada entre o Tyr272 e o BZN apresentou a maior taxa de ocupação em nossas simulações (Figura 23E).

As interações hidrofóbicas previstas através da dinâmica molecular mostraram que BZN interagiu com os resíduos Akt1 dentro dos domínios PH (Asn 54, Gln 79, Ile84) e quinase (Arg272, Asp274, Val270, Val271 e Tyr272). Nossos resultados mostraram poucas variações nos valores RMSD de BZN, apontando para estabilidade do ligante dentro dos sítios de ligação da proteína e favorável à estabilidade do complexo BZN-Akt1.

Portanto, os dados obtidos *in silico* mostraram que o complexo BZN-Akt1 interagiu através de ligação de hidrogênio com resíduos polares de aminoácidos, Asn51 e Gln76, além da interação de empilhamento de anel entre o grupo benzila de BZN e Trp77, além de, exibir várias interações hidrofóbicas com a proteína Akt1. Todas essas interações exibidas podem

contribuir para a estabilidade do complexo mantendo BZN dentro do sítio alostérico, inibindo assim a fosforilação de Akt1. A inibição bem-sucedida da Akt cinase depende da interação do inibidor com os domínios PH e cinase (TOLCHER, A.W. et al. 2009). As simulações de dinâmicas moleculares demonstraram que o BZN interage com resíduos localizados em ambos os domínios. A inibição alostérica do domínio de cinase por BZN poderia explicar parcialmente o seu efeito antitumoral observado *in vivo*.

Os resultados obtidos *in vivo* demonstram redução significativa de células viáveis e aumento de células em apoptose de TAE, quando comparado controle negativo e ao MTX (Figura 24A). Além do mais, quando avaliado níveis de γ H2AX e p53 verificou-se o aumento dos níveis de ambos quando comparado ao controle negativo (Figura 24B, C e D). O acúmulo da proteína γ H2AX desempenha um papel fundamental na sinalização após o dano no DNA para desencadear a apoptose (FERNANDEZ-CAPETILLO, O. et al. 2004). Consistente com estes resultados, os níveis da proteína BAX mitocondrial pró-apoptótica foram elevados no TAE de camundongos tratados com BZN. Choudhuri, T. et al. (2002) postulou que uma correlação positiva ocorre entre os aumentos nos níveis de p53 e BAX e a indução de apoptose em células de câncer de mama (CHOUDHURI, T. et al. 2002). Estudos demonstraram uma regulação positiva dependente de p53, que impede a ativação da via Akt/mTOR, reduzindo o crescimento celular e desencadeando a via de morte celular apoptótica (FENG, Z. & Levine, A.J. 2010; SAHA, T. et al. 2015). Nossos resultados demonstram que *in vivo* existe a redução na fosforilação de Akt/mTOR, reduzindo os níveis de HIF-1 α gerando conseqüente redução nos níveis de GLUT-1, desencadeando assim a apoptose (Figura 25A, B, C, D e E). O aumento de níveis de conteúdo de HIF-1 α é crucial na resposta causada pela hipóxia tecidual no microambiente tumoral que confere adaptação celular ao ambiente contendo baixa oxigenação. A ativação de HIF-1 α , envolve dessa forma, um importante via para reprogramação metabólica, proliferação, migração e angiogênese tumoral. Portanto como resultado da inibição desta via, houve maior sobrevivência, inibição do crescimento tumoral e redução da angiogênese *in vivo* (Figura 26A, B e C).

Por outro lado, ensaios realizados por Silva, E.L. et al. (1990), sugere que o BZN poderia agir como um modulador do sistema imune, levando a eliminação do *Trypanosoma cruzi*. Nossos dados também demonstraram a capacidade do BZN de modular o potencial citotóxico dos leucócitos no ambiente do TAE (Figura 27A e B). BZN modulou a capacidade citotóxica de leucócitos no ambiente TAE ao contrário do MTX, que suprimiu completamente o influxo de células imunes no tumor ascítico. Segundo Vial, T., Descotes, J., (2003), o

metotrexato é um forte agente imunossupressor, mesmo em doses terapêuticas e, por isso, é atualmente utilizado como quimioterápico no tratamento do câncer e como imunossupressor na terapia de doenças autoimunes (VIAL, T., DESCOTES, J. 2003).

Granot, Z. e Jablonska, J. (2015), demonstraram que diferentes fenótipos de neutrófilos apresentam distintas formas de ação contra células tumorais. Neutrófilos segmentados apresentam propriedades citotóxica, pró-apoptótica e antiangiogênica, diferentemente dos neutrófilos imaturos, que são caracterizados pela potencialização da carcinogênese, anti-apoptótico e pró-angiogênico (GRANOT, Z., JABLONSKA, J., 2015).

Santos, e colaboradores (2004) verificaram que a presença de neutrófilos no ambiente tumoral em camundongos BALB-c foi responsável pela capacidade de inibir o crescimento tumoral e aumentar o tempo de sobrevivência. Vale a pena ressaltar que células do TAE possuem baixa expressão de proteínas do complexo de histocompatibilidade, eliminando mecanismos inespecíficos de interação tumor-hospedeiro, demonstrando que a imunidade celular não é o principal mecanismo de reação do hospedeiro contra esse tumor (CHEN, L. WATKINS, J.F. 1970; SANTOS, P.C.B. et al., 2004).

Em células associadas a resposta imune, como leucócitos polimorfonucleares neutrófilos (neutrófilos), linfócitos, monócitos e macrófagos, a enzima mieloperoxidase (MPO) é a peroxidase mais abundantemente expressa. A MPO é uma enzima geradora de oxidantes, principalmente através da produção do ácido hipocloroso pelos neutrófilos, capaz de mediar a resposta inflamatória, contribuindo para o sistema de defesa contra patógenos e células tumorais (DAVIES, M.J. 2011). Por outro lado, algumas evidências sugerem que a superexpressão da MPO está associada ao desenvolvimento e disseminação de várias patologias envolvendo a potencialização da resposta inflamatória (GRIVENNIKOV, S.I. et al. 2010). A superprodução de MPO causa dano oxidativo em vários tipos de tecidos, provocando lesões recorrentes e crônicas, promovendo patologias como o câncer (GRIVENNIKOV, S.I. et al. 2010). He, C. et al (2009), demonstraram que o risco de desenvolvimento do câncer está diretamente relacionado ao conteúdo endógeno de MPO. Portanto, a modulação da MPO parece controlar a atividade citotóxica e imunoprotetora mediada por células de defesa (neutrófilos), tornando a ação citotóxica mais eficaz contra as células tumorais (CHANG, C.Y. et al. 2013). Nossos resultados corroboram as observações relatadas anteriormente, demonstrando também a capacidade do BZN de atenuar a expressão de MPO, gerando uma resposta inflamatória menos prejudicial, porém mais efetiva (Figura 6C, artigo 2). Resultados semelhantes foram obtidos por Lambertucci, F. (2017), que também

demonstrou a capacidade do BZN em atenuar a resposta inflamatória em modelos de sepse murina. Nesse cenário, os resultados obtidos sugerem que o BZN possui uma importante capacidade de inibir a progressão do tumor além de modular resposta imune o que gerar uma nova perspectiva para terapêuticas futuras do câncer.

Sabendo que a produção de um medicamento é um processo complexo, longo e oneroso o reaproveitamento de fármacos surge como uma forma de facilitar um novo uso clinica diferente ao da prescrição primária (ADANS et al., 2006; EMMERT-STREIB et al., 2013). Estimasse que para o desenvolvimento de um novo medicamento um valor entre 0,8 milhões a 1,5 bilhões de dólares distribuídos num tempo médio de 10 a 15 anos (HENRIQUES et al., 2004). Apesar de todo o gasto financeiro e o tempo consumido, poucas moléculas protótipo têm resultados satisfatórios desde a sua produção até a sua comercialização. Dados apresentados na literatura demonstram que dentre 1000 novas moléculas apenas 1 chegam a ser comercializada, enquanto as outras 999 moléculas falham quando são avaliadas sua segurança e eficácia nos estudos pré-clínicos (SCANNEL et al., 2012, NAGARAJ et al., 2018).

Neste sentido visando diminuir os gastos pela indústria farmacêutica e reduzir o tempo para a comercialização de um medicamento, a reposição de fármacos surge com uma importante opção para o reaproveitamento e identificação de novas indicações para medicamentos já existentes, bem como candidatos que foram arquivados nas fases I e II. Este processo que é denominado de “Descoberta de indicações” é uma maneira rápida de obter o retorno de investimentos nas pesquisas citadas anteriores. Resumidamente a reposição de fármacos aproveita três princípios básicos: redundância biológica, aplicações terapêuticas alternativas à novas indicações primárias e reaproveitamento de todas as informações clínicas e literárias como: farmacocinéticas, farmacodinâmicas e toxicidade. É importante salientar que além das vantagens financeiras e temporais, a reposição de fármacos também pode ser apropriada para vislumbrar a possibilidade de reposicionamento para doenças negligenciadas e doenças raras (BARRATT, M.J. FRAIL, D.E., 2012).

A pesquisa de novos fármacos para o tratamento de câncer também segue a mesma morosidade metodológica seguindo de uma identificação inicial, otimização dos compostos ou complexos testados, ensaio pré-clínicos e ensaio clínicos. Apesar de todos os esforços da comunidade científica e de grandes investimentos governamentais à procura de novos fármacos para combater o câncer, nenhum desenvolvimento farmacológico foi completamente bem-sucedido, e ao contrário, os valores monetários dos novos medicamentos que conseguem

aprovação aumentam a cada ano. Atualmente a taxa de aprovação de novos fármacos que combatem o câncer é cinquenta por cento menores do que para outras indicações, impulsionando assim este alto valor monetário o que demonstra a grande dificuldade na produção de novos fármacos para o câncer (PANTZIARKA, et al., 2014; OECD., 2018).

Estima-se que no momento mais de 20 mil ensaios clínicos estão sendo investigados sobre o potencial antitumoral de diversos novos compostos, vários deles registrados em www.clinicaltrials.gov, porém sabe-se que pouquíssimos passarão a ser comercializado (KOLA I., LANDIS J., 2004). Dados da agência Federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (FDA) demonstram que entre os anos de 2013 a 2017 houve uma tendência na redução em aprovação de fármacos para serem utilizados na oncologia. No ano de 2013 e no ano de 2014 a (FDA) autorizou o uso de 18 novos fármacos para oncologia, já em de 2015 a Agência autorizou a utilização de 14 novas moléculas, porém em 2016 ela autorizou apenas 4 novos fármacos e no ano de 2017 houve autorização de 12 novos fármacos para o uso na oncologia (MULLARD A., 2016; MULLARD A., 2017; MULLARD A., 2018)

Nesta perspectiva a reposição de fármacos para tratamento do câncer poderia ser vantajosa porque vários dados farmacológicos já estão disponíveis reduzindo a necessidade de estudos longos sobre farmacocinética, farmacodinâmica, toxicidade e assim, diminuindo os custos e tempo para uma nova indicação. Desta forma, o fármaco Benzonidazol, que está disponível no mercado brasileiro para o tratamento da Doença de Chagas, surge como uma possibilidade de reposicionamento visando assim à descoberta para novas indicações terapêuticas. Seu mecanismo de ação tem como propósito o aumento de ERO, gerando danos em biomoléculas importantes ocasionando assim, a morte do parasita. Em células tumorais que possuem suas defesas oxidantes irregulares o BZN demonstrou inibir o crescimento tumoral através de mecanismos de ação variados. Além disso, o presente estudo demonstra a capacidade do BZN de interagir com a proteína Akt1 inibindo a ativação da via Akt/mTOR, apresentando uma nova opção de inibição do crescimento e proliferação tumoral. Portanto neste contexto o BZN demonstrou atuar por diferentes mecanismos de ação, inibindo o crescimento tumoral, tornando uma possibilidade para uma nova indicação terapêutica, conforme demonstraram os resultados obtidos na presente pesquisa.

7. CONCLUSÃO GERAL

A partir dos resultados obtidos com a presente pesquisa podemos concluir que:

- O BZN demonstrou uma importante capacidade de inibição do crescimento tumoral, aumento da sobrevivência e redução da angiogênese dos animais tratados com este antiparasitário.
- A atividade antitumoral observada da BZN pode ser associada a uma maior geração de ERO, que poderia induzir estresse oxidativo no microambiente tumoral, causando aumento da lipoperoxidação da membrana celular, aumento do influxo de Ca^{2+} , dano ao DNA, aumento de níveis de BAX e p53 assim ativando a apoptose.
- A atividade antitumoral observada de BZN também pode ser associada ao bloqueio do ciclo celular por redução de níveis de ciclina A, provavelmente decorrendo do dano ao DNA e menor estímulo para a sobrevivência celular.
- O estudo *in silico* demonstrou que o BZN pode interagir com a proteína Akt nos domínios PH e cinase inibindo sua fosforilação.
- A simulação *in silico* demonstrou que a interação ocorreu através de pontes de hidrogênio entre o oxigênio doador do BZN e os resíduos de aminoácidos Asn51 e Gln76 além de várias interações hidrofóbicas com Asn51, Gln76, Trp77, Thr79 e Ile81 localizados no domínio PH. BZN também interagiu com resíduos de aminoácidos no domínio cinase (Ser202, Leu261, Val267, Tyr269 e Asp289).
- A dinâmica molecular, revelou que ligação H entre o aminoácido Tyr272 e o átomo de nitrogênio do grupo acetamida BZN apresentou a maior taxa de ocupação na simulação *in silico*.
- O BZN reduziu a fosforilação da Akt e mTOR gerando menores níveis de HIF-1 α e GLUT-1, sugerindo a modulação da via da Akt/mTOR como um possível mecanismo de ação antitumoral deste fármaco;
- O BZN apresentou atividade imunomodulatória, facilitando a ação citotóxica de células imunológicas frente ao tumor.

Por fim, ainda são necessários estudos mais detalhados das vias de sinalização celular envolvidas no efeito antitumoral e imunomodulador do BZN, considerando que este fármaco possui

promissor efeito terapêutico, permitindo um possível reposicionamento farmacêutico como agente antitumoral.

8. PERSPECTIVAS

Com base nos resultados apresentados nesta tese permanecem questões a serem consideradas e investigadas sobre um potencial uso do BZN relacionados com atividade antitumoral como:

- Avaliar possíveis modificações químicas na estrutura ou formulação do BZN que melhorem a sua solubilidade;
- Avaliar a inibição do crescimento tumoral por BZN em diferentes tempos e no tratamento crônico (acima de 20 dias);
- Investigar a complementaridade da via de sinalização PI3K/Akt/mTOR, empregando modelo *in vivo*;
- Realizar ensaio de atividade e cinética enzimática da Akt;
- Avaliar a influência do tratamento com BZN na atividade mitocondrial, observando a atividade da cadeia respiratória mitocondrial, além de investigar alterações da polaridade da membrana mitocondrial ocasionada pelo tratamento;
- Avaliar a atuação de canais de cálcio Receptor Transiente (TRP) e sua influência do influxo de cálcio, para obter melhores informações do mecanismo deste influxo;
- Avaliar marcadores de estresse do retículo endoplasmático que gera aumento do influxo de cálcio para a mitocôndria;
- Avaliar marcadores importantes relacionados ao sistema imunológico como citocinas pró e anti-inflamatória Interleucinas 8 e 10;
- Avaliar sinalização e mecanismos de citotoxicidade celular de neutrófilos e linfócitos com o tratamento de BZN;
- Investigar os efeitos da associação do BZN com medicamentos que já são usados na clínica, como por exemplo: metotrexato, doxorrubicina e 5-fluorouracil;

- Avaliar a influência do tratamento com BZN no metabolismo celular, investigando assim, a captação de glicose em células de tumor ascítico de Ehrlich;
- Investigar a glicemia e resposta à insulina em animais tratados com BZN uma vez que a literatura científica tem demonstrado que inibidores da Akt podem induzir diabetes tipo II.

9. REFERÊNCIAS

ADAMS, C.P.; BRANTNER, V. V. Estimating the cost of new drug development: is it really \$802 million? **Health Aff.** v.2, n. 25, p: 420–428, 2006.

ADAMS, J.M.; CORY, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. **Science.** v. 281, n. 5381, p. 1322-1326, 1998.

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods Enzymol.** v. 105, p. 121-126, 1984.

ALBERTS, Bruce. **Biologia molecular da célula.** 5. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2010. xxxv. 1268, 40, 50 p ISBN 9788536320663.

AGRAWAL, S. S.; SARASWATIS, S.; MATHUR, R. et al. Antitumor properties of boswellic acid against Ehrlich ascites cells bearing mouse. **Food Chem Toxicol.** v. 9, p. 1924–1934, 2011.

ALDERTON, W. K.; COOPER C. E. KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure,function and inhibition, **Biochem J.** v. 1, n. 357, p. 593–615, 2001.

AUSIO, J.; ABBOTT, D. W. The many tales of a tail: carboxy-terminal tail heterogeneity specializes histone H2A variants for defined chromatin function. **Biochem.** v. 14, n. 41, p. 5945-5949, 2002.

BABCOCK, D. F.; HERRINGTON, J. GOODWIN, P. C. et al. Mitochondrial participation in the intracellular Ca²⁺ network, **J Cell Biol.** v. 24, n. 136, p. 833-844, 1997.

BANFI, B.; TIRONE, F. DURUSSEL, L. et al. Mechanism of Ca²⁺ activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5), **J Biol Chem.** v. 30, n. 279, p. 18583-18591, 2004.

BASU, A.; GHOSH, P.; BHATTACHARJEE, A. et al. Prevention of myelosuppression and genotoxicity induced by cisplatin in murine bone marrow cells: effect of an organovanadium compound vanadium (III)- L-cysteine. **Mutagenesis.** v. 4, p. 509–517, (2015).

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. G. C. et al. Estresse oxidativo: conceitos, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr. Campinas.** v. 23, n. 4, p. 629-643.

BARRATT, M. J.; FRAIL, D. E. Drug Repositioning: Bringing new life to shelved assets and existing drugs. **John Wiley & Sons, Inc.**, Hoboken, New Jersey, 2012.

BARTEL, L. L. C.; MONTALTO DE MECCA, M.; DE CASTRO, C. R. et al. Metabolization of nifurtimox and benznidazole in cellular fractions of rat mammary tissue. **Hum Exp Toxicol.** v. 29, n. 10, p. 813-822, 2010.

BATRA, S.; JOGREN, C. S. Effect of estrogen treatment on calcium uptake by the rat uterine smooth muscle. **Life Sci.** v. 4, p. 315-319, 1983.

BERTRAM, J. S. The molecular biology of cancer. **Mol Aspects Med.** v. 21, p.167-223, 2001.

BESSON, A.; DOWDY, S. F.; ROBERTS, J. M. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. **Dev Cell.** v. 14, n. 2, p. 159-169, 2008.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **J Lab Clin Med.** v. 6, p. 882-888, 1963.

BIENERT, G. P.; MOLLER, A. L.; KRISTIANSEN, K. A. et al. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. **J Biol Chem.** v. 282, n. 2, p. 1183–1192, 2007.

BORTOLOTTO, T.; SILVA-CALDEIRA, P. P.; PICH, C. T. Tun able DNA cleavage activity promoted by copper (II) ternary complexes with N-donor heterocyclic ligands. **Chem Common.** v. 44, p. 7130-7133, 2016.

BRAND, M. D. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. **Exp Gerontol.** v. 45, m. 7-8, p. 466-472, 2010.

BRANDES, R. P.; WEISSMANN, N.; SCHRODER, K. Nox family NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation, **Free Radic Biol Med.** v. 76, p. 208-226, 2014.

BREWER, T. F.; GARCIA, F. J.; ONAK, C. S. et al. Chemical approaches to discovery and study of sources and targets of hydrogen peroxide redox signaling through NADPH oxidase proteins. **Annu Rev Biochem.** v. 2015, n. 84, p. 765-90, 2015.

BUSCHINI, A.; GIORDANI, F.; DE ALBURQUERQUE, C. N. et al. Trypanocidal nitroimidazole derivatives: Relationships among chemical structure and genotoxic activity. **Biochem Pharmacol.** v. 73, n. 10, p. 1537-1547, 2007.

CALBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase from rat liver. **Methods Enzymol.** v. 113: p. 484-490, 1985.

CAO, L. L.; SHEN, C.; ZHU, W. G. Histone modifications in DNA damage response. **Sci China Life Sci.** v. 59, n. 3, p. 257-70, 2016.

CASTRO, L. S. E. W.; KVIECINSKI, M. R.; OURIQUE, F. et al. Albendazole as a promising molecule for tumor control. **Redox Biol.** v.10, p. 90-99, 2016.

CHANG, C. Y.; CHOI, D. K.; LEE, D. K. et al. Resveratrol confers protection against rotenone induced neurotoxicity by modulating myeloperoxidase levels in glial cells. **Plos One**, v. 8, n. 4, p. 1-13, 2013.

CHEN, L.; WATKINS, J. F. Evidence against the presence of H2 histocompatibility antigens in Ehrlich ascites tumor cells. **Nature**. v. 225, p. 734-735, 1970.

CHOUDHURI, T.; PAL, S.; AGWARRWAL, M. L. et al. Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction. **Eur J Biochem**. v. 13, n. 1-3, p. 334-340, 2002.

COLLEEN, R. R.; NAVDEEP, S. C. The Two Faces of Reactive Oxygen Species in Cancer. **Annu Rev Cancer Biol**. v. 1, p. 79-98, 2017.

COZZI, P. The discovery of a new potential anticancer drug: a case history. **Farmaco**. v. 58, n. 3, p. 213-220, 2003.

DAVIES, M. J. Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. **J Clin Biochem Nutr**. v. 48, n. 1, p. 8-19, 2011.

DE FALCO, M.; DE LUCA, A. Cell cycle as a target of antineoplastic drugs. **Curr Pharm Des**. v.16, n. 2, p. 1417-1426, 2010.

DE VITA, V. T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S. A. Cancer: Principles and Practice of Oncology. Ed. 5th, Philadelphia, J.B. Lippincott Company, 1998.

DENDULURI, S. K.; IDOWU, O.; WANG, Z. et al. Insulin-like growth factor (IGF) signaling in tumorigenesis and the development of cancer drug resistance. **Genes Dis**. v. 2, n. 1, p. 13-25, 2015.

DESCOTES, J.; VIAL, T. Immunosuppressive drugs and cancer. **Toxicology**. v. 185, n. 3, p. 229-240, 2003.

DEVIGNES, C. S.; ASLAN, Y.; BRENOT, A. et al. HIF signaling in osteoblast lineage cells promotes systemic breast cancer growth and metastasis in mice. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 115, n. 5, p. 992-1001, 2018.

DIAZ DE TORANZO, E. G.; CASTRO, J. A.; FRANKE DE CAZZULO, B. M. et al. Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplasmic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*, **Experientia**. v. 44, n. 10, p. 880-881, 1988.

DIAZ-MORALLI, S.; TARRADO-CASTELLARNAU, M.; MIRANDA, A. et al. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. **Pharmacol Ther**. v.138, n. 2, p. 255-271, 2013.

DOWNS, J. A. Chromatin structure and DNA double-strand break responses in cancer progression and therapy. **Oncogene**, v. 26, n. 56, p. 7765-7772, 2007.

DROSE, S.; BRANDT, U. Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. **Adv Exp Med Biol**. v. 2012, n. 748, p. 145–169, 2012.

DUBREZ, L.; COLL, J. L.; HURBIN, A. et al. Caffeine sensitizes human H358 cell line to p53-mediated apoptosis by inducing mitochondrial translocation and conformational change of BAX protein. **J Biol Chem**. v. 276, n. 42, p. 38980-38987, 2001.

DURIEZ, P.; SHAH, G. M. Cleavage of poly (ADPribose) polymerase: a sensitive parameter to study cell death. **Biochem Cell Biol**. v. 75, n. 4, p. 337-349, 1997.

EDINGER, A. L.; THOMPSON, C. B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. **Curr Opin Cell Biol**. v. 16, n. 6, p. 663-669, 2004.

EISINGER, F.; JACQUEMIER, J.; CHARPIN, C. et al. Mutations at BRCA1: the medullary breast carcinoma revisited. **Cancer Res**. v. 58, n. 8, p.1588-1592, 1998.

EMMERT-STREIB, F.; TRIPATHI, S.; SIMOES, R. M. et al. The human disease network. **Syst Biomed**. v. 1, n. 1, p. 20–28, 2013.

ERDTMANN, Bernardo. **A Genotoxicidade Nossa de Todos os Dias**. In: Genética Toxicológica. Porto Alegre. Editora Alcance, 2003. p. 23-47.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4ed. São Paulo. **Atheneu**, 2003. pt2, fascículo 4, p.177-177.2.

FENG, Z.; LEVINE, A. J. The regulation of energy metabolism and the IGF-1/mTOR pathways by the p53 protein. **Trends in Cell Biol.** v.20, n. 7, p. 427-434, 2010.

FERNANDEZ-CARPETILLO, O.; LEE, A.; NUSSENZWEIG, M. et al. H2AX: The histone guardian of the genome. **DNA Repair.** v. 3, n. 8-9, p. 959-967, 2004.

FLOHÉ, L.; GUNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol.** v. 105, p. 114-121, 1984.

FORLI, S.; HUEY, R.; PIQUE, M. E. et al. Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. **Nat Protoc.** v. 5, p. 905–919, 2016.

FREderICO, M. J. S.; CASTRO, A. J. G.; MASCARELLO, A. et al. Acylhydrazones contribute to serum glucose homeostasis through dual physiological targets. **Curr Top Med Chem.** v. 19, p. 2049-2058, 2012.

GIORGI, C.; BALDASSARI, F. BONONI, A. et al. Mitochondrial Ca⁽²⁺⁾ and apoptosis. **Cell Calcium.** v. 52, n. 1, p. 36-43, 2012.

GOGVADZE, V.; ROBERTSON, J. D.; ZHIVOTOVSKY, B. et al. Cytochrome c release occurs via Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent mechanisms that are regulated by Bax. **J Biol Chem.** v. 276, n. 22, p. 19066-19071, 2001.

GONÇALVES R. L.; QUINIAN, C.; PEREVOSHCHIKOVA, I. V. et al. Sites of superoxide and hydrogen peroxide production by muscle mitochondria assessed ex vivo under conditions mimicking rest and exercise. **J Biol Chem.** v. 290, n. 1, p. 209-27, 2015

GOODSELL, D. p53 Tumor Suppressor. Molecule of the month, July 2002. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=31>>. Acesso em Agosto 2017.

GORRINI, C.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nat Rev Drug Discov.** v. 12, n. 12, p. 931-47, 2013.

GRANOT, Z.; JABLONSKA, J. Distinct function of neutrophil in cancer and its regulation, **Mediators Inflamm.** v. 2015, p. 1-11, 2015.

GRETARSDOTTIR, S.; THORLACIUS, S.; VALGARDSOTTIR, R. et al. BRCA2 and p53 mutations in primary breast cancer in relation to genetic instability. **Cancer Res.** v. 58, n. 5, p.859-862, 1998.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell.** v. 140, n. 6, p. 883-899, 2010.

GURR, E. Synthetic dyes in biology, medicine and chemistry. Academic Press, London & New York, 1971.

HA, E. M.; LEE, K. A.; PARK, S. H. et al. Regulation of DUOX by the Gαq-phospholipase C β-Ca²⁺ pathway in Drosophila gut immunity. **Dev Cell.** v. 16, n.3, p. 386-397, 2009.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases, The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J Biol Chem.** v. 22, p. 7130-7139, 1976.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**, 4th ed. Oxford, Clarendon, 2007.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The next generation. **Cell.** v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HANWELL, M.D.; CURTIS, D. E.; LONIE, D. C. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **J Chem informatics**. v.4, p. 1-17, 2012.

HART, K.; FOLOPPE, N.; BAKER, C. M. et al. Optimization of the CHARMM additive force field for DNA: Improved treatment of the BI/BII conformational equilibrium. **J Chem Theory Comput**. v. 8, p. 348-362, 2012.

HE, C.; TAMIMI, R. M.; HANKINSON, S. E. et al. A prospective study of genetic polymorphism in MPO, antioxidant status, and breast cancer breast cancer risk. **Breast Cancer Res Treat**. v. 113, n. 3, p. 585-594, 2009.

HEMPEL, N.; TREBAK, M. Crosstalk between calcium and reactive oxygen species signaling in cancer. **Cell Calcium**. v. 63, p. 70-98, 2017.

HENRIQUES, M. G. M. O.; SIANI, A. C.; PEREIRA, J. G. O Papel dos institutos de pesquisa no estabelecimento de bases técnicas e gerenciais para o desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos no Brasil. **Instituto de Tecnologia em Fármacos, FIOCRUZ, Brasil**, 2004. Disponível em: < http://www.sbpcnet.org.br/livro/56ra/banco_conf_simp/textos/MaGracasHenriques.htm>. Acesso em: 13 Out. 2018.

HERNANDEZ, C.; HUEBENER, P.; SCHWABE, R. F. Damage-associated molecular patterns in cancer: a double-edged sword. **Oncogene**. v. 35, n. 46, p. 5931–5941, 2016.

HWANG, M. S.; SCHWALL, C. T.; PAZARENTZOS, E. et al. Mitochondrial Ca⁺² influx targets cardiolipin to disintegrate respiratory chain complex II for cell death induction. **Cell Death Differ**. v. 21, n. 11, p. 1733-1745, 2014.

HOCHEGGER, H.; TAKEDA, S.; HUNT, T. et al. Cyclin dependent kinases and cell cycle transitions: does one fit all? **Nat Rev Mol Cell Biol**. v. 9, n. 11, p. 910-916, 2008.

HORNAK, V.; ABEL, R.; OKUR, A. et al. Comparison of multiple AMBER force fields and development of improved protein backbone parameters. **Proteins**. v.15, p. 712-725, 2006.

HSIN, J.; ARKHIPOV, A.; YIN, Y. et al. Using VMD - An Introductory Tutorial. **CurrProtoc Bioinformatics**. December; Chapter: Unit-5.7, 2008.

ICLIM, G.; TAIT, S. W. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. **Nat Rev Cancer**. v. 16, n. 8, p.539-548, 2016.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA. **Estimativa incidência de câncer 2018 (a)**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2018-incidencia-de-cancer-no-brasil>. Acesso em: 4 Jun. 2019.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA. **Prevenção do câncer (b)**. <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/prevencao-fatores-de-risco/como-prevenir-cancer>>. Acesso em: 23 Jun. 2019

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA. **Tratamento**. [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site /tratamento](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/tratamento) Acesso em: 19 abr. 2018. Acesso em: 23 Jun. 2019

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA. **Tratamentos para câncer**. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/tratamento>. Acesso em: 19 abril. 2018.

JORGENSEN, I.; MIAO, E. A. Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. **Immunol Rev**. v. 265, n. 1, p. 130-142, 2015.

JORGENSEN, W. L.; CHANDRASEKHAR, J.; MADURA, J. D. et al.. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **J Chem Phys**. v. 2, p. 926-935, 1983.

KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v. 432, n. 18, p. 316-323, 2004.

KAWAHARA, A.; OHSAWA, Y.; MATSUMURA, H. et al. Caspase-independent cell killing by Fas-associated protein with death domain. **J Cell Biol.** v. 143, n. 5, p. 1353-1360, 1998.

KIM, J.Y.; DHO, S. H.; KWON, E. S. et al. NOX5-L can stimulate proliferation and apoptosis depending on its levels and cellular context, determining cancer cell susceptibility to cisplatin. **Oncotarget.** v. 17, n. 6, p. 39235–39246, 2015.

KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. "**Introduction**".**The genetic basis of human cancer.** 2.ed. New York: McGraw-Hill, Medical Pub. Division., 2002, p.5.

KISCHKEL, F. C.; HELLBARDT, S.; BEHRMANN, I. et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins from a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. **EMBO J.** v. 14, n. 22, p. 5579-5588, 1995.

KOLA, I.; LANDIS, J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? **Nat Rev Drug Discov.** v. 3, n. 8, p. 711–715, 2004.

KRYSKO, O.; AAES, T. L.; KAGAN, V. E. et al. Necroptotic cell death in anti-cancer therapy. **Immunol Rev.** v. 280, n. 1, p. 207-219, 2017.

KUMARI, R.; KUMAR, R. Open Source Drug Discovery Consortium, Lynn A g_MMPBSA--a GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. **J Chem Inf Model.** v. 54, p. 1951–1962, 2014.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** v. 227, p. 680–685, 1970.

LAMBERTUCCI, F.; MOTIÑO, O.; VILLAR, S. et al. Benznidazole, the trypanocidal drug used for Chagas disease, induces hepatic NRF2 activation and attenuates the inflammatory response in a murine model of sepsis. **Toxicol Appl Pharmacol.** v. 15, n. 315, p. 12-22, 2017.

LASKOWSKI, R. A.; SWINDELLS, M. B. LigPlot+: Multiple LigandProtein Interaction Diagrams for Drug Discovery. **J Chem Inf Model.** v. 51, p. 2778-2786, 2011.

LAUCELLA, S. A.; MAZLIAH, D. P.; BERTOCCHI, G. et al. Changes in Trypanosoma cruzi-specific immune responses after treatment: surrogate markers of treatment efficacy. **Clin Infect Dis.** v.149, n. 11, p. 1675-1684, 2009.

LEMKUL, J. A. From Proteins o Perturbed Hamiltonians: A Suite of Tutorials for the GROMACS-2018 Molecular Simulation Package [Article v1.0]. Liv **J. Comp Mol Sci.** v. 1, p. 5068, 2019.

LI, J. H.; WANG, J. T.; HU, P. et al. Synthesis, structure and nuclease activity of copper complexes of bisubstituted 2,2'-bipyridine ligands bearing ammonium groups. **Polyhedron.** v. 27, p. 1898-1904, 2008.

LIU, J. J.. LIN, M.; YU, J. Y. et al. Targeting apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutics. **Cancer Lett.** v. 300, n. 2, p. 105-114, 2011.

LODISH. Harvey. **Biol Cel Mol.** 5. ed Porto Alegre: Artmed, p.1054. 2005.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem.** v. 1, p. 265-275, 1951.

LOPEZ-CONTRERAS, A. J.; FERNANDEZ-CAPETILLO, O. Signalling DNA damage. Biochemistry, Genetics and Molecular Biology " protein phosforylation in Human Heath". **Cai Huana.** v. 6, 2012.

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. 1003-1015, 2001.

MANN, J.; BARON, A.; OPOKU-BOAHEN, Y. et al. A new class of symmetric bisbenzimidazole-based DNA minor groove-binding agents showing antitumor activity. **J Med Chem.** v. 44, n. 2, p. 138-144, 2001.

MASCOTTI, K.; MCCULLOUGH, J.; BURGER, S.R HPC viability measurement: trypan blue versus acridine orange and propidium iodide. **Transfusion.** v. 6, p. 693-696, 2000.

MATT, S.; HOFMANN, T.G. The DNA damage-induced cell death response: a roadmap to kill cancer cells. **Cell Mol Life Sci.** v. 73, n. 15, p. 2829-2850.

MAYER, A. L.; ARTEAGA, C. L. The PI3K/AKT pathway as a target for cancer treatment. **Annu Rev Med.** v. 2016, n. 67, p. 11-28, 2016.

MCCALL, K. Genetic control of necrosis – another type of programmed cell death. **Curr Opin Cell Biol.** v. 22, n. 6, p. 882–888, 2010.

MCELFRESH, G. W.; DELIGKARIS, C. A vibrational entropy term for DNA docking with autodock. **Comput Biol Chem.** v. 74, p. 286-293, 2018.

MEIER, P; KAPLAN, E. L. Nonparametric estimation from incomplete observations. **J Am Stat Assoc.** v. 282, p. 457-481, 1958.

MERLO, L. M.; PEPPER, J. W.; REID, B. J. et al. Cancer as an evolutionary and ecological process. **Nat Rev Cancer.** v. 6, n. 12, p. 924–35, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 38, n. 3, p. 1-30, 2005.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem.** v. 247, p. 3170-3175, 1972.

MITRA, P.; YANG, R. M.; SUTTON, J. et al. CDK9 inhibitors selectively target estrogen receptor-positive breast cancer cells through combined inhibition of *MYB* and *MCL-1* expression. **Oncotarget**, v. 7, n. 8, p. 9069-9083, 2016.

MITTLER, R. Ros are good. **Trends Plant Sci.** v. 22, n. 1, p. 11-19, 2017.

MOFFAT, J.; HASHIMOTO, M.; KOJIMA, A. et al. Apoptosis induced by 1'-acetoxychavicol acetate in Ehrlich ascite tumor cells is associated with polyamine metabolism and caspase-3- action. **Carcinogenesis**, v.21, n. 12, p. 2151-2157, 2000.

MONICA, M.; EDITH, G. D. T.; JOSÉ, C. A. Reductive metabolism and activation of benznidazole. **Biochem Pharmacol.** v. 33, n. 7, p. 1041-1045, 1984.

MORENO, S. N. J.; DOCAMPO, R.; MASON, R. P. et al. Different Behaviors of benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparation, **Arch Biochem Bioph.** v. 218, n. 2, p. 585-591, 1982.

MORTON, D.B. A systematic approach for establishing humane endpoints, **ILAR j.** v. 2, p. 80-86, 2000.

MULLARD, A. 2015 FDA drug approvals, **Nat Rev Drug Discov.** v. 15, n. 2, p. 73–76, 2016.

MULLARD, A. 2016 FDA drug approvals, **Nat Rev Drug Discov.** v. 16, n. 2, p. 73–76, 2017.

MULLARD, A. 2017 FDA drug approvals, **Nat Rev Drug Discov.** v. 17, n. 2, p. 01–05, 2018.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species, **Biochem J.** v. 417, n. 1, p. 1–13, 2009.

NADINE, H.; MOHAMED, T. et al. Crosstalk between calcium and reactive oxygen species signaling in cancer. **Cell Calcium**. v. 63, p. 70–96, 2017.

NAGARAJ, A. B.; WANG, Q. Q.; JOSEPH, P. et al. Using a novel computational drug-repositioning approach (DrugPredict) to rapidly identify potent drug candidates for cancer treatment. **Oncogene**. v. 37, n. 3, p. 403–414, 2018.

NATIONAL CANCER INSTITUTE - NIH - Tratamento do câncer. Disponível em: [https:// www.cancer.gov/about-cancer/treatment/clinical-trials/what-are-trials/where/clinical-center](https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/clinical-trials/what-are-trials/where/clinical-center). Acesso em 19 Abr. 2018.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NUNEZ, R. DNA Measurement and Cell Cycle Analysis by Flow Cytometry. *Curr Issues Mol Biol*. v. 3, p. 67-70, 2001.

OCTAVIA, Y.; TOCCHETTI, C. G.; GABRIELSON, K. L. et al. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. **J Mol Cell Cardiol**. v. 52, n. 6, p. 1213-1225, 2012.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem**. v. 2,p. 351-358, 1979.

O'BOYLE, N.; BANCK, M.; JAMES, C. Open Babel: An open chemical toolbox. **J. Cheminf**. p. 30-33, 2011.

OLIVIER, M.; EELES, R.; HOLLSTEIN, M. et al. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. **Hum Mutat**. v. 19, n.6, p. 607-614, 2002.

ORGANIZAÇÃO PARA A COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONOMICO - OECD- <http://www.oecd.org/health/pharmaceuticals.htm> acessado em: 04 Abr. 2018.

ORTMANN, B.; DRUKER, J.; ROCHA, S. et al. Cell cycle progression in response to oxygen levels. **Cell Mol Life Sci.** v. 71, n. 18, p. 3569-3582, 2014.

PANTZIARKA, P.; BOUCHE, G.; MEHEUS, L. et al. The Repurposing Drugs in Oncology (ReDO) Project. **Ecancermedicalsecience.** v. 8, p. 442, 2014.

PEDROSA, R. C.; DE BEM, A. F.; LOCATELLI, C. et al. Time-dependent oxidative stress caused by benzonidazole. **Redox Rep.** v. 6, n. 4, p. 265-270, 2001.

PFEIFER, G. P. Enviomental exposures and mutational patterns of cancer genomes. **Genome Med.** v. 2, n. 54, p. 1-4, 2010.

PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T.D.; HUANG, C. C. et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. **J Comput Chem.** v. 13, p. 1605-1612, 2004.

PINTON, P.; FERRARI, D.; MAGALHÃES, P. et al. Reduced loading of intracellular Ca^{2+} stores and downregulation of capacitative Ca^{2+} influx in Bcl-2-overexpressing cells. **J Cell Biol.** v. 6, n. 148, p. 857-862, 2000.

PODHORECKA, M.; SKLADANOWSKI, A.; BOZKO, P. et al. H2AX phosphorylation: its role in DNA damage response and cancer therapy. **J Nucleic Acids.** v. 3, n. 2010, p. 1-9, 2011.

RANG, H. P. **Farmacologia.** 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

RAO, V. R.; PEREZ-NEUT, M.; KAJA, S. et al. Voltage-gated ion channels in cancer cell proliferation. **Cancers.** v. 7, n. 2, p. 849-875, 2015

RAO, T. S. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA) - and tetradecanoylphorbol acetate (TPA) - induced dermal inflammation, **Inflammation**. v. 17, p. 723-741, 1993.

REED, J. C. Bcl-2 family proteins. **Oncogene**, v.17, p.3225–3236, 1998.

RIGALLI, J. P.; PERDOMO, V. G.; LUQUITA, M. G. et al. Regulation of Biotransformation systems and ABC transporters by Benznidazole in HepG2 Cells: Involvement of Pregnane X-Receptor. **Plos Negl Trop Dis**. v. 6, n. 12, p. 1-10, 2012.

RIZZUTO, R.; DE STEFANI, D.; RAFFAELLO, A. et al. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. **Nat Rev Mol Cell Biol**. v.13, n. 9, p. 566-578, 2012.

ROGAKOU, E. P.; PILCH, D. R.; ORR, A. H. et al. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. **J Biol Chem**. v. 273, n. 6, p. 5858-5868, 1998.

RONG, Y. P.; BULTYNCK, G.; AROMOLARAN, A. S. et al. The BH4 domain of Bcl-2 inhibits ER calcium release and apoptosis by binding the regulatory and coupling domain of the IP3 receptor. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 106, n. 34, p. 14397-14402, 2009.

SAHA, T.; RAJIV, K. K.; GAURISANKAR, S. Structural and sequential context of p53: A review of experimental and theoretical evidence. **Prog Biophys Mol Biol**. v. 117, n. 2-3, p. 250-263, 2015.

SALAZAR-ROA, M.; MALUMBRES, M. Fueling the Cell Division Cycle. **Trends Cell Bio**. v. 27, n. 1, p. 69-81, 2017.

SANTOS, P. C. B.; MARIANO, M.; BARBUTO, J. A. et al. Dual role of polymorphonuclear neutrophil on the growth of Ehrlich ascites tumor (EAT) in mice. **Life Sci**. v.75, n. 2, p. 245-255, 2004.

SATHLER-AVELAR, R.; VITELLI-AVELAR, D. M.; MASSARA, R. L. et al. Benznidazole treatment during early-indeterminate Chagas' disease shifted the cytokine

expression by innate and adaptive immunity cells toward a type 1-modulated immune profile. **Scand J Immunol.** v. 64, n. 5, p. 554-563, 2006.

SAVIN, V. I.; IBRAHIN, M. X.; LARSSON, E. et al. Antioxidants accelerate lung cancer progression in mice, **Sci Transl Med.** v. 6, n. 221, p. 1-8, 2014.

SANTRA, A; CHOWDHURY, A; GHATAK, S; et al. Arsenic induces apoptosis mouse liver is mitochondria dependent and is abrogated by *N*-acetylcysteine. **Toxicol Appl Pharmacol.** v. 2, p. 146-155, 2007.

SCANNELL, J. W.; BLANCKLEY, A.; BOLSON, H. et al. Diagnosing the decline in pharmaceutical R&D efficiency. **Nat Rev Drug Discov.** v.11, n. 3, p. 191–200, 2012.

SENGUPTA, S.; HARRIS, C. C. p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v. 6, p. 44-55, 2005.

SERRANO, M.; HANNON, G. J.; BEACH, D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. **Nature.** v.366, p.704-707, 1993.

SHERR, C. J.; Roberts, J. M. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. **Genes Dev.** v. 18, n. 22, p. 2699 - 2711, 2004.

SILVA, E. L.; FILARDI, L. S.; LENY, S. et al. Effect of the host specific treatment in the phagocytosis of *Trypanosoma cruzi* blood forms by mouse peritoneal macrophages. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 85, n. 4, p. 401-405, 1990.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; et al. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res.** v. 1, p. 184-191, v. 1998.

STOEBER, K.; WILLIAMS, G. H. The cell cycle and cancer. **J Pathol.**, v.226, n. 2, p. 352-364, 2012.

STRATTON, M.R.; CAMPBELL, P.J.; FUTREAL, P.A. The cancer genome. **Nature**. v. 458, p. 719-724, 2009.

SZALAI, G.; KRISHNAMURTHY, R. HAJNÓCZKY, G. et al. Apoptosis driven by IP(3)-linked mitochondrial calcium signals. **EMBO J**. v. 18, n. 22, p. 6349-6361, 1999.

SCHRÖDINGER, L. L. C. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8, Schrödinger, L.C.C., 2015.

TAKAHASHI, A.; OHNISHI, T. Does YH2AX foci formation depend on the presence of DNA double strand breaks? **Cancer Lett**. v. 229, n. 2, p. 171-179, 2005.

TANEJA, N.; DAVIS, M.; CHOY, J. S. et al. Histone H2AX phosphorylation as a predictor of radiosensitivity and target for radiotherapy. **J Biol Chem**. v. 279, n. 3, p. 2273–2280, 2004.

TEMPERTON, N. J.; WILKINSON, S. R.; MEYER, D. J. et al. Molecular and biochemical parasitology overexpression of superoxide dismutase in *Trypanosoma cruzi* results in increased sensitivity to the trypanocidal agents gentian violet and benzonidazole. **Mol Biochem Parasit**. v. 96, n. 1-2, p. 167-176, 1998.

TOLCHER, A. W.; YAP, T. A.; FEARE, I. et al. A phase I study of MK-2206, an oral potent allosteric Akt inhibitor (Akti), in patients (pts) with advanced solid tumor (ST). **J Clin Oncol**. v. 27, n. 15, p. 3503-3503, 2009.

TONNA, S.; EL-OSTA, A.; COOPER, M. E. *et al.* Metabolic memory and diabetic nephropathy: potential role for epigenetic mechanisms. **Nat Rev Nephrol**. v. 6, n. 6, p. 332-341, 2010.

TROTT, O.; OLSON, A. J. Auto Dock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, **J Comput Chem**. v. 2, p. 455-461, 2010.

UEDA, M.; SAJI, H. Radiolabeled probes targeting hypoxia-inducible factor-1-active tumor microenvironments **ScientificWorldJournal**, v. 136, n. 4, p. 659-668, 2016.

URBINA, J. A.; DO CAMPO, R. Specific Chemotherapy of Chagas Disease: controversies and advances. **Trends Parasitol.** v. 49, n. 11, p. 495-501, 2003.

VAN DER SPOEL, D.; LINDAHL, E.; HESS, B. et al. GROMACS User Manual version 4.0.[S.l.], 1-326, 2009.

VAFA, O.; WADE, M.; KERN, S. et al. c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. **Mol Cell**, v. 9, n. 5, p. 1031-1044, 2002.

VERLET, L. Computer "Experiments" on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. **Phys Rev.** v.159, p. 98-103, 1967.

VERRAX, J.; PEDROSA, R. C.; BECK, R. et al. In situ modulation of oxidative stress: a novel and efficient strategy to kill cancer cells. **Curr Med Chem.**, v. 16, p. 1821-1830, 2009.

WALKER, N. I.; HARMON, B. V.; GOBÉ, G. C. et al. Patterns of cell death. **Methods Achiev Exp Pathol.** v. 13, p. 18-54, 1988.

WALTON, W. L. Can cannibalizing cancer cells challenge classic cell death classification? **J Biomed.** v. 40, n. 3, p. 129-132, 2017.

WALLACE, J. Humane Endpoints and Cancer Research. **ILAR j.** v. 2, p. 87-93, (2000).

WANG, J.; WANG, W.; KOLLMAN, P. A. et al. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. **J Mol Graph Model.** v.2, p. 247-260, 2006.

WEINBERG, R. A. How cancer arises: an explosion of research in uncovering the long-hidden molecular underpinnings of cancer and suggesting new therapies. **Scientific American**, p.1-9, 1996.

WEINBERG, R. How cancer arises: an explosion of research in uncovering the long-hidden molecular underpinnings of cancer and suggesting new therapies. **Scientific American**, p.32-40, 1996.

WILSON, W. D.; TANIOUS, F. A.; MATHIS, A. et al. Antiparasitic compounds that target DNA. **Biochimie**. v. 90, n. 7, p. 999-1014, 2008.

WOLF, J. K.; RAMIREZ, P. T. The molecular biology of cervical cancer. **Cancer Investigation**. v, 19, n. 6, p. 621-629, 2001.

WONDRAK, G. Redox-directed cancer therapeutics: molecular mechanisms and opportunities. **Antioxid Redox Signal**. v. 11, n. 12, p. 3013-3069, 2009.

WONG, R. S. Y. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **J Exp Clin Cancer Res**. v. 30, p. 01-14, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO - Cancer. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> . Acesso em 4 ago. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO - model list of Essential Medicine (19th List). World Health Organization. April 2015. Archived (PDF) from the original on 13 December 2016. Retrieved 8 December 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO - **Tratamento do câncer**. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/treatment/en/> Acesso em 19 Abr. 2018.

WU, W.; LIU, P.; LI, J. et al. Necroptosis: an emerging form of programmed cell death. **Crit Rev Oncol Hematol**. v. 82, n. 3, p. 249–258, 2012.

YANG, W. S.; STOCKWELL, B. R. Ferroptosis: death by lipid peroxidation. **Trends Cell Biol.** v. 26, n. 3, p. 165-76, 2016.

ZEFERINO, C. R.; MOTA, N. S. R. S.; GRINEVIVIUS, V. M. A. S. et al. Targeting ROS overgeneration by N-benzyl-2-nitro-1-imidazole-acetamide as potential therapeutic reposition approach for cancer therapy. **Invest New Drugs.** p. 1-15, 2019.