

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA
REGIÃO CENTRO-OESTE

Simone Zacalusni

**Avaliação dos efeitos citotóxicos de compostos contendo o radical
farmacofórico 1,4-dioxo-2-butenil em sistema *in vitro***

CAMPO GRANDE
2023

Simone Zacalusni

**Avaliação dos efeitos citotóxicos de compostos contendo o radical
farmacofórico 1,4-dioxo-2-butenil em sistema *in vitro***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste. Linha de Pesquisa: Tecnologia em Saúde

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira

CAMPO GRANDE
2023



Ata de Defesa de Dissertação
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste
Mestrado

Aos vinte e cinco dias do mês de janeiro do ano de dois mil e vinte e três, às dezenove horas, na videoconferência (à distância), da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Rodrigo Juliano Oliveira (UFMS), Debora Marchetti Chaves Thomaz (UFMS) e Henrique Rodrigues Scherer Coelho (EBSERH), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho da aluna: **SIMONE ZACALUSNI**, CPF 73529290963, Área de concentração em Tecnologia e Saúde, do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Curso de Mestrado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "**AValiação dos Efeitos Citotóxicos de Compostos Contendo o Radical Farmacofórico 1,4-Dioxo-2-Butenil em Sistema In Vitro**" e orientação de Rodrigo Juliano Oliveira. O presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra à aluna que expôs sua Dissertação. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, o presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer exposto conforme segue:

EXAMINADOR	ASSINATURA	AValiaÇÃO
Dr. Rodrigo Juliano Oliveira (Interno)		Aprovado
Dra. Debora Marchetti Chaves Thomaz (Externo)		Aprovado
Dr. Henrique Rodrigues Scherer Coelho (Externo)		Aprovado
Dr. Juliano Rodrigues de Oliveira (Externo) (Suplente)		
Dr. Valter Aragao do Nascimento (Interno) (Suplente)		

RESULTADO FINAL:

Aprovação Aprovação com revisão Reprovação

OBSERVAÇÕES:

Nada mais havendo a ser tratado, o Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Assinaturas:

Presidente da Banca Examinadora

Aluna

Aos meus filhos, razão da minha vida
e de todas as minhas conquistas,
vocês são a melhor parte de mim.

Agradecimento

A Deus, que sempre me conduziu com as devidas lições de amor, fraternidade hoje e sempre, sempre me fortalecendo nos momentos que mais precisei;

Pai e mãe, que me ensinaram que o melhor caminho seria o dos estudos, sempre apoiando e incentivando as minhas decisões;

As minhas irmãs, que sempre acreditaram e torceram por mim;

Ao Sr. Francisco e D. Dielze, pelo socorro e apoio em todos os momentos, pelas orações e desejos de sucesso;

A Dr^a Andréia Conceição Milan Brochado Antonioli Silva, pelo privilégio e oportunidade concedida desde o início desta jornada;

Ao Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira, pela orientação neste trabalho, minha profunda admiração, a forma como ensina faz com que tenhamos vontade de evoluir a cada dia, aprendendo sempre;

Aos amigos, Dr. Peterson Vieira de Assis, Ms Marcelino Chehoud Ibrahim, Dr. Juliano Rodrigues Oliveira e Dr. Henrique Rodrigues Scherer Coelho, que reacenderam em mim a chama do estudo, mostrando que eu seria capaz de retornar;

Aos amigos do trabalho, Luciana Viera Della Santa Souza e Isabel Ferreira de Oliveira, que compreenderam os momentos de ausência e sempre me apoiaram no dia a dia;

A tia Débora Marchetti Chaves Thomaz, que sempre esteve participando dos grandes momentos da minha vida com muita doçura e segurança, meu carinho e eterna gratidão.

A Sílvia Cordeiro das Neves, que sempre esteve disposta a colaborar e ensinar tudo que eu precisava, e com quem compartilhei dúvidas e aflições com muita paciência e compreensão;

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, através de seus professores e funcionários;

E a todas as pessoas que sempre me ajudaram a manter o foco e nunca desistir, e torcem pelo meu sucesso e felicidade.

Eu aprendi que para se crescer como pessoa é preciso me cercar de gente mais inteligente do que eu.

Confúcio

Resumo

O câncer alcançou mais de 19,3 milhões de novos casos no mundo em 2020, levando a óbito quase 10,0 milhões de pessoas. Somando isso aos altos custos de tratamento da doença, enfatiza-se a importância do estudo de novas estruturas moleculares e desenho/construção de substâncias inéditas que poderão ser utilizadas no tratamento dessa doença ou na terapia adjuvante. Estudo de compostos contendo 1,4-dioxo-2-butenil foram avaliados em células humanas e de murinos e demonstraram potencial citotóxico. Neste estudo, avaliou-se os efeitos citotóxicos de dois compostos contendo o radical farmacofórico 1,4-dioxo-2-butenil em sistema *in vitro*. Utilizou-se células tumorais da linhagem HT-29 tratadas com diferentes concentrações de Ácido Aril-Maleâmico (A6) ou *p*-cloro fenil-maleimida (M2). A avaliação da citotoxicidade foi realizado pelo teste colorimétrico de MTT. Os resultados demonstraram A6 é citotóxico a partir das concentrações de 125, 250 e 125 μ g/mL para os tempos de 24, 48 e 72h, respectivamente. Já M2 foi citotóxico a partir da concentração de 1,9 μ g/mL para o três tempos testados. A IC₅₀ de A6 e M2 foram de 378,8 3 22,0 μ g/mL, respectivamente. Esses resultados sugerem que o M2 tem potencial terapêutico para o tratamento do câncer.

Palavras-chave: Câncer de colorretal. Citotoxicidade. Compostos orgânicos.

Abstract

Cancer reached more than 19.3 million new cases worldwide in 2020, leading to the death of almost 10.0 million people. Adding this to the high costs of treating the disease, the importance of studying new molecular structures and the design/construction of new substances that could be used in the treatment of this disease or in adjuvant therapy is emphasized. Study of compounds containing 1,4-dioxo-2-butenyl were evaluated in human and murine cells and demonstrated cytotoxic potential. In this study, the cytotoxic effects of two compounds containing the pharmacophore radical 1,4-dioxo-2-butenyl in an in vitro system were evaluated. The HT-29 human colorectal adenocarcinoma cell line treated with different concentrations of Aryl-Maleamic Acid (A6) or p-chloro phenyl-maleimide (M2) were used. Cytotoxicity assessment was performed by the colorimetric MTT test. The results demonstrated A6 is cytotoxic from concentrations of 125, 250 and 125 $\mu\text{g/mL}$ for the times of 24, 48 and 72h, respectively. On the other hand, M2 was cytotoxic from the concentration of 1.9 $\mu\text{g/mL}$ for the three times tested. The IC_{50} of A6 and M2 were $378.8 \pm 22.0 \mu\text{g/ml}$, respectively. These results suggest that M2 has therapeutic potential for the treatment of cancer.

Keywords: Colorectal cancer. Cytotoxicity. Organic compounds.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Câncer.....	11
1.2 Câncer de colorretal	12
1.2.1 Fatores de risco	13
1.2.2 Patogênese.....	14
1.3 Agentes químicos	15
1.4 Quimioterapia anticâncer	16
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos Específicos.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Linhagem celular, condições de cultivo celular e agentes químicos.....	18
3.2 Ensaio de citotoxicidade (MTT- <i>Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide</i>)	18
3.3 Integridade de Membranas e Contagem Celular	19
3.4 Perfil de Ciclo Celular e população Sub-G1	19
3.5 Morte Celular por Apoptose	20
3.6 Avaliação de EROs por H ₂ DCFDA.....	20
3.3 Análise Estatística.....	21
4 RESULTADOS	22
5 DISCUSSÃO	31
6 REFERÊNCIAS.....	35

1 INTRODUÇÃO

O câncer é a principal causa de óbito e, portanto, um empecilho para o aumento da expectativa de vida em todo o mundo (BRAY et al., 2021). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2019, o câncer foi responsável por ser a primeira ou a segunda causa morte de pessoas antes dos 70 anos em 112 países. Segundo dados do relatório da GLOBOCAN, Agência Internacional para Pesquisa em Câncer, houve, no ano de 2020, mais de 19,3 milhões de novos casos de câncer no mundo, excluindo o carcinoma basocelular. Assim, registrou-se 10,0 milhões de óbitos em todo mundo (SUNG et al., 2021). No Brasil, a estimativa de novos casos de câncer é de 450 mil, excluindo o câncer de pele não melanoma (INCA, 2020).

Entre os cânceres mais incidentes, excetuando os cânceres de pele não melanoma, estão os cânceres de mama feminino (2,3 milhões), pulmão (2,2 milhões), próstata (1,4 milhões), colorretal (1,1 milhões), estômago (1,1 milhões) e fígado (905 mil). Entre os cânceres que mais levaram a óbitos estão o câncer de pulmão (1,8 milhões), colorretal (576 mil), fígado (830 mil), estômago (768 mil) e câncer de mama feminino (684 mil). Nos homens o câncer de pulmão é o mais frequente e o que causa mais morte, seguido por câncer de próstata por sua incidência e do câncer de colorretal por sua grande incidência e alto índice de mortalidade. Nas mulheres, o câncer de mama é o mais frequente e com a maior letalidade por câncer, seguido por colorretal e câncer de pulmão (SUNG et al., 2021).

Já no Brasil, entre os cânceres mais evidentes estão o câncer de mama (66 mil) e próstata (66 mil), colorretal (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil). Em homens a frequência de tipos de câncer estão o câncer de próstata (29,2%), colorretal (9,1%), pulmão (7,9%), estômago (5,9%) e cavidade oral (5,0%). Nas mulheres, os cânceres com maior incidência são o câncer de mama (29,7%), colorretal (9,2%), colo do útero (7,4%), pulmão (5,6%) e tireoide (5,4%) (INCA, 2020).

Considerando os altos números de novos casos de câncer e os altos custos de tratamento dessa doença é importante destacar o estudo de novas

estruturas moleculares e a reatividade de compostos orgânicos, dentro do contexto de avanços em química orgânica, onde podemos construir substâncias raras ou inéditas que poderão ser utilizadas na terapia adjuvante deste problema de saúde pública. Futuramente, esses compostos orgânicos possibilitarão a descoberta de novas drogas que influenciarão, inclusive, no tratamento de diversas outras doenças (OLIVEIRA et al., 2018a).

Um possível ponto de partida para a síntese de moléculas antitumorais mais eficientes e seletivas é o grupo ácido aril-maleâmico e as maleimida. As maleimida potente agente citotóxico, apresenta diversas atividades biológicas como a quimioterapicas (PESSIN; TAVARES; GRADELLA, 2018).

1.1 Câncer

O câncer é o termo que denomina um grupo de doenças que podem começar em quase todos os órgãos ou tecido do corpo. Essa doença caracteriza-se pelo crescimento anormal de células e que podem exceder seus limites e/ou espalhar para outros órgãos (WHO, 2022).

O processo de formação do câncer ocorre de alterações genéticas e epigenéticas que alteram o comportamento da célula e suas interações com o ambiente externo. Essas alterações podem favorecer a proliferação que é regulada habilmente por centenas de genes. No entanto, quando essas células acumulam mutações e provocam um desequilíbrio nesses genes, ocorre o início da carcinogênese (COOPER, 2020). As células tumorais evidenciam uma série de características que as divergem das células não-tumorais como: autonomia nos sinais de crescimento; resistência a sinais inibitórios de crescimento; resistência a morte celular; possibilitando a imortalidade replicativa e a indução da angiogênese. Esse crescimento é caracterizado em células tumorais benignas como malignas. No entanto, apenas as células tumorais tem capacidade de invadir outros órgãos e tecidos, desenvolvendo a metástase (YOKOTA, 2000).

A incidência do câncer vem aumentando regularmente no mundo todo, principalmente em países em desenvolvimento, isso se deve ao envelhecimento e ao crescimento populacional. Os tipos de câncer e as taxas de mortalidade se alteram de acordo com a região em razão das características populacionais, das

diferenças socioeconômicas e do Índice de desenvolvimento humano (IDH) do país (SUNG *et al.*, 2021).

O tratamento do câncer pode ser feito por uma ou mais técnicas combinadas, e dependem do tipo de doença, do seu estágio de desenvolvimento e de condições clínicas do paciente. Dentre os tratamentos destacam-se as cirurgias, a radioterapia, a imunoterapia, a hormonioterapia e a quimioterapia (NIH, 2021).

A cirurgia é indicada para vários tipos de câncer, principalmente quando diagnosticados em estágio inicial. Também tem como objetivo o diagnóstico, alívio de sintomas de dor, entre outros (NIH, 2021).

No tratamento com radioterapia utiliza radiações ionizantes para destruir ou inibir o crescimento das células tumorais, esse tipo de terapia pode ser usada como tratamento principal, adjuvante, neoadjuvante ou paliativo (NIH, 2021).

O tratamento com imunoterapia tem como objetivo potencializar o sistema imunológico. Essa terapia utiliza do anticorpos produzidos pelo próprio paciente estimulando as células de defesa a combater as células do tumor (NIH, 2021).

A hormonioterapia é um tratamento sistêmico que atinge tumores dependentes do estímulo hormonal, e diminui ou bloqueia a ação de hormônios nas células tumorais (NIH, 2021).

Dentre as opções de tratamento dessa doença, a quimioterapia ganha destaque pois os fármacos são eficientes em eliminar células proliferativas, isto porque agem induzindo danos ao DNA que determinam paradas no ciclo celular e morte celular programada (GOLDSTEIN; KASTAN, 2015). Porém, possuem muitos efeitos colaterais principalmente porque não atingem apenas células tumorais, mas também células normais/saudáveis (VICHAYA *et al.*, 2015). Assim, há a necessidade de descoberta de novos fármacos e, em especial, busca-se por medicamentos cada vez mais específicos (NAVARRO *et al.*, 2014).

1.2 Câncer de colorretal

O câncer colorretal é a quarta maior causa de câncer mais comum diagnóstica e a segunda principal causa de óbito por essa neoplasia maligna, com quase 576.000 mortes anualmente (SUNG *et al.*, 2021). Em mulheres, o câncer de colorretal é o segundo mais diagnosticado e o terceiro mais comum em homens (DEKKER *et al.*, 2019). As maiores taxas de incidência de câncer de colorretal são observadas em países desenvolvidos e a previsão para 2035 é que essa incidência aumente para 2,5 milhões de novos casos (SIEGEL *et al.*, 2017).

1.2.1 Fatores de risco

Entre os fatores de risco estão a idade, fatores genéticos e ambientais que desempenham um papel importante no desenvolvimento do câncer colorretal (THANIKACHALAM; KHAN, 2019). Entre os fatores genéticos, um histórico familiar positivo é responsável por aproximadamente 10 a 20% dos pacientes com câncer de colorretal (HENRIKSON *et al.*, 2015), essa incidência depende do número e grau de familiares afetados (SCHOEN *et al.*, 2015).

O câncer colorretal hereditário podem ser subdivididos em duas síndromes os não polipose (síndrome de Lynch e câncer colorretal familiar) e síndrome polipose (DEKKER *et al.*, 2019). As síndromes de polipose são reconhecidas com mais facilidade pelo médico por conta da visualização de pólipos e os tipos de pólipos podem levar a um diagnóstico apropriado. No entanto, a síndrome de Lynch provoca poucos adenomas e esse adenomas são morfologicamente semelhantes a lesões esporádicas, o que dificulta o diagnóstico do médico. Nesse sentido, uma análise molecular no tecido tumoral em pacientes com menos de 70 anos é indicada para o diagnóstico dessa síndrome genética (DEKKER *et al.*, 2019). Nos pacientes diagnosticados com síndrome de Lynch a colonoscopia é indicada com uma frequência de 1 a 2 vezes por ano, entre os 20 e 25 anos (SYNGAL *et al.*, 2015; VASEN *et al.*, 2013).

O estilo de vida pode ser um dos vários fatores no aumento do risco de câncer de colorretal, como o tabagismo (BOTTERI *et al.*, 2008), a consumo exagerado de bebida alcoólica (CAI *et al.*, 2014); a obesidade (KYRGIU et al., 2017) e maus hábitos alimentares como a ingestão em excesso de carne vermelha e de alimentos processados (CHAN *et al.*, 2011).

1.2.2 Patogênese

Na maioria dos casos, um câncer de colorretal surge de um pólip. Esse processo começa com a formação de uma cripta aberrante, que avança para uma lesão precursora neoplásica (um pólip) e que pode evoluir para um câncer de colorretal em um período estimado de 10 a 15 anos (DEKKER *et al.*, 2019). Estudos indicam que a célula de origem dessa neoplasia seja uma célula-tronco ou uma célula que se assemelha a uma célula-tronco. Essa célula cancerígena se origina de um processo de alterações genética e epigenéticas que inativam supressores tumorais e ativam genes oncogênicos. Essas células se aloca na base das criptas e são vitais para o início e manutenção do tumor (MEDEMA, 2013; NASSAR; BLANPAIN, 2016)

Pesquisar os mecanismos que regulam o crescimento dessa neoplasia é uma área promissora para descobrir novos agentes terapêuticos e novos tratamentos preventivos (DE SOUZA *et al.*, 2017; SHIMOKAWA *et al.*, 2017). Existem duas principais formas de lesão precursora para o câncer de colorretal: a via adenoma-carcinoma que leva a 70-90% dos canceres colorretais e a via da neoplasia serrilhada que é responsável por aproximadamente 10-20% dos canceres colorretais. Essas vias sofrem eventos genéticos e epigenéticos distintos (Cancer Genome Atlas Network, 2012). A via adenoma-carcinoma se desenvolve depois de eventos genômicos e que se foram iniciados por mutação do gene APC, seguida de ativação do RAS ou da perda da função TP53. Já a neoplasia serrilhada sofre mutações nos genes RAS e RAF e uma instabilidade epigenética (DEKKER *et al.*, 2019).

Os sintomas clínicos podem apresentar sinais e sintomas, como sangramento, alterações nos hábitos intestinais, dor abdominal e anemia. Embora, o câncer colorretal seja uma doença assintomática e seus sinais são observados na maioria das vezes em estágio avançado. Portanto, qualquer fator adicional deve ser investigado de forma aprofundada por colonoscopia (DEKKER *et al.*, 2019).

A colonoscopia e o teste imunológico fecal são exames usados para prevenir o câncer de colorretal e são considerados exames de primeira linha por conta da praticidade, custo e acima de tudo pelo desempenho (REX *et al.*, 2017).

O exame de colonoscopia é usado para identificação de pólipos e do câncer colorretal e tem alta sensibilidade e boa especificação. Algumas desvantagens são a necessidade de limpeza do intestino, risco de perfuração, sangramento pós procedimento, pneumonite por aspiração e risco de lesão esplênica (COOPER; KOU; REX, 2013; CHEN; REX, 2007). A colonoscopia é recomendada a partir de 50 anos de idade e deve ser repetida a cada 10 anos (REX et al., 2017), em alguns países o início da triagem começa aos 45 anos (ANDREW et al., 2019; US et al., 2016; PETERSE et al., 2018). Já em pessoas com histórico familiar de câncer de colorretal, o início do rastreamento deve ocorrer aos 40 anos e seu acompanhamento ser de 5 a 5 anos (REX et al., 2017).

1.3 Agentes químicos

Uma série de derivados das maleimidias foram testados *in vitro* em duas linhagens celulares ((L1210 – leucemia linfoblástica aguda e B16F10 – linhagem de melanoma murino) e *in vivo* em um modelo de melanoma subcutâneo em camundongos *Swiss*. As maleimidias apresentaram diferentes atividades biológicas, dentre as quais foi verificada atividade citotóxica em cultura de células B16F10 e L1210, e atividade antitumoral em modelo de melanoma subcutâneo em camundongos (NOLDIN, 2011).

Na busca por novos medicamentos anticâncer, a literatura destaca também o fragmento 1,4-dioxo-2-butenil por apresentar atividade citotóxica e capacidade de redução da proliferação celular (JHA et al., 2010). Outro estudo avaliou a atividade antitumoral de um novo complexo de cobre (RC1) contendo o grupo 1,4-dioxo-2-butenil, em células de adenocarcinoma mamário murino 4T1, e sua segurança toxicogenética em camundongos *Swiss*. O estudo demonstrou que o composto possui potencial terapêutico, pois apresentou toxicidade às células de adenocarcinoma mamário murino 4T1 e baixa frequência de danos cromossômicos em sistema teste *in vivo* (OLIVEIRA et al., 2018a).

Em outro estudo foi testado o ácido IR-04 sintetizado a partir de maleimidias e 1,4-dioxo-2-butenil e comprovaram que esse derivado não é genotóxico e nem mutagênico, o que torna seu uso seguro na prospecção de

novos medicamentos contra o câncer. Além disso, o composto apresentou ser mais seletivo, pois causou apoptose sem utilizar a via de danos no DNA (OLIVEIRA et al., 2018b).

1.4 Quimioterapia anticâncer

Uma forma de tratamento sistêmico do câncer é a quimioterapia que se utiliza de medicamentos antineoplásicos que são administrados continuamente ou em períodos contínuos, que funcionam de acordo com o esquema terapêuticos (LACERDA, 2001). A quimioterapia tem a capacidade de causar apoptose ou de diminuir o andamento da divisão celular (LUNDQVIST et al., 2015). Dentre as terapias, a quimioterapia é a que mais pode ser explorada, por ter a capacidade de indução de morte de inúmeros compostos.

Já existe mais de 100 medicações para o tratamento do câncer com quimioterapia, seja ela de forma isolada ou em combinação com outros fármacos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). Esse quimioterápicos antineoplásicos podem ser classificados de acordo com o funcionamento farmacológico. Sendo eles: (I) agentes alquilantes, que impedem a replicação do DNA; (II) antimetabólicos, que interferem na síntese de DNA; (III) inibidores mitóticos, que levam a paralisação da divisão celular; (IV) inibidores de quinase, que impedem a proliferação e (V) agentes alvos-divididos, que atuam em receptores ou proteínas citoplasmáticas que associados ao crescimento e sobrevivência celular (ESPINOSA et al., 2003; GOLAN, 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos citotóxicos de compostos contendo o radical 1,4-dioxo-2-butenil em sistema *in vitro*.

2.2 Objetivos Específicos

Triar compostos por viabilidade celular pelo ensaio de citotoxicidade – MTT.

Avaliar danos em membrana por citometria de fluxo induzidos pelo composto selecionado.

Avaliar as fases do ciclo celular (G1, S e G2/M) utilizando citometria de fluxo.

Avaliar morte celular por apoptose utilizando citometria de fluxo.

Avaliar os níveis de estresse oxidativo utilizando citometria de fluxo através do marcador H₂DCFDA.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagem celular, condições de cultivo celular e agentes químicos

As células da linhagem de adenocarcinoma colorretal HT-29 foram cultivadas em frasco de cultura de 25cm², em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco®) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco®) e 0,1% de antibiótico (Solução Antibiótica/Antimicótica (100x) Estabilizado; Sigma®), em estufa de CO₂ (5%), ambiente umidificado e a 37°C.

Como controle positivo utilizou-se a Dacarbazina (Europharma®) na concentração de 1400µg/mL (Baharara et al., 2016) solubilizada em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). As substâncias Ácido Aril-Maleâmico (A6) e p-cloro fenil-maleimida (M2) foram testadas em concentrações que variaram de 1,19 a 1.000 µg/mL, solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO 1%) (Synth®) e, posteriormente, em meio de cultura. Como controle negativo utilizou-se DMSO 1%.

3.2 Ensaio de citotoxicidade (MTT- *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*)

A avaliação da citotoxicidade das substâncias Ácido Aril-Maleâmico (A6) e p-cloro fenil-maleimida (M2) foi determinada pelo teste colorimétrico MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide), baseado no protocolo de Poindessous et al.¹² com modificações de Mauro et al.¹³. Foram semeadas 5 x 10³ células HT-29 por poço em placas de 96 poços. As culturas foram mantidas por 24h, em incubadora com 5% de CO₂ e à temperatura de 37°C, para estabilização. Os tratamentos foram realizados por 24, 48 e 72 horas com as concentrações de 1,9; 3,9; 7,8; 15,6; 31,2; 62,5; 125; 250; 500 e 1.000 µg de A6 e M2. O controle negativo e o controle positivo foram cultivados da mesma forma e em substituição as substâncias testadas foram utilizados DMSO 1% e Dacarbazina (1.400µg/mL), respectivamente. Ao final dos tratamentos, o meio de cultura foi descartado e as placas foram incubadas com 100µL de MTT, na concentração de 0,3 mg/mL, por 4h. Após essa incubação a solução de MTT

foi descartada e adicionou-se 100µL DMSO. Procedeu-se a homogeneização das placas e fez-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro em filtro de 540nm. Para cada experimento foram realizadas três repetições independentes em quintuplicatas. A viabilidade celular (expressa em porcentagem) foi calculada pela fórmula: viabilidade celular = [(Absorvância média do grupo de tratamento)/(Absorvância média do grupo sem tratamento) x 100].

3.3 Integridade de Membranas e Contagem Celular

A verificação de integridade de membranas e contagem numérica de células foram realizadas em citômetro de fluxo BD Accuri™ C6. As células HT-29(2.10⁵/poço) foram semeadas em placas de 6 poços e, após a estabilização, foram adicionados os tratamentos nas concentrações 16,5; 21,87 e 31,25 µg/mL da substância p-cloro fenil-maleimida (M2) e como controle positivo foi utilizado 50 µL de Cisplatina. Após 24 h de tratamento, as células foram colhidas, centrifugadas a 300 G durante 5 minutos e ressuspendidas em 500 µL de PBS. Para avaliação da integridade de membrana, 25 µL de Iodeto de Propídio (2 µg/mL) foi adicionado em 100 µL da suspensão, após 5 minutos foi realizada a leitura da população celular (população celular determinada por SSC e FSC devidamente separadas de restos celulares ou células duplicadas). Ao mesmo tempo, foi determinado sua concentração em células/µL e, posteriormente, células por poço.

3.4 Perfil de Ciclo Celular e população Sub-G1

O perfil do ciclo celular foi realizado em citômetro de fluxo BD Accuri™ C6. As células HT29(2.10⁵/poço) foram semeadas em placas de 6 poços e, após a estabilização, foram adicionados os tratamentos nas concentrações 16,5; 21,87 e 31,25 µg/mL da substância p-cloro fenil-maleimida (M2) e como controle positivo foi utilizado 1400 µg/mL de Dacarbazina. Após 24 h de tratamento, as células foram centrifugadas a 300 G durante 5 minutos e ressuspendidas em 500 µL de PBS. Foram adicionados 5 µL de RNase (2 µg/mL, Invitrogen - CAT: 12091-021) em 100 µL de suspensão celular e mantido à 37° C durante 30 minutos. Para a lise celular e marcação do DNA foram adicionados 5 µL de Iodeto de

Propídio (2 µg/mL) e 100 µL de solução de lise (2 mg citrato de sódio, 2 µL de Triton X-100 e 20 mL de PBS). Foram avaliados 10.000 eventos por tratamento para determinar as porcentagens de células nas diferentes fases do ciclo (G1, S e G2/M). A presença de população Sub-G1(indicativo de corpúsculos apoptóticos) na população celular determinada também foi avaliada. Esse experimento foi realizado em triplicata.

3.5 Morte Celular por Apoptose

A morte celular por apoptose foi avaliada em citômetro de fluxo BD Accuri™ C6. As células HT29 ($2 \cdot 10^5$ /poço) foram semeadas em placas de 6 poços e, após a estabilização, foram adicionados os tratamentos nas concentrações 16,5; 21,87 e 31,25 µg/mL da substância p-cloro fenil-maleimida (M2) e como controle positivo foi utilizado 50 µL de Cisplatina.. Após 24 h de tratamento, as células foram centrifugadas a 300 G durante 5 minutos e ressuspendidas em 100 µL de PBS. Foi utilizado o kit BD Pharmingen TM – PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (CAT- 559763) segundo o protocolo do fabricante, onde foram avaliados 10000 eventos por tratamento. Foram estimadas as porcentagens de células viáveis em apoptose inicial e apoptose tardia/necrose. As células com ausência de marcação por anexina e 7-AAD foram consideradas viáveis. Marcadas somente com a anexina foram consideradas em apoptose inicial e células com dupla marcação ou apenas marcadas com 7-AAD foram consideradas em apoptose tardia/necrose. Esse experimento foi realizado em triplicata.

3.6 Avaliação de EROs por H₂DCFDA

A avaliação de estresse oxidativo por geração de espécies reativas de oxigênio - EROs foi realizada em citômetro de fluxo BD Accuri™ C6. As células HT29 ($2 \cdot 10^5$ /poço) foram semeadas em placas de 6 poços e, após a estabilização, foram adicionados os tratamentos nas concentrações 16,5; 21,87 e 31,25 µg/mL da substância p-cloro fenil-maleimida (M2) por 24h e como controle positivo foi utilizado 200 nM de Peróxido de Hidrogênio por um período de 1 h. Após os tratamentos, 25 µM de H₂DCFDA foi adicionado durante 20 minutos. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 300 G, durante 5

minutos, e ressuspendidas em 100 μ L de PBS. Foram avaliados 10000 eventos/células por tratamento. Esse experimento foi realizado em triplicata.

3.3 Análise Estatística

Os valores mensurados para a viabilidade e proliferação celular e ciclo celular foram comparadas por ANOVA/Tukey ($p < 0,05$). Os valores mensurados para a ciclo celular, integridade de membranas, contagem numérica celular e estresse oxidativo foram comparadas por ANOVA seguida de Dunnett ($p < 0,05$). Os resultados foram expressos como Média \pm EPM. A concentração citotóxica necessária para reduzir a viabilidade celular em 50% (IC_{50}) foi calculada no software GraphPad Prism.

4 RESULTADOS

O Ácido Aril-Maleâmico (A6) apresentou citotoxicidade ($p < 0,05$) em células HT-29 nas concentrações de 125 a 1.000 $\mu\text{g/mL}$ para os tempos de 24 e 72h de exposição. No tempo de 48h a citotoxicidade ($p < 0,05$) foi observada a partir da concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 1).

Na comparação entre os tempos, as concentrações de 500 e 1.000 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram uma crescente indução de citotoxicidade ($p < 0,05$) nos tempos de 48 e 72h quando comparado ao tempo de 24h. Para a concentração de 3,9 $\mu\text{g/mL}$ foi observado aumento da citotoxicidade entre os tempos de 24 e 48h (A6) (Figura 1).

Para as concentrações 3,9, 31,25 e 15,6 $\mu\text{g/mL}$ é possível verificar que Ácido Aril-Maleâmico (A6) induziu proliferação celular ($p < 0,05$) no tempo de 72h, quando comparado ao tempo de 48h. Apesar dessa diferença significativa entre os tempos de tratamento, as concentrações são iguais ao controle (Figura 1).

Além disso, para as concentrações de 125 a 1.000 $\mu\text{g/mL}$ observou-se que existe uma diminuição na viabilidade celular nos tempos 48 e 72h na comparação com 24h (Figura 1).

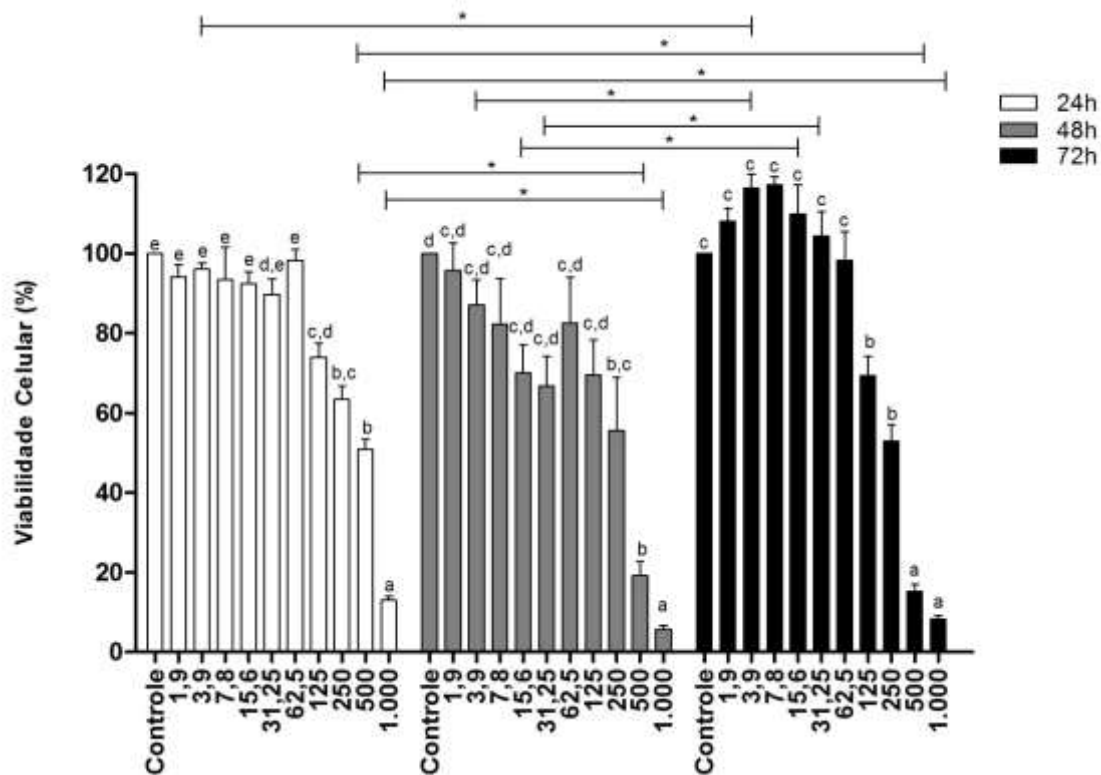


Figura 1. Viabilidade celular de células HT-29 tratadas com Ácido Aril-Maleâmico (A6). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações de cada um dos produtos (Teste Estatístico: ANOVA/Tukey; $p < 0,05$). *Indicam diferença estatisticamente significativa para uma mesma concentração nos tempos de 24, 48 e 72h (Teste Estatístico: ANOVA/Tukey; $p < 0,05$).

A IC_{50} para Ácido Aril-Maleâmico (A6), em 24h, foi de 378,8 µg/mL (Figura 2).

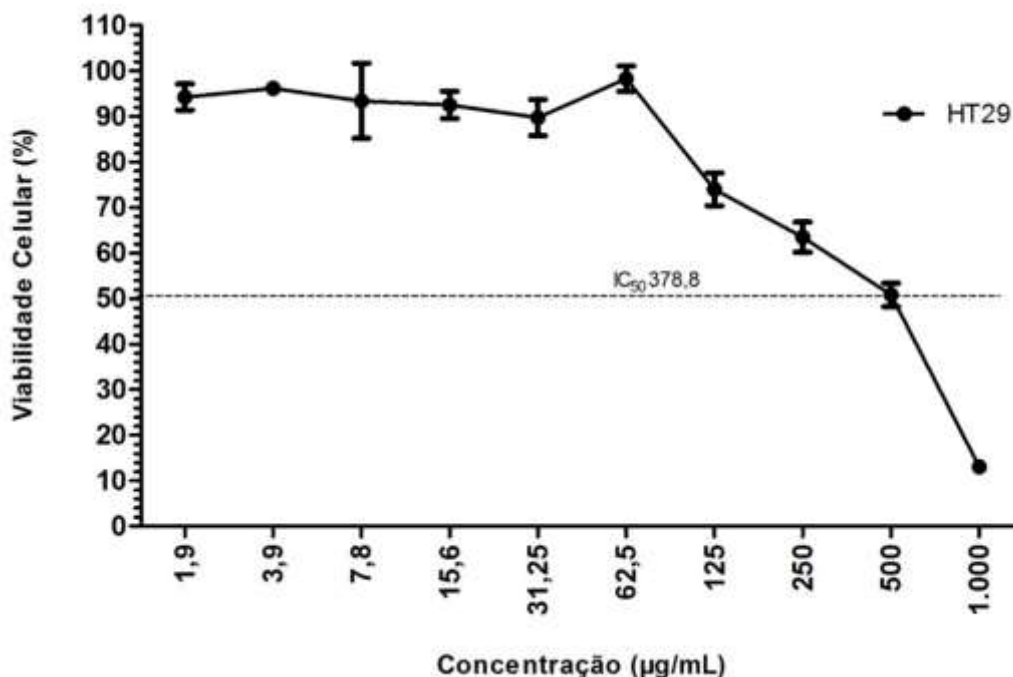


Figura 2. IC₅₀ de Ácido Aril-Maleâmico (A6) em células HT-29 expostas por 24h;

O p-cloro fenil-maleimida (M2) apresentou citotoxicidade ($p < 0,05$) em células HT-29 em todas as concentrações testadas (1,9 a 1.000 µg/mL) para os tempos de 24, 48 e 72h de exposição (Figura 3).

Na comparação entre os tempos, as concentrações de 62,5 a 1.000 µg/mL apresentaram uma crescente indução de citotoxicidade ($p < 0,05$) nos tempos de 48 e 72h quando comparado ao tempo de 24h. Já nas concentrações 3,9, 7,8 e 31,25 µg/mL tratadas com p-cloro fenil-maleimida (M2) houve uma diminuição da viabilidade celular ($p < 0,05$) apenas no tempo de 72h e nas concentrações 3,9 e 7,8 µg/mL em comparação com o tempo de 24h (Figura 3).

Para as concentrações 7,8 a 31,25 µg/mL é possível verificar que p-cloro fenil-maleimida (M2) induziu um aumento na proliferação celular ($p < 0,05$) no tempo de 72h, quando comparado ao tempo de 48h (Figura 3).

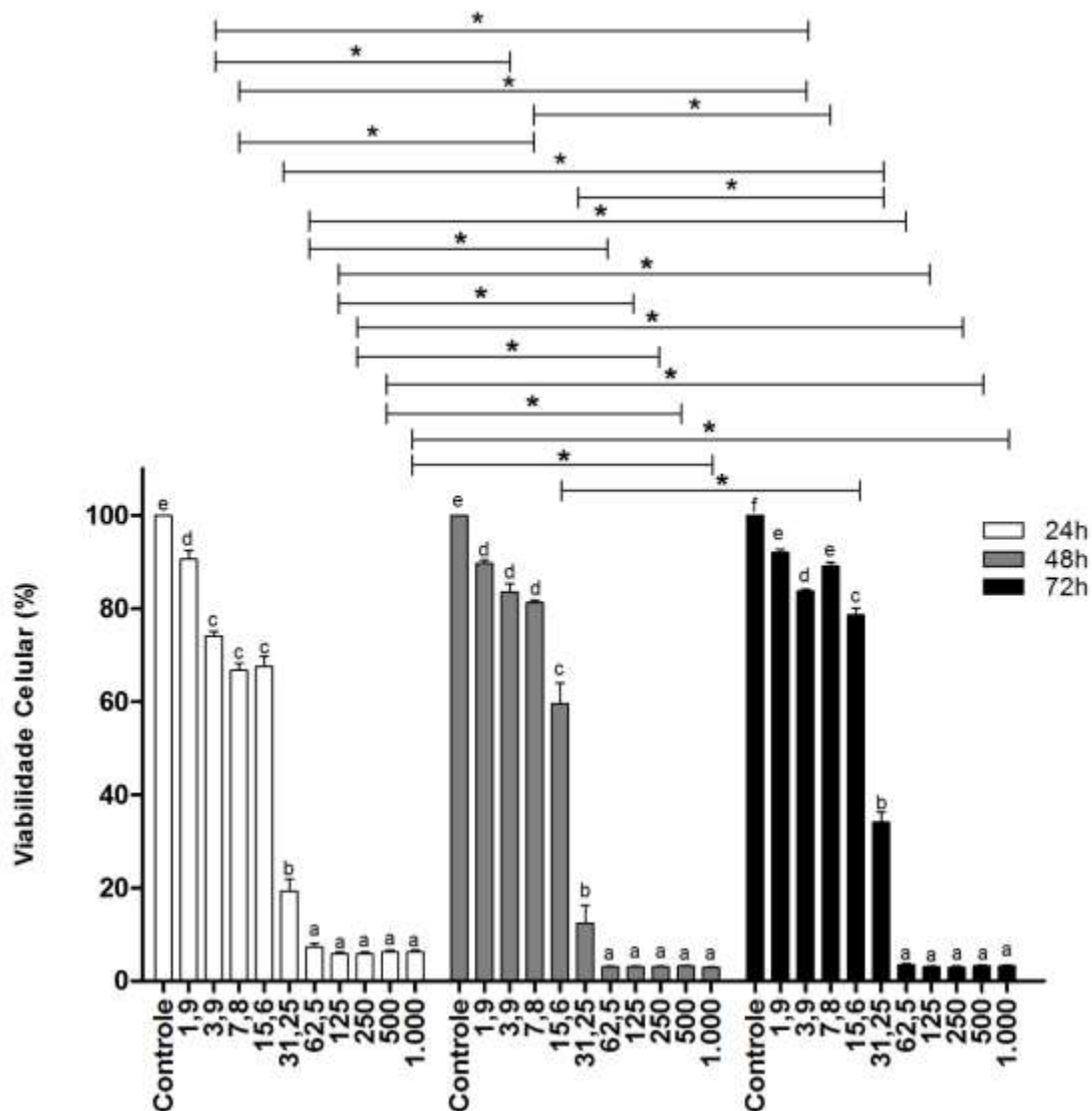


Figura 3. Viabilidade celular de células HT-29 tratadas com p-cloro fenil-maleimida (M2). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações de cada um dos produtos (Teste Estatístico: ANOVA/Tukey; $p < 0,05$). *Indicam diferença estatisticamente significativa para uma mesma concentração nos tempos de 24, 48 e 72h (Teste Estatístico: ANOVA/Tukey; $p < 0,05$).

A IC_{50} para p-cloro fenil-maleimida (M2), em 24h, foi de 22 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 4).

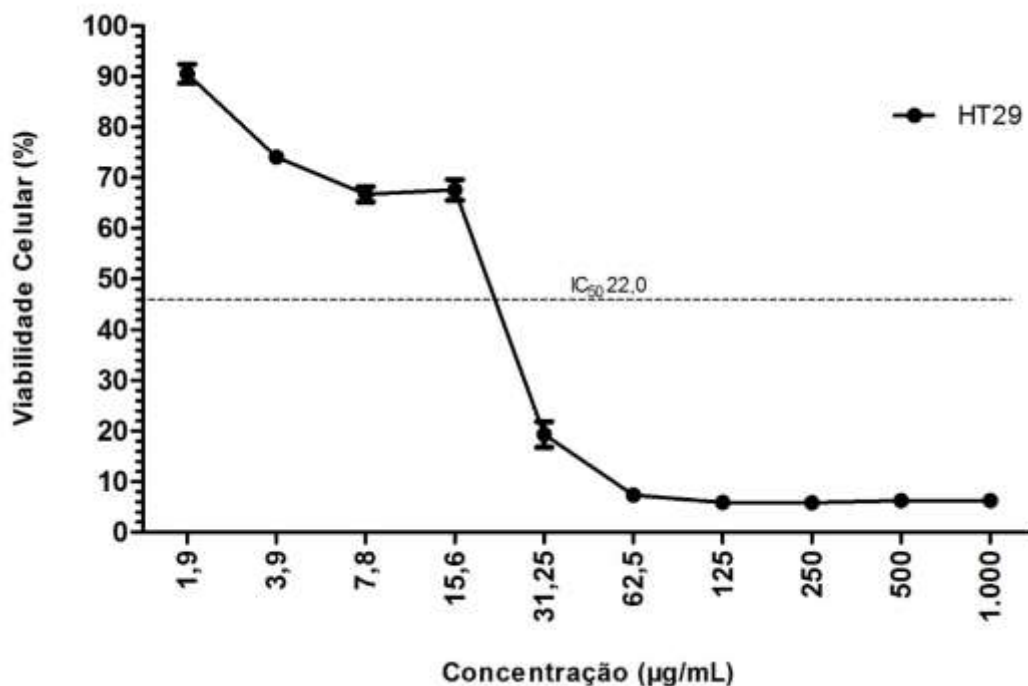


Figura 4. IC₅₀ de p-cloro fenil-maleimida (M2) em células HT-29 expostas por 24h;

Na avaliação da integridade de membranas foi observado redução significativa da integridade de membranas para todas as concentrações testadas de p-cloro fenil-maleimida (M2) ($P < 0,01$) e para o controle positivo (cisplatina) ($P < 0,05$) em relação ao controle negativo (Figura 5A). Para a contagem celular foi observado uma diferença estatística no controle positivo Cisplatina ($P < 0,01$) em relação ao controle negativo (Figura 5B).

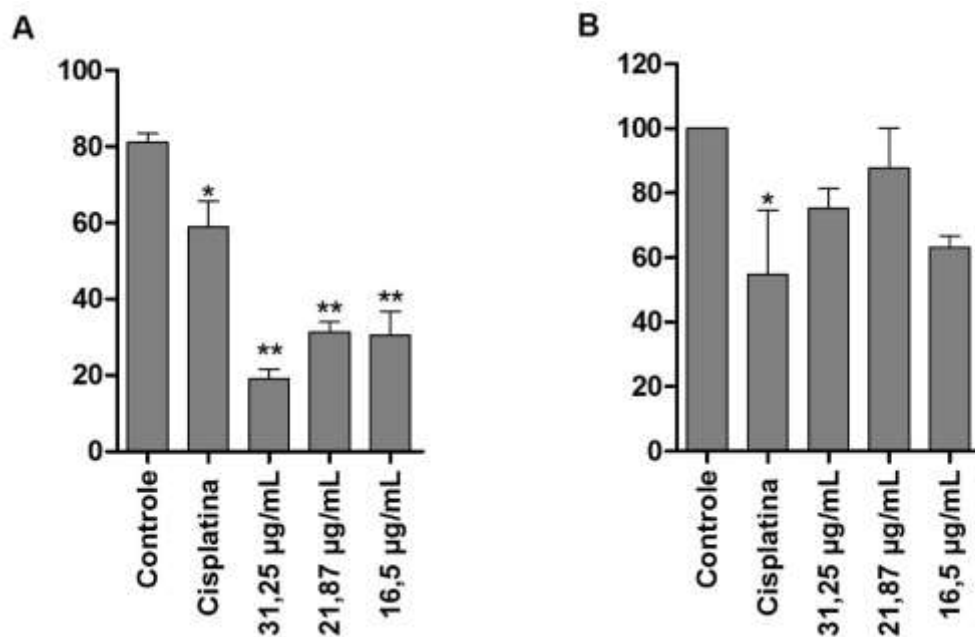


Figura 5. A) Integridade de Membranas: porcentagem de células HT-29 com membranas danificadas após 24h de tratamento com p-cloro fenil-maleimida (M2); B) Contagem celular: número de células contadas após 24h de tratamento com p-cloro fenil-maleimida (M2). Cisplatina 50 µL/mL. (Teste Estatístico: ANOVA/Dunnett; (*= P<0.05 **= P<0.01).

No perfil de ciclo celular foi observado ausência de população em G1 e G2/M em todas as concentrações testadas de p-cloro fenil-maleimida (M2) (P<0,01). Na fase S do ciclo celular foi possível observar uma pequena população (5,57%) somente para a concentração 21,87 µg/mL (P<0,01) (Figura 6).

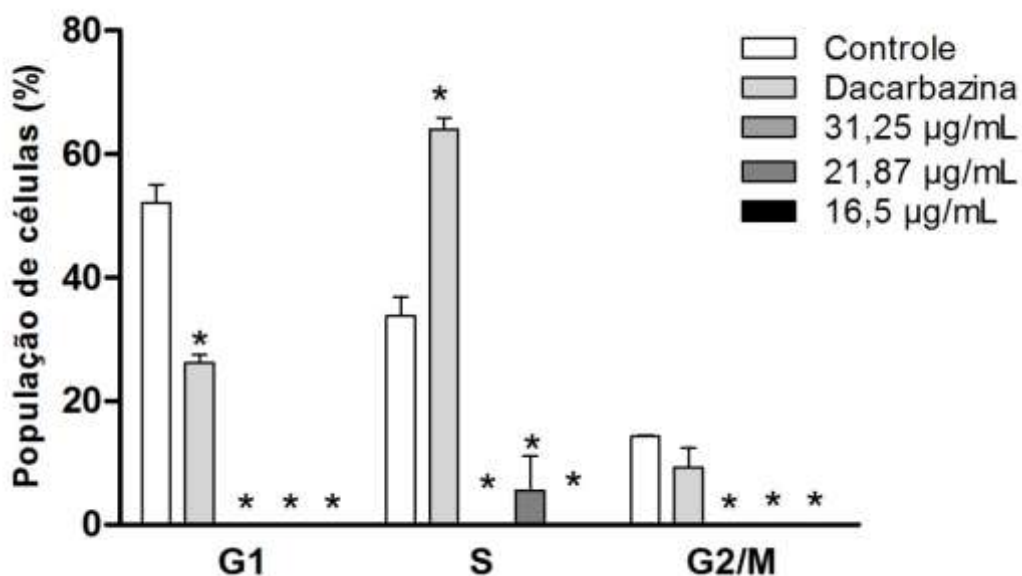


Figura 6. Perfil de Ciclo celular após 24h de tratamento com p-cloro fenil-maleimida (M2); Dacarbazina 1400 µg/mL. (Teste Estatístico: ANOVA/Dunnett; * = $P < 0.01$).

Na avaliação da população sub-G1 foi observado um aumento significativo em todos os grupos testados com p-cloro fenil-maleimida (M2) ($P < 0,01$) em relação ao grupo controle. Também observou-se aumento da população de sub-G1 para a Cisplatina (Figura 7).

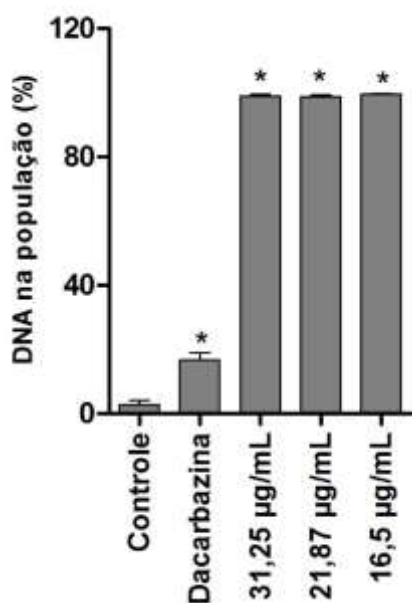


Figura 7. Perfil de população sub-G1 após 24h de tratamento com p-cloro fenil-maleimida (M2); Dacarbazina 1400 µg/mL. (Teste Estatístico: ANOVA/Dunnett; * = $P < 0.01$).

Na viabilidade celular houve uma diminuição significativa dos grupos tratados com p-cloro fenil-maleimida (M2) em relação ao grupo controle ($P < 0,05$). Além disso, foi possível observar uma indução de apoptose inicial em todos as concentrações testadas com o M2 em relação ao grupo controle ($P < 0,05$). O controle positivo (Cisplatina) também reduziu a viabilidade celular significativamente (Figura 8).

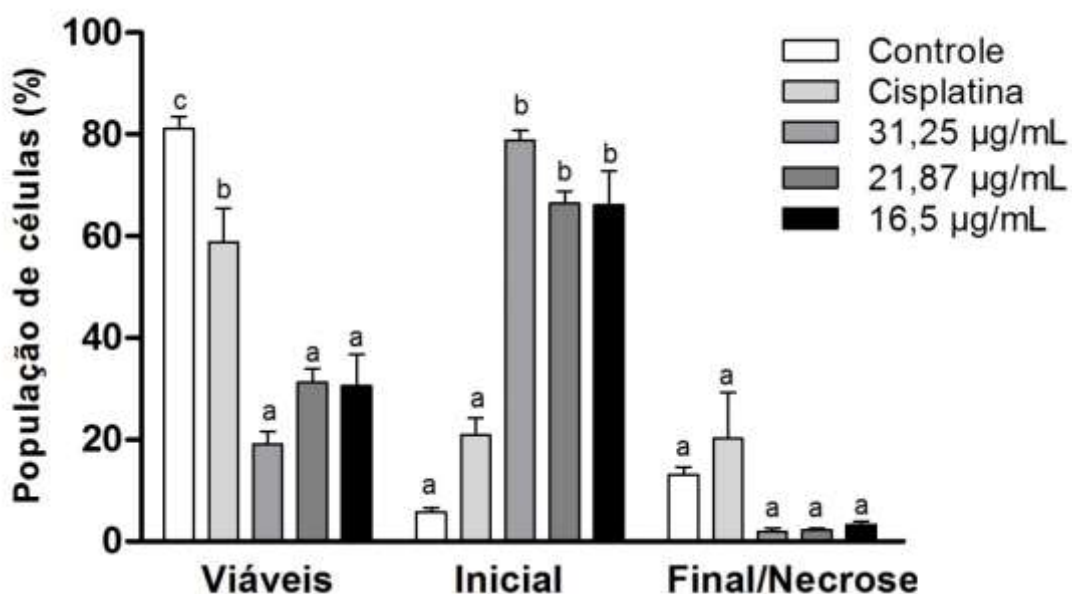


Figura 8. Perfil de morte celular por Apoptose após 24h de tratamento com p-cloro fenil-maleimida (M2); Cisplatina 50 µL/mL. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações testadas de p-cloro fenil-maleimida (M2). (Teste Estatístico: ANOVA/Tukey; $p < 0,05$).

Na avaliação de EROs observou-se aumento da indução por Cisplatina. No entanto, esse aumento não foi significativo ($p > 0,05$). Já o p-cloro fenil-maleimida (M2) reduziu ($p < 0,05$) o estresse oxidativo para todas as concentrações testadas (Figura 9).

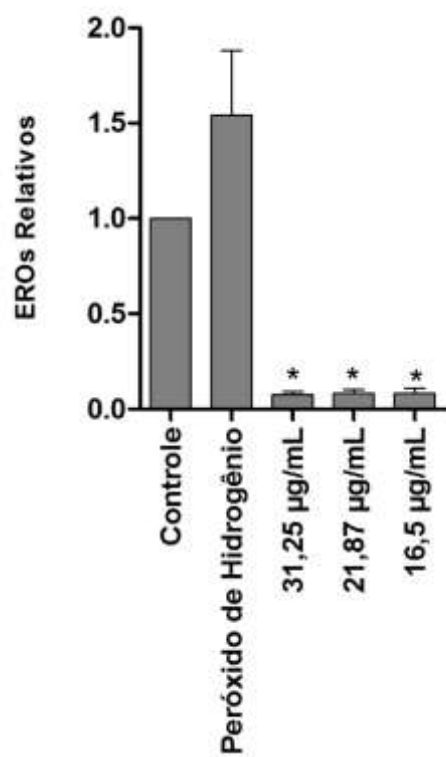


Figura 9. Valores relativos de EROs obtidos por degradação da sonda H₂DCFDA após 24h de tratamento com p-cloro fenil-maleimida (M2); Peróxido de hidrogênio 200 nM. (Teste Estatístico: ANOVA/Dunnett; * = P<0.01)

5 DISCUSSÃO

O câncer é uma importante questão de saúde pública e continua sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade (SIEGEL et al., 2017). Assim, é de primaz necessidade que o diagnóstico e o tratamento dessa doença evoluam rapidamente de forma a garantir melhorias na qualidade de vida da população (MIN et al., 2020).

Os tratamentos do câncer podem se basear em cirurgias (NIH, 2021) e/ou terapias medicamentosas (LACERDA, 2001). Dentre os medicamentos os quimioterápicos se destacam (LUNDQVIST et al., 2015). Apesar de existir um grande número de quimioterápicos disponíveis no comércio muitos cânceres não são tratados efetivamente por eles e um dos principais problemas é o desenvolvimento de resistência (MAKOVEC, 2019). Outro problema muito comum é a baixa seletividade dos quimioterápicos (LUKIANOVA-HLEB, et al., 2012), ou seja, eles atingem tanto células tumorais quanto as células saudáveis (não tumorais) (CHIDAMBARAM; MANAVALAN; KATHIRESAN, 2011) e isso causa efeitos adversos que precisam ser considerados na hora de optar pela escolha do medicamento (MANZARI et al., 2021).

Diante do exposto, há uma constante busca por novo medicamentos e vários compostos são desenhados e/ou sintetizados com base no radical farmacofórico 1,4-dioxo-2-butenil. Esse radical é considerado como um agente citotóxico e tem a habilidade de reduzir a proliferação celular, características necessárias em agentes quimioterápicos, que podem ser associados a agentes reguladores de ciclo celular e causar eliminação de células por danos ao DNA (OLIVEIRA et al., 2018a). Esse radical foi primeiramente descrito como citotóxico por Jha et al. (2010).

Jha et al. (2010) utilizaram o 1,4-dioxo-2-butenil em associação com o grupo maleimida para testes em células humanas (Molt4/C8 de leucemia e CEM linfócitos T de linfoma) e em células de murino (L1210 de leucemia linfocítica em ratos) e observaram o efeito citotóxico. Foi baseado nesse estudo que nós sintetizamos e testamos o A6 e M2. O A6 trata-se de um ácido que não contém a maleimida. Mas, o 1,4-dioxo-2-butenil está associado ao cloro. Já o M2 contém

tanto a maleimida quando o cloro, associados ao 1,4-dioxo-2-butenil em sua constituição.

Os nossos resultados demonstraram que ambos os compostos possuem efeito citotóxico. No entanto, o M2 apresentou resultados superiores ao A6. Na presente proposta nós não podemos fazer uma relação estrutura atividade visto que as moléculas são distintas e os ligantes estão em posições diferentes. No entanto, é possível afirmar que junção da maleimida foi essencial para potencializar o efeito do 1,4-dioxo-2-butenil associado ao cloro.

Os nossos resultados demonstraram que a IC₅₀ do A6 é 378,8 µg/mL. Esse valor é alto e não nos impele a dar continuidade nos estudos. Já a IC₅₀ do M2 é de 22µg/mL. Esse resultado é interessante e indica que esse composto tem importante efeito na indução de morte celular em células do adenocarcinoma colorretal. Assim, infere-se que ele é candidato para o desenvolvimento de quimioterápico específico para o tratamento desse câncer e/ou de outros cânceres intestinais.

A literatura consultada não possui nenhum estudo com essas moléculas ou com moléculas similares que nos permitam fazer comparações diretas. No entanto, a literatura possui outras moléculas que contém o radical 1,4-dioxo-2-butenil e que já estão descritos como potenciais quimioterápicos.

Um complexo de cobre contendo o radical 1,4-dioxo-2-butenil foi avaliado quanto sua atividade antitumoral em células de adenocarcinoma mamário murino (4T1) e seu efeito toxicogênico em camundongos *Swiss*. Os autores observaram citotoxicidade e genotoxicidade para células 4T1, além de indução de parada do ciclo celular em fase G1 que ocorreu pelo aumento da expressão de ATM e P21. O composto também levou as células tumorais à apoptose devido ao aumento de expressão de BAX e da caspase-7. *In vivo*, o composto apresentou genotoxicidade em camundongos, sem apresentar, no entanto, danos permanentes, o qual foi observado pela ausência de formação de micronúcleos (danos cromossômicos). Além do mais, não induziu alterações nos parâmetros biométricos dos animais. Isso demonstra que moléculas contendo o grupo 1,4-dioxo-2-butenil apresentam potencial terapêutico para o câncer sem induzir danos/alterações importantes ao organismo (OLIVEIRA et al., 2018b).

Em nosso estudo a avaliação da integridade de membrana indicou que o composto A2 induziu o aumento da morte celular, pois provocou aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática. Aumento da permeabilidade de membrana é uma indicação de indução de morte celular (NEBE-VON-CARON; BADLEY, 1995, HEWITT; NEBE-VON-CARON, 2001). Além disso, os danos no DNA causado pelo composto M2, foram observado na análise do ciclo celular pelo acúmulo de células estavam na fase sub-G1. Essa fato reforça a indução de morte celular (BROECKER-PREUSS et al. 2015)

Na análise da morte celular, as células tratadas com o composto M2 encontram-se aumentadas em apoptose inicial. Esse fato corrobora com a expectativa de tratamentos utilizando quimioterápicos que induzam a morte celular por apoptose, e que não resultem em processos inflamatório (OOI; MA, 2013), como acontece no processo de morte celular por necrose (URRU et al., 2018).

Outro fato interessante é que o composto reduz M2 reduziu significativamente o nível de EROS das células. Esse é um fato importante porque danos no DNA, em células não tumorais, por exemplo, acontecem pelo aumento de EROS induzidos por quimioterápicos (DOURADO et al., 2022). Essa é uma importante fonte de danos no DNA (SILVA; JASIULIONIS, 2014). Agentes quimioterápicos como ciclofosfamida, cisplatina, doxorubicina, dentro outros, induzem danos no DNA mediado pelo aumento de radicais livres (BEDOSCHI; NAVARRO; OKTAY, 2016; GUERREIRO et al., 2016). Esse aumento, em geral, é capaz de induzir morte celular nas células tumorais e também causar lesões (efeito adverso) nas células não tumorais (LU et al., 2013; SRINIVAS et al., 2004; VERRAX et al, 2011). Em geral, as defesas antioxidantes das células não tumorais são mais eficientes e, por isso, essas células não morrem (GOTTLIEB et al., 2011). No entanto, evitar essas lesões é importante. Esse efeito de reduzir o estresse oxidativo, observado na administração do M2, é favorável à preservação da homeostasia das células. Esse fato é desejável para um quimioterápico mais seletivo.

Outro estudo que testou um novo composto contendo 1,4-dioxo-2-butenil que apresentou efeito quimioprotetor, com potencial para prevenir danos genotóxicos, não aumentou a fagocitose esplênica e induziu morte celular

(OLIVEIRA et al., 2019). Esse resultado corrobora nos nossos achados relativos à redução de EROS por M2.

Diante do exposto, considera-se que o A6 tem baixo potencial para o desenvolvimento de um novo quimioterápico para o câncer de intestino. Em contrapartida, o M2 tem características importantes para a prospecção de um quimioterápico eficiente e eficaz para o tratamento do câncer de intestino.

6 REFERÊNCIAS

AMERICAN CANCER SOCIETY, A. **Chemotherapy Drugs: How They Work?** Disponível em: <https://www.cancer.org/treatment>. Acesso em 20 de out de 2022.

ANDREW, M.D., WOLF, M.D., ELIZABETH, T.H., FONTHAM, M.P.H., TIMOTHY, R.C., CHRISTOPHER, R. F. Colorectal cancer screening for average-risk adults: 2018 guideline update. **American Cancer Society**, v. 68, p. 250-81, 2019.

BEDOSCHI, G.; NAVARRO, P. A.; OKTAY, K. Chemotherapy-induced damage to ovary: mechanisms and clinical impact. **Future Oncol.**, p. 1-12, 2016.

BOTTERI, E., IODICE, S., BAGNARDI, V., RAIMONDI, S., LOWENFELS, A. B., MAISONNEUVE, P. Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. **Jama**, v. 300, nº 23, p. 2765-2778, 2008..

BRAY, F., LAVERSANNE, M., WEIDERPASS, E., SOERJOMATARAM, I. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. **Cancer**, v. 127, n. 16, p. 3029-3030, 2021.

BROECKER-PREUSS, M., Müller, S., Britten, M., Worm, K., Schmid, K.W., Mann, K., Fuhrer, D. Sorafenib inhibits intracellular signaling pathways and induces cell cycle arrest and cell death in thyroid carcinoma cells irrespective of histological origin or braf mutational status. **BMC Cancer**, v. 26, p. 184, 2015.

CAI, S., LI, Y., DING, Y., CHEN, K., JIN, M. Alcohol drinking and the risk of colorectal cancer death. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 23, nº 6, p. 532-539, 2014.

CANCER GENOME ATLAS NETWORK. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. **Nature**, v. 487, nº 7407, p. 330, 2012.

CHAN, D. S., LAU, R., AUNE, D., VIEIRA, R., GREENWOOD, D. C., KAMPMAN, E., & NORAT, T. Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. **PloS one**, v. 6, nº. 6, p. e20456, 2011.

CHEN, S.C., REX, D.K. Endoscopist can be more powerful than age and male gender in predicting adenoma detection at colonoscopy. **Am J Gastroenterol**, v. 102, p. 856-61, 2007.

CHIDAMBARAM, M., MANAVALAN, R., KATHIRESAN, K. Nanotherapeutics to overcome conventional cancer chemotherapy limitations. **Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences**, v. 14, nº1, p. 67-77, 2011,

COOPER, G. The Development and Causes of Cancer. The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Sunderland (MA): Sunderland (MA): **Sinauer Associates**; 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>>.

COOPER, G.S., KOU, T.D., REX, D.K. Complications following colonoscopy with anesthesia assistance: A population-based analysis. **JAMA Intern Med**, v. 173, 551-556, 2013.

DE SOUSA E MELO, F., KURTOVA, A. V., HARNOSS, J. M., KLJAVIN, N., HOECK, J. D., HUNG, J., DE SAUVAGE, F. J. (2017). A distinct role for Lgr5+ stem cells in primary and metastatic colon cancer. **Nature**, v. 543(7647), 676-680, 2017.

DEKKER, E.; TANIS, P. J.; VLEUGELS, J. L. A.; KASI, P. M.; WALLACE, M. B. Colorectal cancer. **The Lancet**, v. 394, p. 1467-1480, 2019.

DOURADO, M.L., DOMPIERI, L.T., LEITÃO, G. M., MOURATO, F. A., SANTOS, R.G., ALMEIDA FILHO, P.J., MELO, M.D., BRANDÃO, S. Aumento de Captação Cardíaca de 18 F-FDG Induzida por Quimioterapia em Pacientes com Linfoma: Um Marcador Precoce de Cardiotoxicidade?. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 118, p. 1049-1058, 2022.

ESPINOSA, E., ZAMORA, P., FELIU, J., BARÓN, M. G. Classificação de drogas anticancerígenas - um novo sistema baseado em alvos terapêuticos. **Revisões do tratamento do câncer** , v. 29, n. 6, pág. 515-523, 2003.

GOLAN, D.E., Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basic of Drug Therapy. 4th ed. Lippincott Williams & Wilking, 2016.

GOLDSTEIN, M.; KASTAN, M. B. The DNA damage response: implications for tumor responses to radiation and chemotherapy. **Annual review of medicine**, v. 66, p. 129-143, 2015.

GOTTLIEB, M.G.V., MORASSUTTI, A. L., DA CRUZ, I.B.M. Transição epidemiológica, estresse oxidativo e doenças crônicas não transmissíveis sob uma perspectiva evolutiva. **Scientia Medica**, v. 21, n. 2, 2011.

GUERREIRO, D.D., CARVALHO, A.A., LIMA, L.F., RODRIGUES, G.Q., FIGUEIREDO, J.R., RODRIGUES, A.P.R. Impacto dos agentes antineoplásicos sobre os folículos ovarianos e importância das biotécnicas reprodutivas na preservação da fertilidade humana. **Reprod Clim**, v. 30, n. 2, p.90-99, 2016.

HENRIKSON, N.B., WEBBER, E.M., GODDARD, K.A., SCROL, A., PIPER, M., WILLIAMS, M.S., WHITLOCK, E.P. Family history and the natural history of colorectal cancer: systematic review. **Genetics in medicine**, v. 17, nº 9, p. 702-712, 2015

HEWITT, C.J.; NEBE-VON-CARON, G. The Application of Multi-Parameter Flow Cytometry to Monitor Individual Microbial Cell Physiological State. In: Enfors SO, ed. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Special volume

'**Physiological Stress Responses in Bioprocesses**'. Springer (em impressão), 2004.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: INCA, 2019.

JHA, A., MUKHERJEE, C., PRASAD, A.K., PARMAR, V.S., VADAPARTI, M., DAS, U., CLERCQ, E.D., BALZARINI, J., STABLES, J. P.; SHRIVASTAV, A., SHARMA, R.K., DIMMOCK, J.R. Derivatives of aryl amines containing the cytotoxic 1, 4-dioxo-2-butenyl pharmacophore. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 20, n. 5, p. 1510-1515, 2010.

KYRGIUO, M., KALLIALA, I., MARKOZANNES, G., GUNTER, M.J., PARASKEVAIDIS, E., GABRA, H., TSILIDIS, K.K. Adiposity and cancer at major anatomical sites: umbrella review of the literature. **BMJ**, v. 356, 2017.

LACERDA, D.V., REID, B.G., YOO, B.H. The multicellular tumor spheroid model for high-throughput cancer drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 7, n. 9, p. 819-830, 2012.

LU, J.J., BAO, J.L., WU, G.S., XU, W.S., HUANG, M.Q., CHEN, X.P., WANG, Y.T. Quinones derived from plant secondary metabolites as anti-cancer agents. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 13, n. 3, p. 45663, 2013.

LUKIANOVA-HLEB, E.Y., REN, X., ZASADZINSKI, J.A., WU, X., LAPOTKO, D. O. Plasmonic Nanobubbles Enhance Efficacy and Selectivity of Chemotherapy Against Drug-Resistant Cancer Cells. **Advanced Materials**, v. 24, nº 28, p. 3831-3837, 2012

LUNDQVIST, E. A., FUJIWARA, K., SEOUD, M. Principles of chemotherapy. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 131, n. 12, p. S146-S149, 2015.

MAKOVEC, T. Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. **Radiology and oncology**, v. 53, nº 2, p. 148-158, 2019.

MANZARI, M.T., SHAMAY, Y., KIGUCHI, H., ROSEN, N., SCALTRITI, M., HELLER, D.A. Targeted drug delivery strategies for precision medicines. **Nature Reviews Materials**, v. 6, nº 4, p. 351-370, 2021.

MEDEMA, J.P. Cancer stem cells: the challenges ahead. **Nature cell biology**, v. 15, nº 4, p. 338-344, 2013.

MIN, J., CHIN, L.K., OH, J., LANDEROS, C., VINEGONI, C., LEE, J., WEISSLEDER, R. CytoPAN—Portable cellular analyses for rapid point-of-care cancer diagnosis. **Science translational medicine**, v. 12, nº 555, p. eaaz9746, 2020.

MUHAMMAD, N., GUO, Z. Metal-based anticancer, chemotherapeutic agents. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 19, p. 144-153, 2014.

NASSAR, D., BLANPAIN, C. Cancer stem cells: basic concepts and therapeutic implications. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 11, p. 47-76, 2016

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NIH). **Cancer treatment**. Disponível em: <http://https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment>. Acesso em: 22 dez. 2021.

NAVARRO, S.D., BEATRIZ, A., MEZA, A., PESARINI, J. R., GOMES, R. S., KARAZIACK, C. B., CUNHA-LAURA, A. L., MONREAL, A. C. D., ROMÃO, W., LACERDA JUNIOR, V., MAURO, M. O., OLIVEIRA, R.J. A new synthetic resorcinolic lipid 3-Heptyl-3, 4, 6-trimethoxy-3H-isobenzofuran-1-one: evaluation of toxicology and ability to potentiate the mutagenic and apoptotic effects of cyclophosphamide. **European journal of medicinal chemistry**, v. 75, p. 132-142, 2014.

NEBE-VON-CARON, G., BADLEY, R.A. Viability assessment of bacteria in mixed populations using flow cytometry. **J. Microsc**, v. 79, p. 55-66, 1995.

NOLDIN, Vânia Floriani. **Estudos in vitro e in vivo da atividade próinflamatória e antitumoral de derivados maleimídicos**. 2011. Tese (Doutorado em Farmácia) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011. Disponível em: <http://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/94910>. Acesso em: 14 dez. 2021.

OLIVEIRA, E. J. T.; PESSATO, L. R.; FREITAS, R. O. N.; PELIZARO, B. I.; RABACOW, A. P. M.; VANI, J. M.; MONREAL, A. C. D., MANTOVANI, M. S., AZEVEDO, R. B.; ANTONIOLLI-SILVA, A. C. M. B.; GOMES, R. S.; OLIVEIRA, R. J. New Bis copper complex ((Z)-4-((4-chlorophenyl) amino)-4-oxobut-2-enoyl) oxy): Cytotoxicity in 4T1 cells and their toxicogenic potential in Swiss mice. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 356, p. 127-138, 2018b.

OLIVEIRA, R. J.; SANTOS, N. C. L.; PESARINI, J. R.; OLIVEIRA, B. C.; BERNO, C. R.; ARAÚJO, F. H. S.; SILVEIRA, I. O. M. F.; NASCIMENTO, R. O.; ANTONIOLLI-SILVA, A. C. M. B.; MONREAL, A. C. D.; BEATRIZ, A.; LIMA, D. P.; GOMES, R. S. Assessment of genetic integrity, splenic phagocytosis and cell death potential of (Z)-4-((1, 5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2, 3dihydro-1H-pyrazol-4-yl) amino)-4-oxobut-2-enoic acid and its effect when combined with commercial chemotherapeutics. **Genetics and Molecular Biology**, v. 41, p. 154-166, 2018a.

OOI, H.K., MA, L. Modeling heterogeneous responsiveness of intrinsic apoptosis pathway. **BMC SYST. BIOL**, v. 7, 2013.

OTT, I.; GUST, R. Non platinum metal complexes as anti-cancer drugs. **Archiv der Pharmazie**, v. 340, n. 3, p. 117-126, 2007.

PESSIN, J. V.; TAVARES, L.; GRADELLA, D. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE MALEIMIDAS E SEUS RESPECTIVOS ÁCIDOS ÂMICOS. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, v. 15, n. 28, 2018.

PETERSE, E.F.P., MEESTER, R.G.S., SIEGEL, R.L., CHEN, J.C., DWYER, A., AHNEN, D.J., SMITH, R. A., ZAUBER, A.G., LANSDORP-VOGELAAR, I. The impact to the rising colorectal cancer incidence in young adults on the optimal age to start screening: Micro simulation analysis I to inform the American Cancer Society colorectal cancer screening guideline. **Cancer**, v. 124, p. 2964-2973, 2018.

REX, D.K., BOLAND, R., DOMINITZ, J.A., GIARDIELLO, F. M., JOHNSON, D. A., KALTENBACH, T., LEVIN, T.R., LIEBERMAN, D., ROBERTSON, D.J. Colorectal cancer screening: recommendations for physicians and patients from the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. **Gastrointestinal Endoscopy**, v. 86, p. 18-33, 2017.

ROSOLEN, Daiane. **Citotoxicidade de derivados maleimídicos: relação entre a atividade antitumoral e antiadipogênica**. 2014. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/123405>. Acesso em: 13 dez. 2021.

SCHOEN, R. E., RAZZAK, A., KELLY, J. Y., BERNDT, S. I., FIRL, K., RILEY, T. L., PINSKY, P.F. Incidence and mortality of colorectal cancer in individuals with a family history of colorectal cancer. **Gastroenterology**, v. 149, nº 6, p. 1438-1445, 2015.

SHIMOKAWA, M., OHTA, Y., NISHIKORI, S., MATANO, M., TAKANO, A., FUJII, M., DATE, S., SUGIMOTO, S., KANAI, T., SATO, T. Visualization and targeting of LGR5+ human colon cancer stem cells. **Nature**, v. 545, nº7653, p. 187-192, 2017.

SHIN, S.W., SEO, C.Y., HAN, H., HAN, J.Y., JEONG, J.S., KWAK, J.Y., PARK, J.I. 15d-PGJ2 induces apoptosis by reactive oxygen species-mediated inactivation of Akt in leukemia and colorectal cancer cells and shows in vivo antitumor activity. **CLIN Cancer Res**, v. 15, p. 5414-5425, 2009.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics. CA: A **Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 1, p. 7-30, 2017.

SIEGEL, R.L., FEDEWA, S.A., ANDERSON, W.F., MILLER, K.D., MA, J., ROSENBERG, P.S., JEMAL, A. Colorectal cancer incidence patterns in the United States, 1974–2013. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v.109, nº 8, p. djw322, 2017.

SILVA, C.T.D., JASIULIONIS, M.G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, nº 1, p. 38-42, 2014.

SRINIVAS, P., GOPINATH, G., BANERJI, A., DINAKAR, A., SRINIVAS, G. Plumbagin induces reactive oxygen species, which mediate apoptosis in human cervical cancer cells. **Mol Carcinog**, v. 40, n. 4, p. 201-11, 2004.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

SYNGAL, S., BRAND, R. E., CHURCH, J. M., GIARDIELLO, F. M., HAMPEL, H. L., BURT, R. W. ACG clinical guideline: genetic testing and management of hereditary gastrointestinal cancer syndromes. **The American journal of gastroenterology**, v. 110, nº 2, p. 223, 2015.

THANIKACHALAM, K., KHAN, G. Colorectal cancer and nutrition. **Nutrients**, v. 11, nº 1, p. 164, 2019.

URRU, S.A.M., GALLUS, S., BOSETTI, C., MOI, T., MEDDA, R., SOLLAI, E., MURGIA, A., SANGES, F., PIRA, G., MANCA, A., PALMAS, D., FLORIS, M., ASUNIS, A.M., ATZORI, F., CARRU, C., D'INCALCI, M., GHIANI, M., MARRAS, V., ONNIS, D., SANTONA, M.C., SAROBBA, G., VALLE, E., CANU, L., COSSU, S., BULFONE, A., ROCCA, P.C., DE MIGLIO, M.R., ORRÙ, S. Clinical and pathological factors influencing survival in a large cohort of triple-negative breast cancer patients. **BMC Cancer**, v 18, p. 1-11, 2018.

US Preventive Services Task Force. Screening for colorectal cancer: US preventive services task force recommendation statement. **JAMA**, v. 315, p. 2564-2575, 2016.

VASEN, H. F., BLANCO, I., AKTAN-COLLAN, K., GOPIE, J. P., ALONSO, A., ARETZ, S., BERNSTEIN, I., BERTARIO, L., BURN, J., MÖSLEIN, G. Revised guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (HNPCC): recommendations by a group of European experts. **Gut**, v. 62, nº 6, p. 812-823, 2013.

VERRAX, J. BECK, R, DEJEANS, N., GLORIEWX, C., SID, B., PEDROSA, R.C., BENITES, J., VASQUEZ, D. VALDERRAMA J.A., CALDERON, P.B. Redox-active quinones and ascorbate: an innovative cancer therapy that exploits the vulnerability of cancer cells to oxidative stress. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 11, n. 2, p. 213-21, 2011.

VICHAYA, E. G.; CHIU, G. S.; KRUKOWSKI, K.; LACOURT, T. E.; KAVALAARS, A.; DANTZER, R.; HEIJNEN, C. J.; WALKER, A. K. Mechanisms of chemotherapy-induced behavioral toxicities. **Frontiers in neuroscience**, v. 9, p. 131, 2015.

World Health Organization (WHO). Câncer. 2022. Disponível em: <<https://who.int/health-topics/cancer#tab=tab1>>. Acesso em: 06 out 2022.

YOKOTA, J. Tumor progression and metastasis. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 497-503, 2000.