

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, ALIMENTOS E NUTRIÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**CAMILLA IZABELA NANTES**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE COMPOSTOS  
ORGANOSSULFURADOS**

**CAMPO GRANDE- MS  
2018**

**CAMILLA IZABELA NANTES**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE COMPOSTOS  
ORGANOSSULFURADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Danielle Bogo.

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Renata Trentin Perdomo.

**CAMPO GRANDE- MS  
2018**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**  
**CAMILLA IZABELA NANTES**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE COMPOSTOS  
ORGANOSSULFURADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre.

A banca examinadora, após a avaliação do trabalho, atribuiu ao candidato o conceito \_\_\_\_\_.

Campo Grande, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2018.

BANCA EXAMINADORA

CONCEITO

\_\_\_\_\_  
Danielle Bogo - UFMS

\_\_\_\_\_  
Edson dos Anjos dos Santos - UFMS

\_\_\_\_\_  
Rodrigo Juliano Oliveira - UFMS

\_\_\_\_\_  
Maria de Fátima Cepa Matos (suplente) - UFMS

## **Agradecimentos**

Primeiramente a Deus por me amar incondicionalmente e me permitir chegar até aqui com saúde e alegria. Por me dar sabedoria para enfrentar qualquer obstáculo e por colocar pessoas especiais no meu caminho.

À minha mãe Áurea Izabel Nantes, por me incentivar a estudar e me apoiar em todas as fases. Todo amor e cuidado que sempre teve comigo e com meu filho foram fundamentais para conclusão deste trabalho.

Ao meu esposo Wanderson Ap<sup>o</sup> da Silva e ao meu filho Guilherme Nantes da Silva pelo amor, companheirismo e compreensão. Vocês são essenciais em minha vida, me incentivam a crescer e me dão força para seguir em frente.

Aos meus avós, aos meus tios (as), primos (as), ao meu irmão e a minha sogra, agradeço pelas orações, pela torcida e por estarem sempre presentes.

À minha orientadora Danielle Bogo por me aceitar como sua aluna de mestrado, por confiar em meu trabalho e me tranquilizar em todas as ocasiões. Agradeço a paciência, a dedicação e todos os ensinamentos que contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional.

À Profa. Dra. Renata Trentin Perdomo, pela confiança e ajuda com os experimentos.

À Profa. Dra. Maria de Fatima Cepa Matos, por me receber no Laboratório, por todos os ensinamentos com a cultura de células e pelas contribuições na qualificação.

Ao Prof. Dr. Edson dos Anjos dos Santos pelo fornecimento dos compostos utilizados, pelas contribuições na qualificação e pelo esforço dedicado para concretização deste trabalho.

Às alunas Ingrid Duarte e Rejane Gonçalves pela síntese dos compostos testados.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira, pelo incentivo a pesquisa desde a graduação, por todos os ensinamentos, pelas contribuições neste trabalho e por disponibilizar o citometro de fluxo para os testes de caspase e ciclo celular.

Aos colegas do CETROGEN, Edwin Torres, Bruno Ivo, Lucas Pessato, Vivianne Landgraf e Ana Cristina Basso pelo auxílio nas leituras de citometria.

À minha parceira de estudos e de experimentos Kamylla Fernanda Souza, por todas as dúvidas compartilhadas e esclarecidas e por todas distrações merecidas.

As meninas que fazem ou fizeram parte do laboratório de cultura de células, pela convivência e auxílio nos experimentos.

As meninas da turma de 2016 do mestrado em farmácia, Raissa Ishikawa e Claudia Stutz pelo companheirismo e solidariedade prestados durante os momentos difíceis.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e todos os professores vinculados a ele.

A CAPES/ CNPQ pela bolsa de estudos fornecida durante a execução deste trabalho.

## RESUMO

Estudos com compostos contendo enxofre em sua estrutura demonstram amplo espectro de atividades biológicas e apresentam resultados promissores para terapia do câncer. Dentre estes compostos, citam-se os organossulfurados sintéticos análogos de produtos naturais com modificações estruturais que visam melhorar potência e a seletividade dos compostos. Nesse estudo avaliou-se através do ensaio colorimétrico da sulforrodamina B (SRB) a atividade antiproliferativa dos seguintes compostos; 1. difenildissulfeto, 2. bis (4-metilfenil) dissulfeto, 3. bis (4-metoxifenil) dissulfeto, 4. bis (4-bromofenil) dissulfeto, 5. bis(4-clorofenil) dissulfeto, 6. S-fenilbenzenossulfonotioato, 7. S - (4-metilfenil) 4-metilbenzenossulfonotioato, 8. S-(4-metoxifenil) 4-metoxibenzenossulfonotioato, 9. S-(4-fluorofenil)-4-fluorobenzenossulfonotioato frente a 8 linhagens de células tumorais: MCF-7 (mama), 786 (rim), PC-3 (próstata), HT-29 (cólon), HEPG2 (fígado), MDA-MB-231 (mama triplo negativo), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplas drogas), B16-F10 (melanoma murino) e frente a uma linhagem de células não tumorais NIH/3T3 (fibroblasto murino) para determinar o índice de seletividade. Os valores de  $GI_{50}$  obtidos demonstraram que os compostos testados apresentam atividade citotóxica relevante, com destaque para o composto 8, que foi o mais ativo e apresentou valor de  $GI_{50}$  igual a 2,82  $\mu\text{g/mL}$  para a linhagem 786-0 e 19,38  $\mu\text{g/mL}$  para a linhagem NIH/3T3, sendo 6,88 vezes mais seletivo para a célula de câncer renal. O ensaio de análise morfológica, quantificação de caspase-3 ativada e progressão no ciclo celular foram realizados em células 786-0 tratadas com o composto 8. A partir do teste de análise morfológica com brometo de etídio e laranja de acridina, foi demonstrado que este composto é capaz de induzir morte celular na linhagem 786-0 de maneira significativa ( $p < 0.01$ ) na concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$  após 24 h e em 48 h de tratamento. Este composto também promoveu um aumento das células com caspase-3 ativada e foi capaz de parar o ciclo celular na fase G2/M. Os resultados indicam que o composto 8 apresenta atividade antiproliferativa na linhagem 786-0 por mecanismos pró apoptóticos, sendo assim, pode servir como protótipo para síntese de novas moléculas ou ser considerado um candidato para o tratamento de câncer, inclusive frente as células tumorais que apresentam quimiorresistência, no entanto, mais testes biológicos são necessários para elucidar outros mecanismos envolvidos.

**Palavras-chave:** Enxofre, câncer renal, apoptose.

## ABSTRACT

Studies with sulfur compounds demonstrate a broad spectrum of biological activities and present promising results for cancer therapy. Among these compounds, synthetic organosulfur analogues of natural products with structural modifications are mentioned which have improved the potency and the selectivity of the compounds. In this study, the antiproliferative activity of nine of the following compounds was evaluated through the colorimetric assay of sulforhodamine B (SRB): 1. diphenyldisulphide, 2. bis (4-methylphenyl) disulfide, 3. bis (4-methoxyphenyl) disulfide, 4. bis (4-bromophenyl) disulfide, 5. bis (4-chlorophenyl) disulfide, 6. S-phenylbenzenesulfonothioate, 7. S- (4-methylphenyl) 4-methylbenzenesulfonothioate, 8. S- (4-methoxyphenyl) -4-methoxybenzenesulfonothioate, 9. S- (4-fluorophenyl) -4-fluorobenzenesulfonothioate (9) 8 tumor cell lines: MCF-7 (breast), 786 (kidney), PC-3 (prostate), HT-29 (colon), HEPG2 (hepatocellular), MDA-MB-231 (triple negative breast), NCI / ADR-RES (ovary with multidrug resistance phenotype), B16-F10 (murine melanoma) and against a NIH / 3T3 non-tumor cell line (murine fibroblast) to determine the selectivity index. The GI<sub>50</sub> values obtained demonstrated that the compounds tested showed relevant cytotoxic activity, especially the compound 8, which was the most active and had a GI<sub>50</sub> value of 2.82 µg / mL for the line 786-0 and 19,38 µg / mL for the NIH / 3T3 line, being 6.88 times more selective for the renal cancer cell. The assay for morphological analysis, quantification of activated caspase-3 and cell cycle progression were performed on 786-0 cells treated with compound 8. From the morphological analysis, test with ethidium bromide and acridine orange, it was demonstrated that this Compound is capable of inducing significant cell death in the 786-0 strain (p <0.01) at 25 µg / mL after 24 h and 48 h of treatment. This compound also promoted an increase of cells with activated caspase-3 and was able to stop the cell cycle in the G2 / M phase. The results indicate that compound 8 has antiproliferative activity in the 786-0 lineage by pro-apoptotic mechanisms, and thus, can serve as a prototype for the synthesis of new molecules or be considered a candidate for the treatment of cancer, including against the tumor cells that present. However, more biological tests are needed to elucidate other mechanisms involved.

**Key words:** Sulfur, renal cancer, apoptosis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Papel do gene VHL na angiogênese e na proliferação do carcinoma de células renais.....	19
Figura 2 - Vias de sinalização da apoptose.....	22
Figura 3 - Sítios de ligação de drogas antimitóticas aos microtúbulos.....	25
Figura 4 - Mecanismo da atividade antiangiogênica de Combretastatina A-4P.....	26
Figura 5 - Compostos organossulfurados derivados do alho.....	28
Figura 6 - Mecanismos anticancerígenos de organossulfurados derivados do alho.	29
Figura 7 - Estrutura química e nomenclatura dos diarildissulfetos (compostos 1, 2, 3, 4 e 5) e diariltiosulfonatos (compostos 6, 7, 8 e 9) .....	32
Figura 8 - Atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> do composto 8 na linhagem 786-0 em três tempos experimentais.....	43
Figura 9 - Atividade antiproliferativa do composto 8 na linhagem NHI/3T3 e 786-0 após 48 h de tratamento.....	43
Figura 10 - Efeito do composto 8 na morfologia das células 786-0 analisadas com laranja de acridina e brometo de etideo .....	44
Figura 11 - Fotografia de microscopia óptica das células 786-0.....	45
Figura 12 - Efeito do composto 8 na ativação de caspase-3 em células 786-0. ....	46
Figura 13 - Efeito do composto 8 na progressão do ciclo celular.....	47



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de $GI_{50}$ em $\mu\text{g/mL}$ e $\mu\text{M}$ expressos em média $\pm$ SEM dos compostos organossulfurados testados em linhagens de células tumorais e em uma linhagem não tumoral.....	41
Tabela 2 - Índice de seletividade (IS) dos compostos organossulfurados .....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIF	<i>Apoptosis-inducing factor</i> (Fator Indutor de Apoptose)
APAF-1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i> (Fator de Ativação da Protease Apoptótica 1)
BAK	<i>Bcl-2 antagonist killer 1</i> (BCL-2 antagonista de assassinos 1)
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i> (Proteína X associada a BCL2)
BCL-2	<i>B cell lymphoma protein 2</i> (Proteína do linfoma de células B2)
BID	<i>BH3-interacting domain</i> (Agonista da morte no domínio que interage com BH3)
CCNS	<i>Cyclo cellular non-specific</i> (Ciclo- celular não específicos)
CCR	Carcinoma de Células Renais
CCS	<i>Specific cell cycle</i> (Ciclo- celular específicos)
CDKs	<i>Cyclin-dependent kinase</i> (Quinases dependentes de ciclina)
CKI	<i>Cyclin kinase inhibitors</i> (Inibidoras de CDK)
CN	Controle Negativo
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (Meio de cultura modificado da Dulbelco)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Dexoribonucleico
E3-Ligase	Ubiquitina E3-Ligase
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i> (Domínio de Morte Associado ao FAS)
GI <sub>50</sub>	<i>Growth Inhibition 50</i> (concentração necessária para inibir em 50% o crescimento celular)
GSH	L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinil-glicina (Glutaciona)
HIF	<i>Hypoxia-inducible factors</i> (Fator Induzido por Hipóxia)
HTRA2	High-temperature requirement protease A2 (Proteína de alta temperatura A2)

IAPs	<i>Inhibitors of apoptosis proteins</i> (Proteínas inibidoras de Apoptose)
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> (Agência Internacional de pesquisa em câncer)
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INQUI	Instituto de Química/UFMS
IS	Índice de seletividade
LC <sub>50</sub>	Concentração letal média
MDR	<i>Multidrug resistance</i> (Resistência a Múltiplas Drogas)
MOMP	<i>Mitochondrial outer membrane permeabilization</i> (permeabilização da membrana externa mitocondrial)
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i> (Alvo da rapamicina em mamíferos)
OSCs	Organossulfurados
PBS	Tampão fosfato-salino
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i> (Fator de Crescimento derivado de plaquetas)
pH	Potencial hidrogeniônico
pVHL	Proteína de supressão de tumor von Hippel-Lindau
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (Espécies reativas de oxigênio)
Rpm	Rotações por Minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i> (Erro padrão da média)
SFB	Soro fetal bovino
SINTMOLB	Laboratório de Síntese e Transformações de Moléculas Orgânicas
SMAC	<i>Second mitochondria-derived activator of caspase</i> (Segundo Ativador Mitocondrial de Caspase)
SRB	Sulforrodamina B
T0	Tempo Zero
TCA	Ácido Tricloroacético
TGI	<i>Total growth inhibition</i> (Concentração que Inibe 100% o Crescimento Celular)

TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> (Fator de Necrose Tumoral)
TNFR	<i>Tumor necrosis factor receptor</i> (Receptor do Fator de Necrose Tumoral)
TRADD	<i>TNFR1-associated death domain protein</i> (Domínio de morte associado ao TNFR 1)
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i> (Ligante Indutor de Apoptose Relacionado ao TNF)
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (Fator de Crescimento endotelial)
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i> ( Receptor do Fator de Crescimento endotelial)
VHL	Gene Von Hippel Lindau
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização mundial da saúde)
7AAD	<i>7-aminoactinomycin D</i>

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	16
2.1	<b>Câncer .....</b>	<b>16</b>
2.2	<b>Câncer renal.....</b>	<b>17</b>
2.3	<b>Cultura de células.....</b>	<b>20</b>
2.4	<b>Apoptose .....</b>	<b>20</b>
2.5	<b>Ciclo celular .....</b>	<b>23</b>
2.6	<b>Microtúbulos e agentes antitubulínicos .....</b>	<b>24</b>
2.7	<b>Compostos organossulfurados .....</b>	<b>27</b>
3	OBJETIVOS .....	31
3.1	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>31</b>
3.2	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>31</b>
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	32
4.1	<b>Obtenção dos compostos.....</b>	<b>32</b>
4.2	<b>Linhagens celulares .....</b>	<b>33</b>
4.3	<b>Cultivo de células .....</b>	<b>33</b>
4.4	<b>Ensaio de screening de atividade antiproliferativa .....</b>	<b>34</b>
4.4.1	<b>Teste de citotoxicidade.....</b>	<b>34</b>
4.4.2	<b>Índice de seletividade .....</b>	<b>35</b>
4.5	<b>Estudo do mecanismo de ação antiproliferativo em células 786-0.....</b>	<b>36</b>
4.5.1	<b>Teste de citotoxicidade em três tempos de tratamento.....</b>	<b>36</b>
4.5.2	<b>Ensaio de morte celular .....</b>	<b>36</b>
4.5.3	<b>Ensaio de caspase-3 por citometria de fluxo .....</b>	<b>37</b>
4.5.4	<b>Ciclo celular .....</b>	<b>38</b>
4.6	<b>Análise Estatística.....</b>	<b>39</b>
5	RESULTADOS .....	40
5.1	<b>Screening de atividade antiproliferativa.....</b>	<b>40</b>
5.2	<b>Estudo do mecanismo de ação antiproliferativo em células 786-0.....</b>	<b>42</b>
5.2.1	<b>Teste de citotoxicidade em três tempos de tratamento.....</b>	<b>42</b>
5.2.2	<b>O composto 8 induz alteração morfológica e morte em células 786-0..</b>	<b>44</b>
5.2.3	<b>O composto 8 ativa caspase-3.....</b>	<b>45</b>

<b>5.2.4</b>	<b>O composto 8 induz parada do ciclo celular na fase G2/M .....</b>	<b>47</b>
6	DISCUSSÃO .....	48
7	CONCLUSÃO.....	51
8	REFERÊNCIAS .....	52

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença que se destaca pelo alto índice de morbidade e mortalidade (INCA, 2018). A formação de tumores é decorrente do desequilíbrio entre a proliferação e a morte celular. Assim, o ciclo celular e o processo apoptótico são considerados pontos importantes na terapia do câncer e vários quimioterápicos disponíveis no mercado são capazes de atuar sobre o ciclo e induzir apoptose (THOMPSON, 1995; WILLIAMS; STOEBER, 2012). Entretanto, a baixa seletividade e a resistência tumoral estimulam a busca por agentes seletivos e capazes de atuar sobre as células quimioresistentes e desta forma diminuir a toxicidade em células normais e aumentar a efetividade do tratamento quimioterápico (LEHNERT, 1996; KAMB et al., 2005).

Na pesquisa de agentes anticâncer, os testes *in vitro* são amplamente utilizados. Além do *screening* para avaliar a citotoxicidade, a cultura de células permite o estudo dos mecanismos antiproliferativos, tanto de produtos naturais como de compostos sintéticos e assim, auxilia na descoberta de novas drogas (SHOEMAKER, 2006). A química medicinal também é uma ferramenta importante no desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos, pois além de permitir a síntese de diversos compostos, proporciona a otimização de moléculas já existentes (GUIDO et al., 2010).

Dentre os agentes pesquisados quanto ao potencial anticâncer, os compostos organossulfurados despertam grande interesse, pois apresentam atividade antiproliferativa em diversas linhagens de células neoplásicas e são capazes de induzir apoptose por diferentes mecanismos (LU et al., 2004; SCHMID et al., 2016, SMITH et al., 2016). Tendo em vista que compostos contendo enxofre são considerados agentes promissores no tratamento do câncer, o presente estudo avaliou a atividade antiproliferativa de nove organossulfurados sintéticos em 8 linhagens de células tumorais e em uma linhagem de célula não tumoral. Para elucidar os mecanismos envolvidos com a ação antiproliferativa do composto mais ativo, foram realizados os testes de análise morfológica, progressão do ciclo celular e quantificação da caspase-3 na linhagem 786-0.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Câncer

Câncer é o termo genérico para um conjunto de doenças que podem afetar diversos tecidos. É uma das principais causas de morte no mundo, sendo que no ano de 2015 foi responsável por 8,8 milhões de óbitos (WHO, 2018). Devido a esses altos índices é considerado um problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento, onde é esperado que ocorra 80% dos mais de 20 milhões de novos casos estimados para 2025 (INCA, 2015). No Brasil, de acordo com as estimativas para o biênio 2018-2019, serão registrados por ano no país cerca de 600 mil novos casos (INCA, 2018).

Essa doença é caracterizada principalmente pela presença de células em proliferação contínua com capacidade de invadir tecidos adjacentes e de instalar-se em tecidos distantes dando origem aos tumores secundários (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Estas células são decorrentes de alterações genéticas e epigenéticas que impulsionam a expansão clonal ao modificar a expressão de genes reguladores do ciclo celular e da apoptose (EVAN; VOUSDEN, 2001; FOUAD; AANEI, 2017).

Os principais genes envolvidos nesse processo são os proto-oncogenes e os supressores tumorais. Nas células não neoplásicas a homeostasia é garantida pela regulação correta desses genes. Estas células são dependentes de mitógenos para sua multiplicação e os sinais proliferativos são equilibrados com os processos inibitórios de crescimento (EVAN; VOUSDEN, 2001). Quando ocorrem mutações nestes genes há um desequilíbrio entre a proliferação e a morte celular, as células tornam-se auto-suficientes para emitir sinais de crescimento e são capazes de suprimir fatores anticrescimento promovendo assim a formação de tumores (FOUAD; AANEI, 2017).

Durante o crescimento tumoral, as células neoplásicas também ativam a angiogênese. Os novos vasos formados fornecem os nutrientes necessários para a proliferação e possibilitam as metástases. Esse processo é considerado um alvo para a terapia antineoplásica, pois está intimamente relacionado com a progressão tumoral (FOLKMAN, 2002).



Há uma grande variedade de antineoplásicos disponíveis. Entretanto, a maioria desses agentes não são específicos e atuam tanto em células tumorais quanto em células normais, provocando diversos efeitos colaterais (KAMB, 2005). Além da baixa seletividade, um outro fator que limita o sucesso da terapia antitumoral é a resistência a múltiplos fármacos, que pode ser inata ou adquirida pelas células tumorais após a quimioterapia (LONGLEY; JOHNSTON, 2005). As falhas na quimioterapia estão relacionadas principalmente com esta resistência e são responsáveis por grande parte das mortes dos pacientes oncológicos. Desta forma, a busca por compostos efetivos capazes de superar os mecanismos de resistência é um desafio para melhorar o tratamento antineoplásico e assim aumentar a taxa de sobrevivência dos pacientes (LONGLEY; JOHNSTON, 2005).

A resistência apresentada pelas células tumorais inclui diversos mecanismos que alteram a eficácia dos quimioterápicos, por exemplo, por meio da superexpressão do gene de resistência a múltiplas drogas (MDR) e da glicoproteína P (P-GP). A P-GP é uma bomba de efluxo, presente na membrana citoplasmática que transporta o fármaco para o meio extracelular e desta forma impede o acúmulo dos quimioterápicos em níveis necessários para induzir efeitos citotóxicos (KRISHNA; MAYER, 2000).

Outro mecanismo de resistência relaciona-se ao aumento da concentração da glutathione (GSH) intracelular. Este antioxidante protege as células contra os efeitos nocivos de espécies reativas de oxigênio (ROS) e promove a eliminação de xenobióticos (ORTEGA et al., 2011).

## **2.2 Câncer renal**

O carcinoma de células renais (CCR) representa 3 % de todas as neoplasias do mundo, sendo prevalente em homens entre 60 e 70 anos de idade. Nas últimas décadas a incidência desse tipo de câncer tem aumentado, possivelmente devido ao desenvolvimento de tecnologias de diagnóstico de imagem como a ultrassonografia e a tomografia computadorizada, que possibilitaram uma maior detecção de CCR assintomático, isto porque a maioria dos pacientes com câncer renal não apresentam sintomas e frequentemente essa doença é diagnosticada em estado avançado (LJUNGBERG et al., 2010). Os principais fatores de risco para esta

neoplasia incluem o tabagismo, a obesidade e a hipertensão arterial (CHOW et al., 2010).

Embora a morbidade não seja alta, quando comparada aos outros tipos de tumores, a taxa de mortalidade é preocupante, visto que cerca de 40% dos pacientes no mundo morrem devido a progressão da doença. No Brasil essa taxa é ainda maior e corresponde a 54%, sendo que em 2008, dos 4176 casos diagnosticados no país estima-se que tenham ocorrido 2316 mortes (FERLAY, 2010).

Para o tratamento desta neoplasia, nos casos de pacientes com carcinoma de células renais localizado, a nefrectomia parcial ou total é uma opção. No entanto, 30% dos pacientes recém-diagnosticados apresentam metástases e cerca de 20 a 30% dos que realizam a cirurgia exibem casos de reincidência tumoral. Quando o caso já está avançado e o tumor instala-se em outros tecidos, a quimioterapia e a imunoterapia são recomendadas. Entretanto, a baixa resposta e a toxicidade do tratamento são importantes obstáculos a serem vencidos (LJUNGBERG et al., 2010).

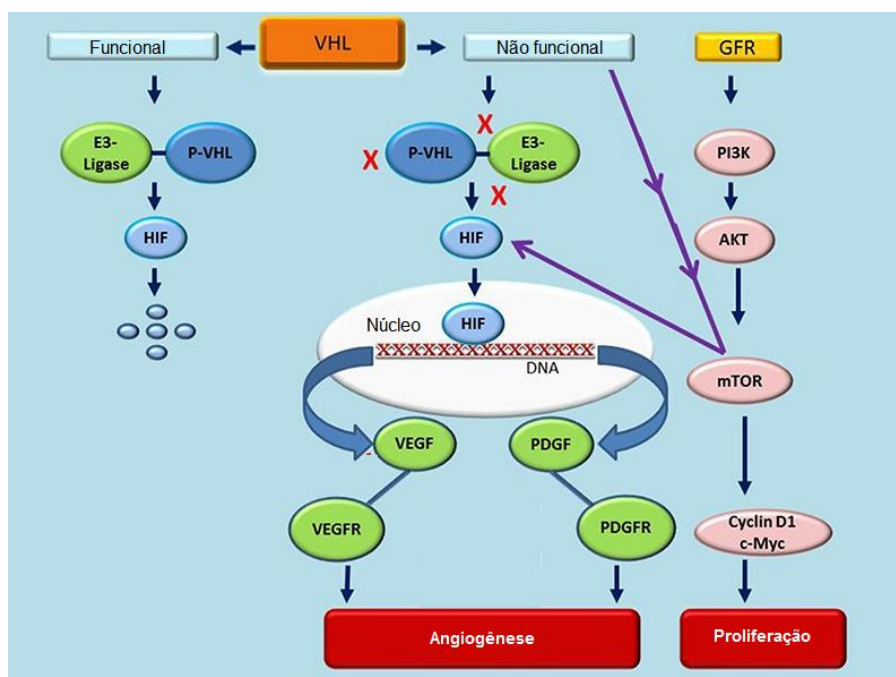
O carcinoma de células renais pode ser classificado em diferentes subtipos de acordo com suas características histológicas. Esta classificação é importante, pois auxilia no prognóstico e no tratamento da doença. Os subtipos mais frequentes incluem; o carcinoma de células renais claras, o de células renais papilares e o carcinoma de células cromóforas (MUGLIA; PRANDO, 2015).

O carcinoma de células renais claras (ccRCC) é o subtipo histológico mais comum, apresenta o pior prognóstico entre todos os CCRs, possui alto potencial metastático e é resistente a radio e a quimioterapia (KAMINSKA et al., 2013). A resistência destas células pode associar-se a maior expressão do gene MDR (HARTMANN; BOKEMEYER, 1999; WALSH, et al., 2009) ou a alta concentração de GSH intracelular (PLJESA-ERCEGOVAC, 2008). Além disso, esse carcinoma é considerado um tumor hipervascular e essa característica é decorrente da mutação no gene Von Hippel Lindau (VHL) (KIM et al., 2005).

Este gene, quando funcional codifica a pVHL que forma complexos com ubiquitina E3-ligase para degradar o fator induzido por hipóxia (HIF). Quando a VHL não é funcional, o HIF não degradado é translocado para o núcleo onde estimula a

expressão de moléculas pró-angiogênicas como o fator de crescimento endotelial (VEGF) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). A inativação do VHL também ativa a sinalização mTOR que está relacionada com a proliferação celular e regula positivamente HIF, promovendo a angiogênese (Figura 1) (KIM; KAELIN, 2004; MORAIS, 2014).

Figura 1 - Papel do gene VHL na angiogênese e na proliferação do carcinoma de células renais.



Fonte: Adaptado de MORAIS (2014).

VHL- gene Von Hippel Lindau, GFR- receptor do fator de crescimento, HIF- fator induzido por hipóxia, VEGF- fator de crescimento endotelial vascular, VEGFR- receptor para VEGF, PDGF-Fator de crescimento derivado de plaquetas, PDGFR - receptor para PDGF, mTOR- Alvo da rapamicina em mamíferos.

Nos últimos anos, os conhecimentos da biologia das células de carcinomas renais possibilitaram a descoberta de novas opções terapêuticas. Os fármacos antiangiogênicos com ação anti-VEGF e anti-mTOR proporcionam melhorias no controle da doença. Entretanto, o ganho na sobrevida ainda é limitado (PENTICUFF; KYPRIANOU, 2015).

A maioria dos pacientes com metástases não apresentam respostas ao tratamento e um provável mecanismo de resistência a estes fármacos anti-VEGF e anti-mTOR é a adoção pela célula de estratégias de sinalizações alternativas para compensar a inibição da ligação do VEGF ao seu receptor (VEGFR). Assim ganha-

se um potencial angiogênico independente do VEGF (RINI; ATKINS, 2009). Logo, o tratamento eficaz do CCR metastático ainda é um desafio (MILELLA; FELICI, 2011).

### **2.3 Cultura de células**

O cultivo celular é um procedimento que permite o crescimento de células em laboratório independente do organismo que a originou. A utilização deste ensaio possibilita o estudo da biologia molecular de diversas células e contribui com importantes descobertas científicas (AMARAL; MACHADO-SANTELLI, 2011).

Na pesquisa de agentes antineoplásicos, por exemplo, os testes *in vitro* são amplamente utilizados, e a cultura de células tumorais é considerada uma ferramenta importante para descobertas de novas drogas, pois permite o estudo do comportamento das células em resposta a um tratamento e possibilita a compreensão dos efeitos e mecanismos envolvidos com a ação de diferentes agentes (NIU; WANG, 2015).

Um dos testes mais empregados na investigação de agentes anticâncer são os ensaios de citotoxicidade em cultura de células (SHOEMAKER, 2006; HOUGHTON et al., 2007). Esses testes apresentam diversas vantagens, pois possuem boa reprodutibilidade, são de fácil execução, apresentam baixo custo frente à sua relevância científica e ainda contribuem para a redução de ensaios *in vivo*, pelo menos na fase de triagem (SKEHAN et al., 1990; HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1999). Além disso, as condições fisiológicas podem ser mantidas constantes, pois a cultura de células permite o controle de pH, temperatura e pressão de CO<sub>2</sub>. (FRESHNEY, 2005).

### **2.4 Apoptose**

Apoptose é um tipo de morte celular programada que ocorre em processos fisiológicos normais para garantir a homeostase dos tecidos. Desse modo, células que perderam suas funções ou apresentam alterações são eliminadas do organismo (WYLLIE et al, 1980; OKADA; MAK, 2004).

A apoptose pode ser desencadeada por duas principais vias: a via extrínseca, iniciada pela sinalização de um ligante ao receptor de morte celular presente na

membrana; e a via intrínseca, iniciada por condições de estresse celular. Mas, ambas podem ser mediadas pela ativação de caspases (BUDIHARDJO et al., 1999).

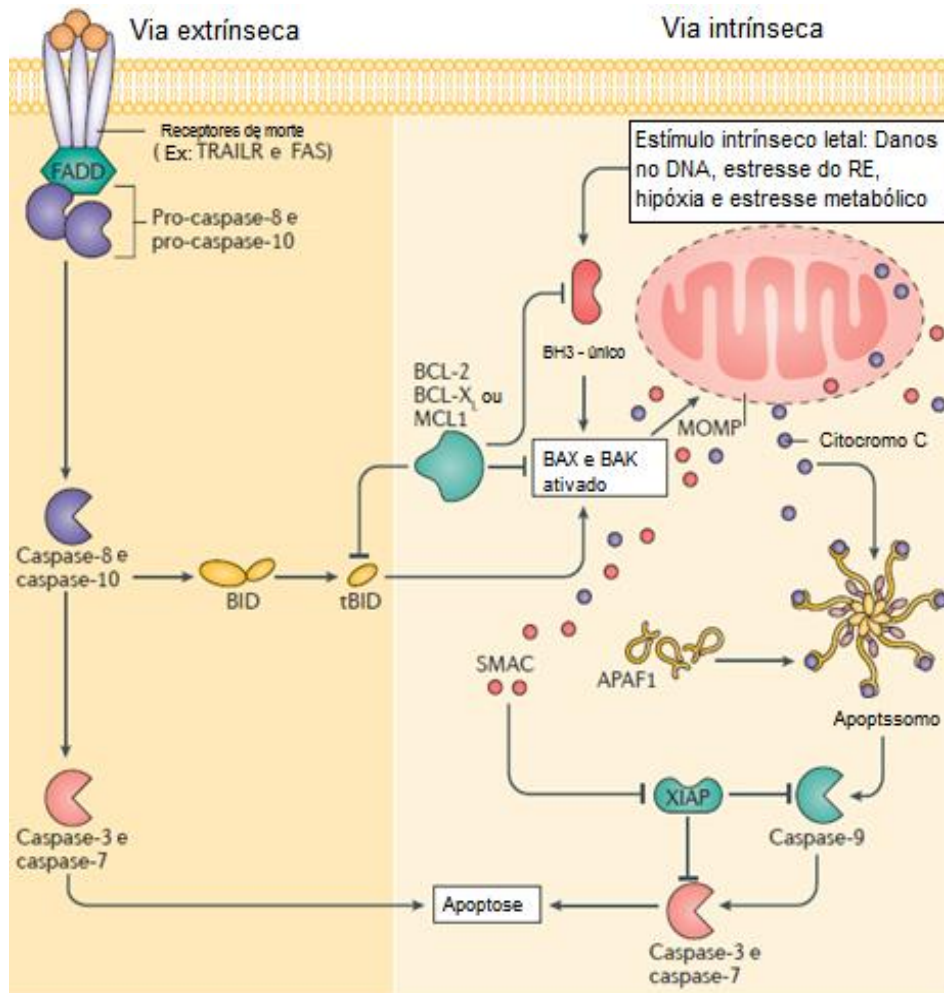
As caspases são enzimas da família das cisteínas proteases, sintetizadas inicialmente como precursores inativos, que são clivados por outras moléculas para gerar as formas ativas. As caspases iniciadoras tanto da via extrínseca (caspases-8 e -10) como da via intrínseca (caspase-9) convergem sinais para o mesmo grupo de caspases executoras (-3, -6 e -7) que provocam uma série de eventos intracelulares resultando na morte da célula (HAJRA; LIU, 2004).

Vários eventos estão envolvidos nas vias apoptóticas para que ocorra a ativação das caspases (Figura 2). Na via extrínseca, a ligação de citocinas como TNF (fator de necrose tumoral), FaS (fragmento estimulador de apoptose) ou TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF) aos seus respectivos receptores de morte, permitem a associação destes com as proteínas adaptadoras, como o domínio de morte associado ao Fas (FADD) ou o domínio de morte associado ao TNFR (TRADD) que interagem com a pró-caspase-8 e -10 promovendo clivagem e ativação. Uma vez ativas, estas caspases iniciadoras podem ativar diretamente as caspases executoras de morte celular (-3 e -7) ou ainda ativar a via intrínseca para iniciar a apoptose (ICHIM; TAIT, 2016).

A via intrínseca pode ser desencadeada por fatores como danos no DNA, hipóxia, acúmulo de proteínas malformadas ou drogas citotóxicas. Esses estímulos ativam as proteínas pró-apoptóticas como BAX e BAK (DASGUPTA, 2016). A ativação destas proteínas altera a permeabilidade da membrana mitocondrial liberando fatores que podem ativar a morte celular de maneira dependente ou independente de caspases. Na via dependente de caspase, o citocromo c se liga ao fator de ativação da protease apoptótica 1 (APAF-1) e a pró-caspase-9 para formar o apoptossomo, a pró-caspase-9 então é clivada e ativa as caspases-3 e -7 que executam a morte celular. As proteínas SMAC/DIABLO (segundo ativador mitocondrial de caspase) e a serina protease HTRA2 contribuem com o processo apoptótico pois bloqueiam a ação das proteínas inibidoras de apoptose (IAPs). Além disso, HTRA2 degrada proteínas do citoesqueleto provocando a morte da célula por via mitocondrial independente de caspase. Esta via também pode ser ativada pela ação do fator indutor de apoptose (AIF) e da endonuclease G que migram para o

núcleo, clivam o DNA e provocam a morte da célula (SUSIN et al., 2000; GALLUZZI et al., 2012).

Figura 2 - Vias de sinalização da apoptose.



Fonte: Adaptado de ICHIM; TAIT (2016).

TRAIL- ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF, FAS- fragmento estimulador de apoptose, BID- Domínio de interação com BH3 (Agonista da morte sem domínio com interação com BH3), BCL-2- Proteína do linfoma de células B2, BCL-X - Proteína 2 semelhante a BCL-2, MCL-1- Proteína de diferenciação de células de leucemia mielóide induzida Mcl-1, BAX- Proteína X associada a BCL2, MOMP- permeabilização da membrana mitocondrial externa, SMAC- Segundo Ativador Mitocondrial de Caspase, APAF-1- Fator de Ativação da Peptidase Apoptótica 1.

De modo geral, a apoptose apresenta alterações morfológicas típicas: como encolhimento celular; condensação da cromatina; fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos (KERR et al., 1972). Essas alterações são decorrentes de uma cascata complexa de sinalizações geneticamente reguladas e a desregulação promove redução neste processo, desempenhando um papel fundamental no

desenvolvimento dos tumores. Por isso, a indução da apoptose é considerada um alvo importante para o tratamento do câncer (HAJRA; LIU, 2004; WONG, 2011).

## 2.5 Ciclo celular

O ciclo celular consiste em uma sequência de eventos altamente regulados a fim de garantir a duplicação e a divisão correta do material genético entre as células filhas. Este ciclo pode ser dividido em duas etapas: a intérfase, que inclui as fases G1, S e G2; e a mitose que corresponde à divisão celular propriamente dita (NORBURY; NURSE, 1992).

As células que não estão em proliferação, apresentam-se na fase G<sub>0</sub> e esta fase pode ser transitória (quiescente) ou permanente. Células quiescentes podem entrar novamente no ciclo ao serem estimuladas por mitógenos. Assim, na fase G1 se preparam para a multiplicação; aumentam seu tamanho e produzem os constituintes celulares necessários para as novas células. Na fase S ocorre a duplicação do DNA. Em G2, a célula se prepara para a divisão celular e na mitose ocorre então a divisão do material nuclear e a citocinese, finalizando o ciclo e retornando à fase G<sub>0</sub> (ALMEIDA et al., 2005).

A transição entre as fases do ciclo celular é regulada principalmente por quinases dependente de ciclinas (CDKs), que são proteínas da família quinase serina/treonina ativadas por subunidades regulatórias denominadas ciclinas. Estas são sintetizadas e destruídas em momentos específicos do ciclo, regulando assim a atividade das quinases em cada fase (MALUMBRES; BARBACID, 2009). A atividade das CDKs pode ser induzida por fatores de crescimento e reprimidas por proteínas inibitórias do ciclo celular, chamadas de inibidoras de CDK (CKI), produzidas pela ativação dos pontos de controle do ciclo celular (OTTO; SICINSKI, 2017).

O sistema de controle regula a progressão do ciclo em momentos específicos: no final de G1 (ponto de restrição); na transição entre as fases G2/M e entre a metáfase e anáfase. Durante esses períodos denominados *checkpoints*, a célula decide se avança para a fase seguinte ou se interrompe o ciclo caso algum erro seja detectado. A parada do ciclo celular permite que as células reparem eventuais defeitos evitando a propagação dos danos para as células filhas. Caso o erro não

seja reparado, a célula pode entrar em senescência ou sofrer apoptose (LUKAS et al, 2004; MALUMBRES; BARBACID, 2009).

No ponto de restrição a parada do ciclo celular é dependente do gene supressor tumoral p53, que estimula a transcrição de diferentes genes como o p21, responsável por inibição das CDKs. A inativação de genes supressores tumorais como o p53 em células neoplásicas altera a função das proteínas que controlam o ciclo celular, levando a proliferação descontrolada e ao acúmulo de alterações genéticas que contribuem para a progressão tumoral e a aquisição de fenótipos mais agressivos (VERMEULEN et al., 2003).

Importantes classes de quimioterápicos antineoplásicos atuam durante o ciclo celular. Estes apresentam vários mecanismos de ação e exibem especificidades em termos das fases do ciclo em que tem atividade, sendo denominados ciclo-celular específicos (CCS). Um segundo grupo de agentes, denominados fármacos ciclo-celular não específicos (CCNS), tem a capacidade de atuar nas células tumorais independente de estarem no ciclo ou de estarem em repouso na fase G<sub>0</sub> (ALMEIDA et al., 2005)

## **2.6 Microtúbulos e agentes antitubulínicos**

Os microtúbulos são estruturas formadas pela polimerização de dímeros de alfa e beta tubulina. Encontrados em todas as células eucarióticas compõem o citoesqueleto, o fuso mitótico, os centríolos, os cílios e flagelos. Assim são essenciais para manutenção da estrutura celular, segregação cromossômica, distribuição das organelas e motilidade celular (DOWNING; NOGALES, 1998; VERHEY; GAERTIG, 2007)

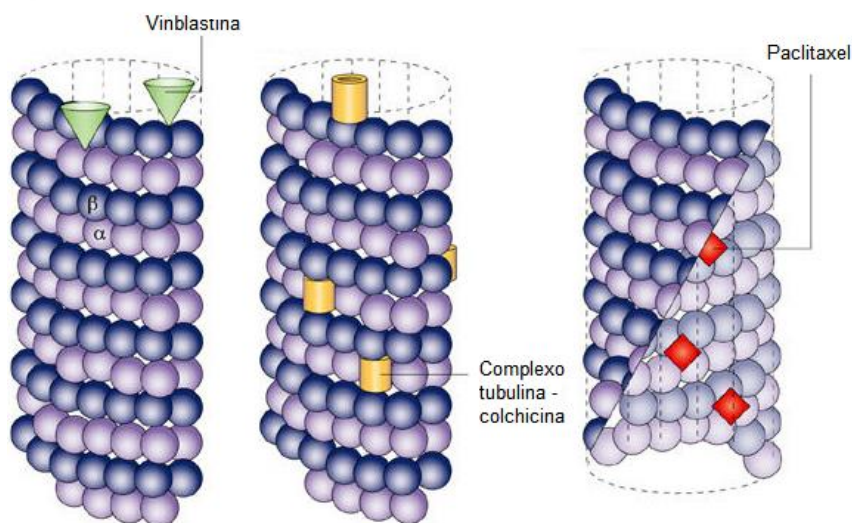
Diversas funções atribuídas aos microtúbulos ocorrem devido à dinâmica de polimerização e despolimerização da tubulina. Esse mecanismo promove o alongamento e encurtamento dos microtúbulos e é fundamental, por exemplo, para a separação correta dos cromossomos durante a formação do fuso mitótico. Essa relevante atividade na divisão celular, torna os microtúbulos um alvo importante para terapia do câncer (DESAI; MITCHISON, 1997; TANAKA, 2010).

Vários agentes antitumorais são capazes de interagir com a tubulina, e alterar a dinâmica dos microtúbulos. Esses agentes podem ser classificados de acordo com



o mecanismo de ação em estabilizadores ou desestabilizadores dos microtúbulos, que, respectivamente, inibem a despolimerização ou a polimerização da tubulina. A interação com essa proteína pode ocorrer principalmente por 3 sítios de ligação; o local do paclitaxel, o sítio de ligação da colchicina e o domínio da vinca (Figura 3) (JORDAN; WILSON, 2004).

Figura 3 - Sítios de ligação de drogas antimitóticas aos microtúbulos.



Fonte: Adaptado de JORDAN; WILSON (2004).

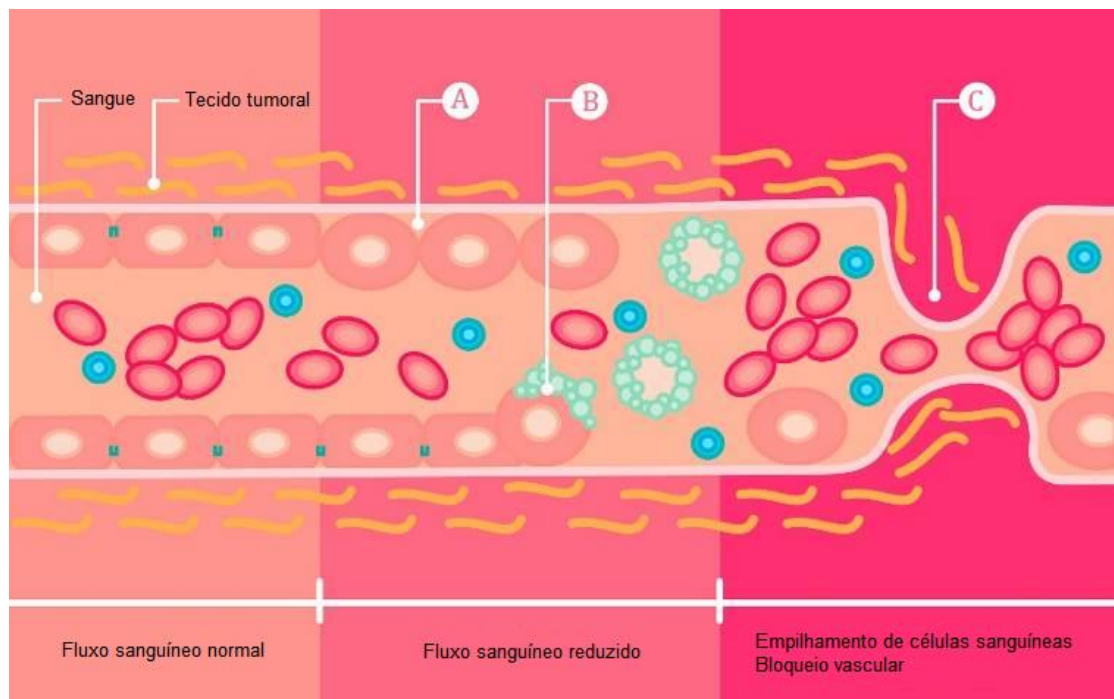
Os antitubulínicos, como os taxanos e alcalóides da vinca são amplamente utilizados no tratamento do câncer, embora muitas vezes bem-sucedidos, são susceptíveis a mecanismos de resistência como a ação da glicoproteína-P. A colchicina, outro agente antimitótico conhecido, apesar de forte atividade citostática, não é utilizado na quimioterapia porque apresenta elevada toxicidade (ZHOU; GIANNAKAKOU, 2005). Assim, faz-se necessário a busca de agentes capazes de interagir com os microtúbulos, mas que atuem também contra células resistentes e que apresentem boa seletividade, como é o caso das combretastatinas.

Nos últimos anos, estudos estão sendo direcionados para avaliar a atividade da combretastatina e seus análogos. A combretastatina A-4 é um potente inibidor da polimerização da tubulina e atua inclusive em tumores resistentes. Ela é isolada da casca da árvore africana *Combretum caffrum*, possui estrutura simples, baixa massa

molecular e se liga no mesmo sítio da colchicina (MCGOWN; FOX, 1990; DARK et al., 1997). Devido à baixa solubilidade deste agente antitubulínico, foram desenvolvidos pró-fármacos solúveis como a combretastatina A-4P, que atualmente está em estudo clínico no tratamento combinado de vários tumores (RUSTIN et al., 2003; ZUO et al., 2015; GRISHAM et al., 2018)

Os agentes antitubulícos também possuem efeito sobre a função vascular, e estudos demonstram ação angiogênica (CHAPLIN et al., 1996; TOZER et al., 1999; GANGJEE et al., 2014). A combretastatina A-4P, por exemplo, ao interagir com os microtúbulos das células endoteliais dos vasos sanguíneos tumorais promove alterações na estrutura celular que levam à perda de adesão e apoptose. Assim, as células endoteliais migram para o interior do vaso, provocam redução do fluxo sanguíneo, bloqueio dos capilares e, conseqüente, morte das células tumorais (Figura 4) (JAROCH et al., 2016).

Figura 4 - Mecanismo da atividade antiangiogênica de Combretastatina A-4P



Fonte: Adaptado de JAROCH, et al., (2016).

A- Alterações no citoesqueleto afetam a morfologia celular e diminuem a adesão célula-célula. B - CA4P induz a apoptose em células endoteliais. C - Fluxo reduzido, comprometimento das células endoteliais e alta pressão do líquido intersticial provocam o colapso dos vasos.

A ação desse agente preferencialmente frente às células endoteliais dos vasos tumorais ocorre, possivelmente, porque as células endoteliais maduras possuem fibras de actina como principal componente do citoesqueleto, enquanto as células imaturas dos vasos tumorais possuem os microtúbulos como principais componentes. Além disso, o fluxo sanguíneo mais lento dos vasos tumorais, torna-os mais susceptíveis à ação desses compostos (JORDAN; WILSON, 2004; JAROCH et al., 2016)

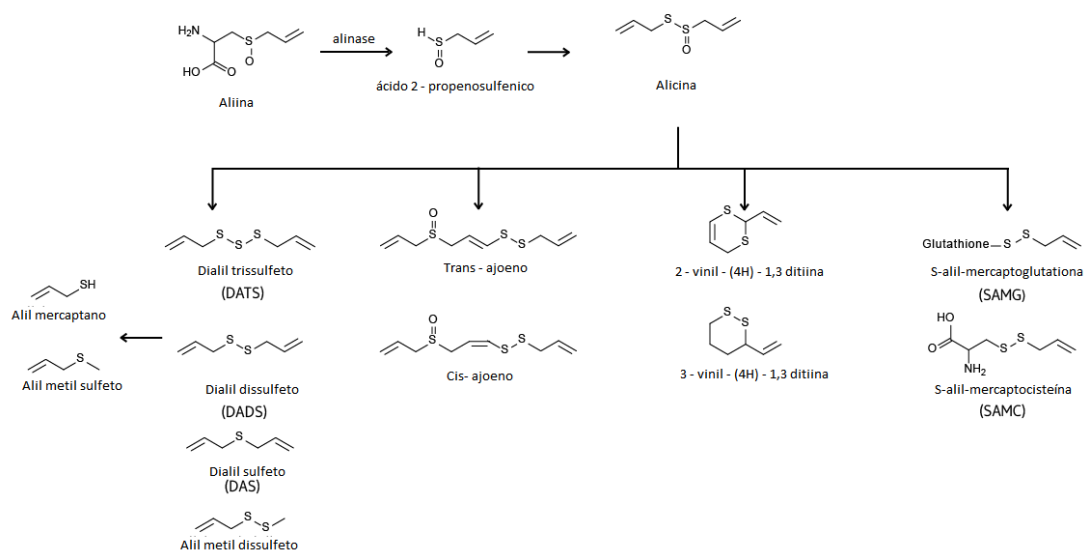
## **2.7 Compostos organossulfurados**

O enxofre é um elemento essencial em diversas funções fisiológicas, compõe a estrutura de aminoácidos, como metionina, cisteína e cistina; vitaminas e enzimas, e devido suas propriedades pode ser empregado em diversos tratamentos terapêuticos (JACOB et al., 2003). Produtos naturais contendo enxofre em sua estrutura são biologicamente ativos. Por exemplo, as diversas atividades atribuídas ao alho (*allium sativum*) se devem, principalmente, à presença de organossulfurados e inclui ação antioxidante (CHUNG, 2006), antitrombótica e anticancerígena (ARIGA; SEKI, 2006).

A ação anticâncer de compostos organossulfurados derivados do alho foi demonstrada tanto em modelos *in vitro* quanto *in vivo* (ANTOSIEWICZ; SINGH, 2004; SHULKA; KALRA, 2007). Os efeitos antiproliferativos já foram testados em linhagens celulares de câncer de próstata (GUNADHARINI et al., 2006), bexiga (LU et al., 2004) e mama (ALTONSY et al., 2012).

O alho é uma fonte rica de compostos organossulfurados. Quando é esmagado, o seu principal componente, a aliína, é convertida em alicina pela enzima aliinase. A alicina é uma molécula instável e é degradada facilmente ou se rearranja para formar produtos secundários, que incluem diversos compostos contendo enxofre (Figura 5) (LAWSON, 1998).

Figura 5- Compostos organossulfurados derivados do alho.



Fonte: Adaptado de OREGON STATE <http://lpi.oregonstate.edu/mic/food-beverages/garlic>

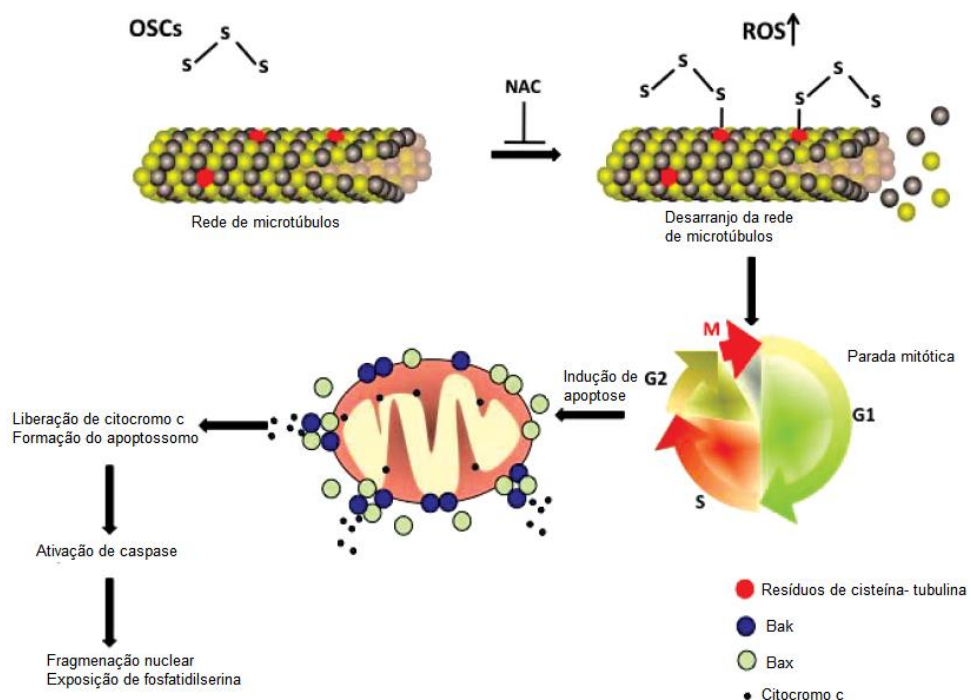
Estudos demonstram uma correlação direta entre o número de átomos de enxofre em um composto e seu potencial anticâncer (KNOWLES et al., 2000), os organossulfurados sintéticos podem oferecer uma oportunidade para o desenvolvimento de novos fármacos (SMITH et al., 2016). A atividade antiproliferativa desses compostos, já foi relatada, por exemplo, em células de câncer de mama triplo resistente, pulmão (GAO et al., 2011), esôfago (SMITH et al., 2016) e pâncreas (SAINI et al., 2017) e além da atividade antiproliferativa o baixo perfil citotóxico para células não tumorais, torna esses compostos candidatos promissores no tratamento do câncer. Destaca-se ainda, a modificação estrutural destas moléculas que pode contribuir ainda mais para induzir a apoptose de maneira seletiva em células tumorais (GRIFFITHS et al., 2005).

Embora os compostos organossulfurados tenham diferentes grupos funcionais contendo enxofre, eles compartilham características antiproliferativas comuns. São capazes de inibir o crescimento das células tumorais, induzir a parada do ciclo celular em G2/M, aumentar os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e induzir apoptose, por meio da via intrínseca (SMITH et al., 2016). Alguns organossulfurados também foram capazes inibir a ação topoisomerase II $\alpha$  e assim causar danos no DNA (WANG et al., 2001). Santos et al. (2013) demonstrou

compostos sintéticos de enxofre como potentes agentes antitubulínicos, indicando assim mais um possível mecanismo de ação.

Os dados na literatura indicam que compostos organossulfurados derivados do alho também possuem atividade antitubulínica. Os átomos de enxofre presentes nestes compostos reagem com grupos tiol intracelulares da tubulina inibindo assim sua polimerização. Essa reação favorece o aumento na concentração de ROS que fortalece ainda mais a ligação destes compostos com a tubulina provocando desordens na rede de microtúbulos, induzindo parada do ciclo celular em G2/M e, conseqüentemente, morte por apoptose (Figura 6) (XIAO et al., 2005; CERELLA et al., 2011).

Figura 6 - Mecanismos anticancerígenos de organossulfurados derivados do alho



Fonte: Adaptado de CERELLA et al., (2011).

OSCs- Compostos organossulfurados, NAC- N-acetil-cisteína, ROS- Espécies reativas de oxigênio

Smith et al. (2016) demonstraram que dissulfetos e tiosulfonatos relacionados ao alho, podem reagir com GSH e aumentar o nível de ROS em células WHCO1 (câncer de esôfago). No entanto, concluíram que a principal causa da citotoxicidade destes compostos é a tioação celular e a geração de ROS desempenha apenas um papel secundário.

As espécies reativas de oxigênio interferem com diversos constituintes celulares como os ácidos nucleicos e podem causar danos no DNA. Desta forma, o equilíbrio intracelular entre espécies oxidantes e redutoras é importante para evitar o stress oxidativo e assim manter a integridade do material genético (CIRCU; AW., 2010). As células tumorais possuem uma maior atividade metabólica e consequentemente uma maior concentração de ROS no espaço intracelular, essa diferença pode ser importante para alcançar a seletividade do tratamento quimioterápico, pois as células cancerígenas apesar de sobreviverem a níveis mais elevados de ROS, a tolerância contra alterações acima de um certo limite pode ser inferior à das células saudáveis (TRACHOOTHAM et al., 2009).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito antiproliferativa *in vitro* de compostos organossulfurados em linhagens de células tumorais e em uma linhagem não tumoral.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Avaliar o potencial antiproliferativo de nove compostos organossulfurados nas linhagens celulares neoplásicas B16-F10, PC-03, MCF-7, 786-0, HT-29, MDA-MB-231, HEPG2, NCI/ADR-RES;

Avaliar a citotoxicidade dos nove compostos organossulfurados em uma linhagem de células não tumorais (NIH/3T3) e determinar o índice seletividade dos mesmos;

Avaliar a indução de morte celular por análise morfológica das células tratadas com o composto mais ativo;

Investigar a participação do composto mais ativo na via das caspases por meio da quantificação de caspase-3;

Verificar o efeito do composto mais ativo na progressão do ciclo celular.

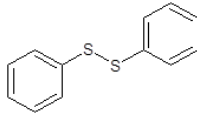
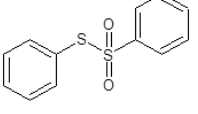
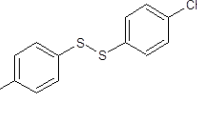
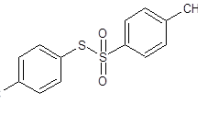
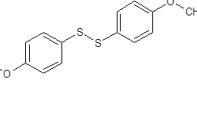
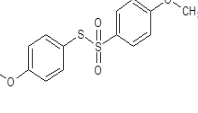
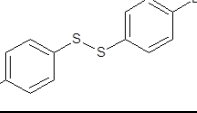
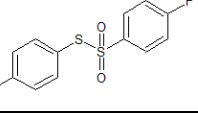
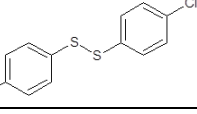
## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção dos compostos

Os compostos organossulfurados testados no presente estudo (Figura 7) foram sintetizados, purificados e identificados pelas alunas de mestrado Ingrid Duarte Pereira e de doutorado Rejane Gonçalves, orientadas pelo professor Edson dos Anjos, do grupo de pesquisa SINTMOLB do Laboratório de Pesquisa 4 (LP4) do Instituto de Química (INQUI) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

A síntese dos compostos consistiu basicamente no acoplamento de tióis para obtenção de diarildissulfetos (1, 2, 3, 4, 5) e posterior oxidação para a obtenção dos diariltiosulfonatos (6, 7, 8 e 9) (PEREIRA, 2017).

Figura 7 - Estrutura química e nomenclatura dos diarildissulfetos (compostos 1, 2, 3, 4 e 5) e diariltiosulfonatos (compostos 6, 7, 8 e 9).

Compostos organossulfurados			
Diarildissulfetos		Diariltiosulfonatos	
Estrutura química	Nomenclatura	Estrutura química	Nomenclatura
<b>1</b> 	difenildissulfeto	<b>6</b> 	S-fenilbenzenossulfonotioato
<b>2</b> 	bis(4-metilfenil) dissulfeto	<b>7</b> 	S-(4-metilfenil)-4-metilbenzenossulfonotioato
<b>3</b> 	bis(4-metoxifenil) dissulfeto	<b>8</b> 	S-(4-metoxifenil) 4-metoxibenzenossulfonotioato
<b>4</b> 	bis(4-bromofenil) dissulfeto	<b>9</b> 	S-(4-fluorofenil)-4-fluorobenzenossulfonotioato
<b>5</b> 	bis(4-clorofenil) dissulfeto		



## 4.2 Linhagens celulares

Para avaliar a atividade antiproliferativa e o índice de seletividade (IS) dos compostos foram utilizadas 8 linhagens de células tumorais: MCF-7 (ATCC-HTB-22, mama); 786-0 (ATCC-CRL-1932, rim); NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplas drogas); PC-03 (ATCC-CRL-1435, próstata); HEPG2 (ATCC-HB-8065, fígado); HT-29 (ATCC-HTB-38, colorretal); MDA-MB-231 (ATCC HTB-26 mama triplo negativo); B16-F10 (ATCC CRL-6322 melanoma murino) e uma linhagem de células não tumorais, NIH/3T3 (ATCC CRL-1658 fibroblasto murino).

As células foram doadas pelos Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho – UNICAMP e Prof. Dr. Auro Nomizo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Todas as linhagens são criopreservadas em nitrogênio líquido.

## 4.3 Cultivo de células

As células utilizadas nos experimentos foram descongeladas e cultivadas em frascos estéreis de 25 cm<sup>2</sup> contendo meio de cultura RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) ou DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) - Sigma Aldrich®, ambos com 1% de antibiótico (estreptomicina (100 µg/mL) e penicilina (100 IU/mL) - Sigma Aldrich® e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) - Invitrogen® e foram mantidas a 37°C, em atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>.

Após a formação da monocamada com 80% de confluência e no intuito de obter a densidade celular adequada para os ensaios, foi realizado o repique. Para este procedimento, o meio de cultura foi aspirado e adicionou-se ao frasco 1mL de tripsina-EDTA (0,25% + EDTA 1mM) e este foi incubado a 37°C por 2-5 minutos para o desprendimento total das células. A fim de neutralizar a tripsina, a suspensão de células foi transferida para um tubo cônico contendo meio completo (com soro fetal bovino) em quantidade 3x maior que o volume de tripsina utilizado. Este tubo foi então centrifugado por 4 minutos a 1000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuscitado em meio completo e transferido para um frasco maior possibilitando a expansão. Este procedimento foi repetido até a obtenção do

número adequado de células para o plaqueamento. A contagem das células viáveis foi realizada em Câmara de Neubauer com o corante *Trypan Blue*®.

#### **4.4 Ensaio de screening de atividade antiproliferativa**

##### **4.4.1 Teste de citotoxicidade**

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados com o corante sulforrodamina B (SRB) com adaptações do protocolo descrito Skehan et al. (1990). Este corante se liga aos resíduos básicos dos aminoácidos das proteínas celulares e assim por espectrofotometria é possível quantificar o crescimento celular. Neste ensaio, a densidade celular no tempo zero (T0- momento em que os compostos foram adicionados) foi determinada para possibilitar o cálculo da GI<sub>50</sub> (concentração que inibe 50% do crescimento celular), TGI (concentração que inibe totalmente o crescimento celular) e LC<sub>50</sub> (concentração letal média) (MONKS et al., 1991).

No primeiro dia de experimento, as suspensões celulares com densidade pré-estabelecida para cada linhagem (5000-7500 células por poço) foram preparadas com meio completo, semeadas nas placas-teste e na placa T0 (100uL/ poço) e em seguida, foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>.

Após este período foi feita a leitura da placa T0 e as amostras inicialmente dissolvidas em dimeltissulfóxido (DMSO) na concentração de 0,1g/mL foram novamente diluídas em meio de cultura e adicionadas nas placas-teste em triplicata de quatro concentrações (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/ mL) sendo incubadas por mais 48 horas a 37°C em atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>. Como controle positivo, utilizou-se o quimioterápico doxorubicina (Fauldoxo®/LIBBS) nas concentrações de 0,025; 0,25; 2,5 e 25 µg/mL. As amostras não foram adicionadas na placa T0, sendo assim, os valores da leitura desta placa indicaram o quanto as células cresceram desde o plaqueamento até o momento da adição das amostras nas placas-teste.

Após 48 horas de tratamento, foi realizado a leitura das placas-teste por meio do ensaio colorimétrico com a sulforrodamina B (SRB). Para este ensaio, o sobrenadante dos poços foi aspirado e as células aderidas foram fixadas com 100µL/poço de ácido tricloroacético (TCA) 20% por 30 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as placas foram lavadas 5x em água corrente e secas

para a adição de 50µL/poço de SRB 0,1% diluído em ácido acético 1%. Após 30 minutos em temperatura ambiente, para remover o excesso de corante, as placas foram lavadas com ácido acético 1% e após a secagem, o corante ligado as proteínas celulares foi solubilizado com 100µL/poço de Trizma Base (10mM, pH 10,5) (Sigma, USA). A leitura foi realizada a 540 nm no leitor de microplacas Molecular Devices®, modelo SpectraMax 190 e foram obtidos os valores de absorbância das células tratadas (T), das células não tratadas / controle negativo (CN), do branco (amostras em meio de cultura) e do tempo zero (T0).

As médias das absorbâncias foram calculadas descontando os valores dos seus respectivos brancos, e a porcentagem de crescimento de cada composto foi calculada em software-SoftMax Pro 6.3, utilizando-se as fórmulas de Monks et al. (1991). Considerando-se que: Se  $T > CN$ , o composto estimulou o crescimento; Se  $T \geq T0$  e  $< CN$ , o composto apresentou efeito citostático e a fórmula utilizada para determinar a porcentagem de crescimento foi:  $100 \times [(T-T0)/(CN-T0)]$ ; Se  $T < T0$  o composto apresentou efeito citocida e a porcentagem de crescimento foi calculada pela fórmula:  $100 \times [(T-T0)/(T0)]$ .

Esses resultados foram expressos em curva de crescimento celular em função da concentração do composto testado e por análise de regressão não linear em programa para gráficos e análises de dados (Origin Versão 6.0). Foram determinados os valores de  $GI_{50}$ , TGI e  $LC_{50}$ , em µg/mL, e os valores correspondentes em µM foram calculados a partir da massa molecular de cada composto.

Este ensaio foi realizado em três experimentos independentes e os resultados expressos em molaridade, foram utilizados para classificar os compostos em ativos ( $GI_{50} < 10\mu M$ ), inativos ( $GI_{50} > 100\mu M$ ), ou com atividade moderada ( $GI_{50}$  entre 10 e  $100\mu M$ ) (SILVA et al., 2015).

#### **4.4.2 Índice de seletividade**

A partir dos resultados de  $GI_{50}$  foram obtidos os valores do índice de seletividade (IS), que corresponde à divisão do valor da  $GI_{50}$  de cada composto

frente a linhagem de células não tumorais pelo valor da  $GI_{50}$  da linhagem de células tumorais ( $GI_{50}$  NIH/3T3 /  $GI_{50}$  células tumorais).

Foi considerado significativo um valor de IS maior ou igual a 2,0 (SUFFNESS; PEZZUTO, 1991), ou seja, quando o composto for pelo menos duas vezes mais ativo na linhagem de células tumorais do que em células não tumorais, portanto  $IS \geq 2,0$ .

#### **4.5 Estudo do mecanismo de ação antiproliferativo em células 786-0**

##### **4.5.1 Teste de citotoxicidade em três tempos de tratamento**

O composto mais ativo foi submetido novamente ao teste de citotoxicidade na linhagem 786-0 nas 4 concentrações já testadas. Porém, em três tempos de tratamento (12, 24 e 48 horas). Esta metodologia foi utilizada para identificar o momento e a concentração em que o composto apresenta atividade antiproliferativa relevante.

O gráfico apresentado relaciona o crescimento celular (eixo y) em função da concentração do composto testado (eixo x), valores entre 0 e 100% indicam proliferação celular, sendo que a linha 0, representa a quantidade de células do momento de adição das amostras (placa T0), e o ponto em que a curva cruza esta linha corresponde a concentração que inibe 100% do crescimento celular. Os valores negativos representam morte celular, assim concentrações abaixo da linha 0 indicam morte celular (MONKS et al., 1991).

##### **4.5.2 Ensaio de morte celular**

A morte celular foi avaliada por análise morfológica após o ensaio de coloração diferencial com brometo de etídeo e laranja de acridina. Este método foi realizado seguindo o protocolo descrito por McGahon et al. (1995), e permitiu a identificação de células viáveis e em processo de morte por necrose e apoptose.

O corante laranja de acridina atravessa a membrana celular e intercala-se com o DNA emitindo fluorescência verde, já o brometo de etídio é incorporado apenas por células com perda de integridade da membrana e ao intercalar-se ao material genético emite fluorescência laranja. Células viáveis apresentam membrana intacta e núcleo uniformemente corados em verde, células em processo apoptótico devido a condensação e fragmentação da cromatina apresentam manchas verdes brilhantes no núcleo e formação de corpos apoptóticos, e células necróticas incorporam o brometo de etídeo e possuem núcleo corados em laranja.

Para este ensaio, células da linhagem 786-0 foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de  $7,5 \times 10^4$  células/ml (100  $\mu$ L/poço) e incubadas por 24h. Após este período, o composto considerado o mais ativo nesta linhagem, foi adicionada às células em triplicada das quatro concentrações utilizadas no teste de citotoxicidade e a análise morfológica foi realizada em dois tempos de tratamento com 24 e 48 horas.

Após cada período de tratamento estabelecido, as células foram coletadas por tripsinização, centrifugadas a 1.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 25 $\mu$ L de PBS (tampão fosfato salino). As lâminas foram preparadas com a suspensão celular e 1 $\mu$ L de corante contendo brometo de etídio (100 $\mu$ g/ml) e laranja de acridina (100 $\mu$ g/ml), na proporção de 1:1. Foram realizados três experimentos independentes, sendo analisadas 100 células por tratamento em microscópio de fluorescência (Olympus BX41) em aumento de 400x.

#### **4.5.3 Ensaio de caspase-3 por citometria de fluxo**

O ensaio foi realizado utilizando-se o anticorpo PE *Rabbit Anti-Active Caspase-3* (BD Pharmingen). Este anticorpo se liga covalentemente e irreversivelmente ao sítio ativo dessa caspase emitindo sinal de fluorescência detectado pelo canal FL-2.

Inicialmente,  $4 \times 10^5$  células da linhagem 786-0 foram semeadas em placas de 6 poços e incubadas a 37° C em atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Após este período, as células foram tratadas com o composto mais ativo nas concentrações próximas aos valores obtidos de GI<sub>50</sub>, TGI e LC<sub>50</sub> por 24 e 48 horas.

Após cada tempo de tratamento as células foram coletadas, transferidas para microtubos de 2,0 mL e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células, por centrifugação, foram lavadas duas vezes com PBS gelado. Seguindo as instruções do fabricante e após a centrifugação e descarte do sobrenadante, o *pellet* de células foi ressuspenso em 300  $\mu$ L de BD *Cytofix/Cytoperm* e mantido em gelo por 20 minutos. Após essa etapa de fixação e permeabilização, os microtubos foram centrifugados o sobrenadante descartado e as células lavadas duas vezes com BD *Perm/Wash*. Posteriormente, adicionou-se em cada microtubo 40  $\mu$ L do tampão BD *Perm/Wash* e 10  $\mu$ L do anticorpo *Rabbit Anti-Active Caspase-3*. Os microtubos foram mantidos no gelo e no escuro por 30 minutos. Em seguida, as células foram centrifugadas, lavadas uma vez com BD *Perm/Wash* e levadas para a leitura em citometro de fluxo BD Accuri™ C6 (BD Bioscience). Foram adquiridos 10.000 eventos e o teste realizado em triplicata.

#### 4.5.4 Ciclo celular

O ciclo celular foi avaliado por citometria de fluxo utilizando o reagente 7-amino-actinomicina D (7-AAD) *Viability Staining Solution* (Biolegend). Este reagente é intercalante de DNA e emite fluorescência proporcional a quantidade de DNA presente na célula. Assim por citometria de fluxo é possível determinar as diferentes fases do ciclo celular por meio do seu conteúdo de DNA, já que células em fase G2/M apresentam o dobro de DNA e, portanto, o dobro de fluorescência do que células em fase G0/G1, enquanto células em fase S emitem fluorescência intermediária.

Para este ensaio foram semeadas  $4 \times 10^5$  células da linhagem 786-0 em placas de 6 poços, após 24 e 48 horas de tratamento com o composto mais nas concentrações de GI<sub>50</sub>, TGI e LC<sub>50</sub>, as células foram coletadas, transferidas para microtubos de 2,0 mL e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram centrifugadas duas vezes com PBS gelado, em seguida, o PBS foi descartado e as células foram fixadas com 1 mL de etanol 70% mantidas a 4 °C por pelo menos 30 minutos. Após o período de fixação os microcubos foram centrifugados a 1000 rpm por 5 minutos, o etanol foi descartado e as células, por centrifugação foram lavadas duas vezes com PBS gelado e em cada

microtubo foram adicionados 45  $\mu$ L da solução para lise de membrana (0,1% Triton X-100, 0,1 mM EDTA e 50  $\mu$ g/ml de RNase em PBS) e 5  $\mu$ L de 7-AAD. Os microtubos foram mantidos no gelo e no escuro por 30 minutos e, em seguida, foram adicionados 300  $\mu$ L de PBS e a leitura foi realizada no citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 (BD Bioscience) por meio do canal FL-3. Foram adquiridos 10.000 eventos e o teste foi realizado em triplicata.

#### **4.6 Análise Estatística**

A porcentagem de crescimento celular obtida segundo Monks et al. (1991) foi utilizada na elaboração de gráficos por análise de regressão não linear para obtenção da GI<sub>50</sub>, TGI e LC<sub>50</sub> em programa de análise de dados Origin 6.0.

Os resultados dos testes de morfologia, caspase-3 e ciclo celular foram analisados no *software* Graph Pad InStat 3.0. Para verificar a diferença estatística entre os tratamentos e o controle negativo do mesmo tempo experimental no teste de ciclo celular foi utilizado ANOVA/Dunnet. As diferenças estatísticas entre os tratamentos do mesmo tempo experimental nos testes de morfologia e caspase-3 foram determinadas utilizando o teste ANOVA de uma via com pós teste de *Tukey* e para análise do mesmo tratamento nos dois tempos experimentais, foi utilizado o teste *t* Student.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 *Screening* de atividade antiproliferativa

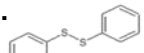
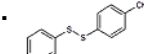
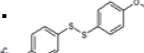
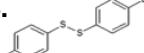
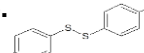
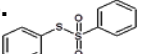
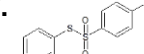
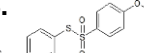
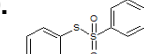
A Tabela 1 apresenta os valores de  $GI_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$  e  $\mu\text{M}$ ) dos compostos organossulfurados testados nas linhagens celulares; B16-F10, PC-3, HT-29, 786-0, MCF-7, MDA-MB-231, NCI/ADR-RES, HEPG2 e NIH/3T3, expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) obtidos por meio do teste de citotoxicidade em três experimentos independentes.

Todos os organossulfurados testados apresentaram atividade moderada ( $GI_{50}$  entre 10 e  $100\mu\text{M}$ ) em pelo menos duas linhagens de células tumorais. O composto 8 apresentou o melhor potencial antiproliferativo, com os menores valores de  $GI_{50}$  apresentados frente as linhagens NCI/ADR-RES, 786-0 e MDA-MB-231, sendo que foi mais ativo ( $GI_{50} < 10 \mu\text{M}$ ) frente as linhagens NCI/ADR-RES e 786-0 com valores de  $GI_{50}$  respectivamente de 7,43 e  $9,08 \mu\text{M}$ .

O Índice de Seletividade (IS) dos compostos para cada linhagem está apresentado na Tabela 2. Os compostos 3 e 6 apresentaram seletividade significativa ( $IS \geq 2$ ) em todas as linhagens neoplásicas testadas. Os maiores valores foram apresentados pelo composto 3 nas linhagens B16-F10 ( $IS= 9$ ), 786-0 ( $IS= 10,2$ ), HEPG2 ( $IS= 9,58$ ), pelo composto 8 nas linhagens 786-0 ( $IS=6,87$ ), NCI/ADR-RES ( $IS= 8,39$ ), pelo composto 9 na linhagem B16-F10 ( $IS= 7,75$ ) e pelo composto 6 na linhagem NCI/ADR-RES ( $IS= 7,52$ ).



Tabela 1 - Valores de GI<sub>50</sub> em µg/mL e µM expressos em média ± SEM dos compostos organossulfurados testados em linhagens de células tumorais e em uma linhagem não tumoral.

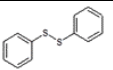
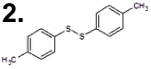
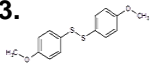
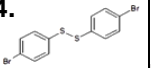
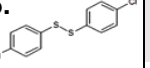
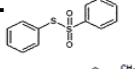
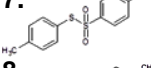
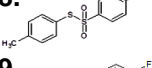
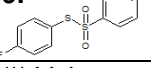
Compostos	Linhagens celulares									
		B16-F10	PC-3	HT-29	786-0	MCF-7	MDA-MB-231	NCI/ADR-RES	HEPG2	NIH/3T3
<b>1.</b> 	µg/mL	21,81 ± 1,54	24,11 ± 0,74	23,76 ± 0,12	24,34 ± 0,12	23,03 ± 0,45	13,51 ± 6,15	6,27 ± 0,60	14,6 ± 6,23	12,13 ± 2,12
	µM	100,06 ± 7,08	110,56 ± 3,40	109,05 ± 0,54	111,62 ± 0,52	105,63 ± 2,04	61,97 ± 28,20	28,74 ± 2,77	66,94 ± 28,58	55,64 ± 9,75
<b>2.</b> 	µg/mL	24,92 ± 0,02	27,64 ± 1,60	41,5 ± 12,25	35,925 ± 0,71	21,97 ± 0,69	25,25 ± 0,70	15,06 ± 0,05	11,41 ± 4,74	31,74 ± 4,59
	µM	101,28 ± 0,07	112,32 ± 6,51	168,66 ± 49,79	146 ± 2,90	89,29 ± 2,79	102,6 ± 2,83	61,21 ± 0,19	46,35 ± 19,25	128,98 ± 18,64
<b>3.</b> 	µg/mL	5,76 ± 1,40	19,4 ± 1,21	47,73 ± 18,32	5,08 ± 0,70	25,62 ± 0,48	23,98 ± 1,16	24,94 ± 0,26	5,41 ± 1,44	51,83 ± 9,89
	µM	20,72 ± 5,03	69,77 ± 4,36	171,66 ± 12,30	18,25 ± 2,50	89,19 ± 1,70	86,23 ± 4,16	89,68 ± 0,92	19,44 ± 5,18	220,27 ± 35,56
<b>4.</b> 	µg/mL	19,73 ± 2,94	24,66 ± 0,05	24,50 ± 0,36	20,88 ± 0,71	22,13 ± 0,24	30,46 ± 1,63	13,37 ± 0,43	18,67 ± 0,77	48,25 ± 8,56
	µM	52,44 ± 7,81	65,55 ± 0,13	65,12 ± 0,94	55,5 ± 1,88	58,84 ± 0,63	80,98 ± 4,34	35,55 ± 1,13	49,64 ± 2,06	128,28 ± 22,81
<b>5.</b> 	µg/mL	5,12 ± 1,57	25,31 ± 0,22	22,26 ± 1,63	24,05 ± 0,09	23,80 ± 0,97	35,23 ± 16,20	4,89 ± 0,16	22,17 ± 1,54	5,17 ± 1,98
	µM	17,81 ± 5,46	88,12 ± 0,76	77,52 ± 5,66	83,73 ± 0,30	82,84 ± 3,37	122,64 ± 56,41	17,01 ± 0,57	77,19 ± 5,37	17,98 ± 6,88
<b>6.</b> 	µg/mL	23,83 ± 0,82	27,37 ± 0,5	40,09 ± 7,54	31,94 ± 3,13	28,5 ± 1,54	31,52 ± 0,57	11,33 ± 1,81	25,10 ± 0,17	85,24 ± 2,55
	µM	95,29 ± 3,29	109,45 ± 2,11	160,33 ± 30,17	127,73 ± 12,50	113,99 ± 6,14	126,07 ± 2,29	45,32 ± 7,23	100,38 ± 0,68	340,92 ± 10,20
<b>7.</b> 	µg/mL	22,96 ± 0,06	24,98 ± 0,04	31,87 ± 4,31	27,50 ± 0,42	26,99 ± 1,56	48,20 ± 10,86	15,96 ± 5,21	7,56 ± 0,58	17,00 ± 2,00
	µM	82,57 ± 0,23	89,84 ± 0,15	114,62 ± 15,49	98,89 ± 1,53	97,09 ± 5,60	173,34 ± 39,05	57,38 ± 18,74	27,19 ± 2,10	61,14 ± 7,21
<b>8.</b> 	µg/mL	8,87 ± 0,09	23,94 ± 0,16	26,81 ± 3,63	2,82 ± 0,07	17,29 ± 0,35	5,55 ± 1,58	2,31 ± 0,34	7,79 ± 0,06	19,38 ± 0,16
	µM	28,59 ± 0,29	77,22 ± 0,50	86,47 ± 11,71	9,08 ± 0,23*	55,77 ± 1,12	17,89 ± 5,09	7,43 ± 1,11*	25,13 ± 0,19	62,53 ± 0,51
<b>9.</b> 	µg/mL	7,64 ± 0,51	28,46 ± 0,60	31,44 ± 4,82	26,69 ± 1,02	10,41 ± 1,23	53,82 ± 14,62	23,13 ± 3,77	13,07 ± 2,80	59,19 ± 4,16
	µM	26,67 ± 1,76	99,4 ± 2,10	109,81 ± 16,84	93,2 ± 3,56	36,36 ± 4,30	187,96 ± 51,05	80,77 ± 13,18	45,63 ± 9,80	206,72 ±
<b>Doxorrubicina</b>	µg/mL	0,06 ± 0,03	0,26 ± 0,02	0,25 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,25 ± 0,02	0,16 ± 0,07	0,08 ± 0,03	0,75 ± 0,01
	µM	0,10 ± 0,06	0,47 ± 0,04	0,46 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,45 ± 0,04	0,30 ± 0,13	0,16 ± 0,06	1,42 ± 0,05

\*Valores de GI<sub>50</sub> < 10 µM.

Linhagens celulares: B16-F10 (melanoma murino), PC-3 (adenocarcinoma de próstata), HT-29 (adenocarcinoma colorretal), 786-0 (adenocarcinoma de células renais), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), MDA-MB-231 (mama triplo resistente), NCI/ADR-RES (câncer de ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), HEPG2 (carcinoma hepatocelular) e NIH/3T3 (fibroblasto murino).

Compostos testados: **1.** difenildissulfeto, **2.** bis (4-metilfenil) dissulfeto, **3.** bis (4-metoxifenil) dissulfeto, **4.** bis(4-bromofenil) dissulfeto, **5.** bis(4-clorofenil) dissulfeto, **6.** S-fenilbenzenossulfonotioato, **7.** S-(4-metilfenil)-4-metilbenzenossulfonotioato, **8.** S-(4-metoxifenil) 4-metoxibenzenossulfonotioato, **9.** S-(4-fluorofenil)-4-fluorobenzenossulfonotioato.

Tabela 2 - Índice de Seletividade (IS) dos compostos organossulfurados.

Compostos	Linhas celulares							
	B16-F10	PC-3	HT-29	786-0	MCF-7	MDA-MB-231	NCI/ADR-RES	HEPG2
1. 	-	-	-	-	-	-	1,94	-
2. 	1,27	1,15	-	-	1,44	1,26	2,11*	2,78*
3. 	9,00*	2,67*	2,36*	10,20*	2,02*	2,16*	2,08*	9,58*
4. 	2,45*	1,96	1,97	2,31*	2,18*	1,58	3,61*	2,58*
5. 	1,01	-	-	-	-	-	-	-
6. 	3,58*	3,11*	2,13*	2,67*	3,00*	2,70*	7,52*	3,4*
7. 	-	-	-	-	-	-	1,07	2,25*
8. 	2,19*	-	-	6,88*	1,12	3,49*	8,39*	2,49*
9. 	7,75*	2,08*	1,88	2,22*	5,69*	1,1	2,56*	4,53*

(\*) Valores  $\geq 2,0$ : IS significativo; entre 1 – 2: não significativo; (-): não apresentaram seletividade.

Linhas celulares: B16-F10 (melanoma murino), PC-3 (adenocarcinoma de próstata), HT-29 (adenocarcinoma colorretal), 786-0 (adenocarcinoma de células renais), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), MDA-MB-231 (mama triplo resistente), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), HEPG2 (carcinoma hepatocelular), NIH/3T3 (fibroblasto murino).

Compostos testados: 1. difenildissulfeto, 2. bis (4-metilfenil) dissulfeto, 3. bis (4-metoxifenil) dissulfeto, 4. bis(4-bromofenil) dissulfeto, 5. bis(4-clorofenil) dissulfeto, 6. S-fenilbenzenossulfonotioato, 7. S-(4-metilfenil)-4-metilbenzenossulfonotioato, 8. S-(4-metoxifenil) 4-metoxibenzenossulfonotioato 9. S-(4-fluorofenil)-4-fluorobenzenossulfonotioato.

Com base nos valores de  $GI_{50}$  apresentados pelo composto 8 e por apresentar seletividade significativa em células 786-0, esta linhagem foi escolhida para os demais testes.

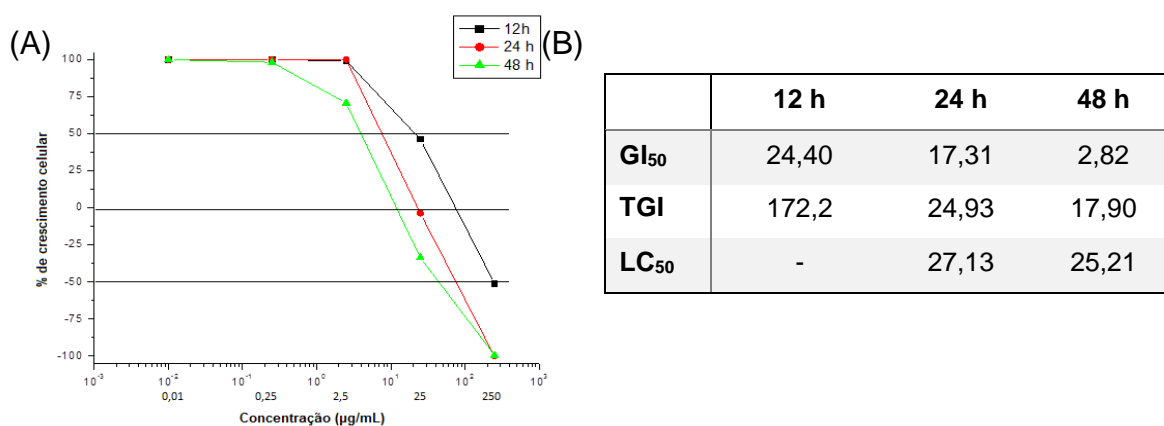
## 5.2 Estudo do mecanismo de ação antiproliferativo em células 786-0

### 5.2.1 Teste de citotoxicidade em três tempos de tratamento

A Figura 8A apresenta a porcentagem (%) de crescimento celular da linhagem 786-0 após o tratamento com o composto 8, S-(4-metoxifenil) 4-metoxibenzenossulfonotioato, em quatro concentrações e em três tempos experimentais (12, 24 e 48h). Nas menores concentrações utilizadas (0,25 e 2,5  $\mu\text{g/mL}$ ) esse composto apresentou atividade antiproliferativa apenas no maior tempo experimental. Na concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$  demonstrou ação antiproliferativa em

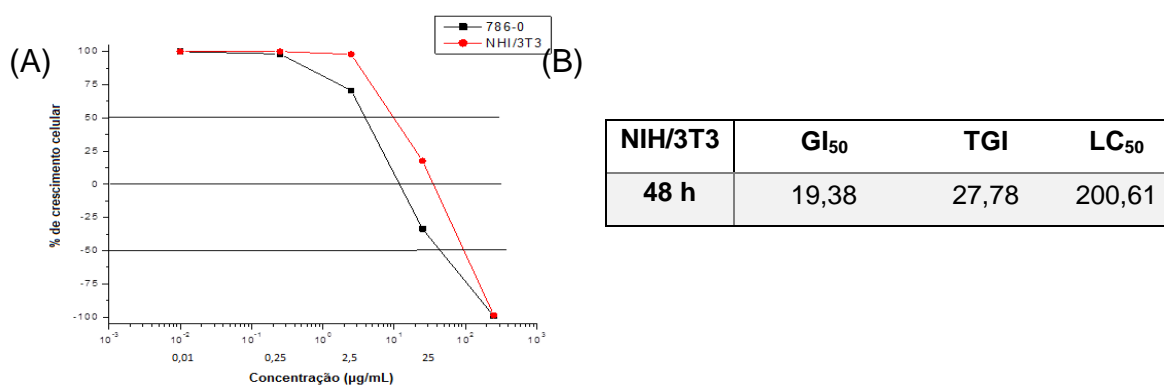
todos os tempos de tratamento, com efeito citostático em 12 h e citocida em 24 e 48h. Em todos os tempos experimentais a maior concentração utilizada (250 µg/mL) apresentou atividade citocida. Os valores de GI<sub>50</sub>, TGI e LC<sub>50</sub> estão apresentados na Figura 8B.

Figura 8 - Atividade antiproliferativa *in vitro* do composto 8 na linhagem 786-0 em três tempos experimentais. (A) Porcentagem de crescimento das células câncer renal (786-0) submetidas ao tratamento com o composto 8 em quatro concentrações (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) e em três tempos experimentais (12, 24 e 48h). (B) Valores de GI<sub>50</sub>, TGI e LC<sub>50</sub> em µg/mL calculados no programa de análise de dados Origin 6.0.



O efeito citocida frente a linhagem 786-0 apresentado pelo composto 8 na concentração de 25 µg/mL em 48h, não foi observado na linhagem NIH/3T3 (Figura 9). Nestas células não tumorais, o mesmo tratamento apresentou efeito citostático, sendo que a concentração letal média deste composto para células NIH/3T3 é de 200,61 µg/mL, ou seja, é necessário uma concentração 8,02 X maior para causar o mesmo efeito. Esse fato demonstra seletividade do composto para a célula 786-0.

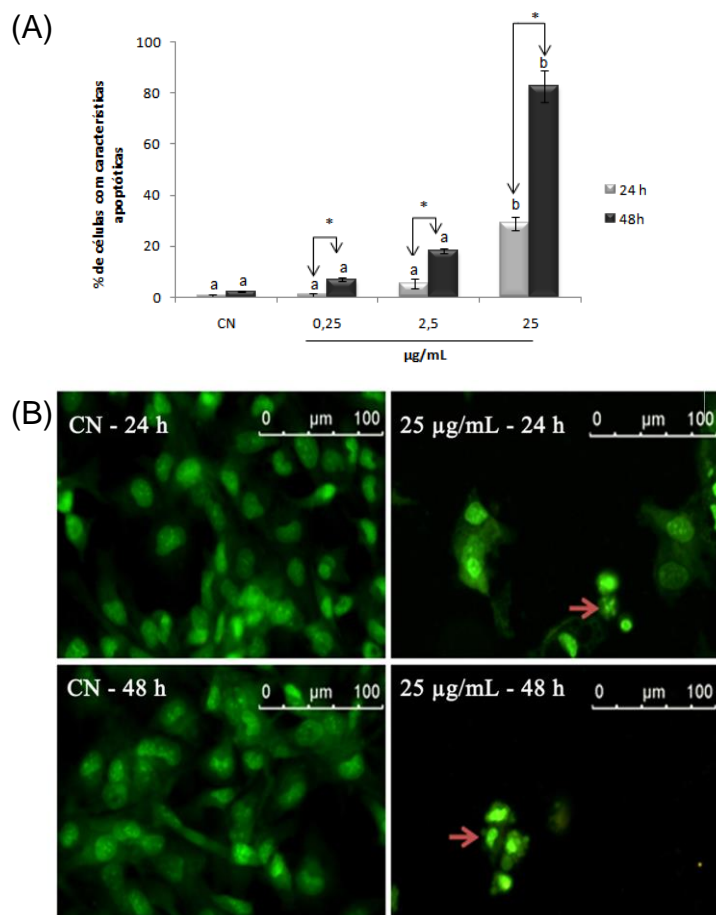
Figura 9 - Atividade antiproliferativa do composto 8 na linhagem NHI/3T3 e 786-0 após 48 h de tratamento. (A) Gráfico da porcentagem de crescimento das linhagens 786-0 e NIH/3T3 submetidas ao tratamento com o composto 8 nas concentrações (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) por 48 horas. (B) Valores de GI<sub>50</sub>, TGI e LC<sub>50</sub> em µg/mL do composto 8 calculados no programa de análise de dados Origin 6.0 para a linhagem NIH/3T3.



## 5.2.2 O composto 8 induz alteração morfológica e morte em células 786-0

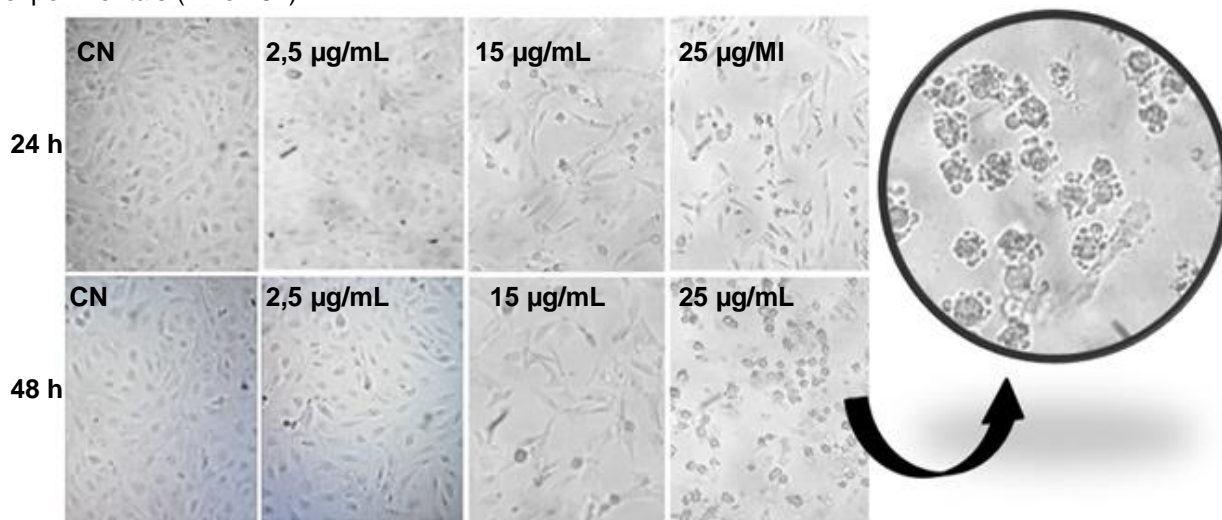
Os resultados da análise morfológica obtidos por microscopia de fluorescência no ensaio de coloração diferencial com brometo de etídio e laranja de acridina estão descritos na Figura 10. Na concentração de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  após 24 e 48 h de tratamento o composto 8 aumentou de maneira significativa ( $p < 0,01$ ) a porcentagem de células em morte celular com características apoptóticas, em todas as concentrações houve diferença significativa entre os tempos experimentais. Não foram observadas células com características de necrose nos tratamentos utilizados.

Figura 10 - Efeito do composto 8 na morfologia das células 786-0 analisadas com laranja de acridina e brometo de etideo. (A) Gráfico de barras com a porcentagem de células com características apoptóticas observadas após o tratamento com o composto 8, nas concentrações de 0,25; 2,5 e 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 24h (barras cinzas) e 48h (barras pretas). Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média de três experimentos independentes, sendo que letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,01$ ) entre os tratamentos do mesmo tempo experimental (ANOVA/Tukey) e chaves com asteriscos(\*) indicam diferença estatística ( $p < 0,01$ ) entre os tempos experimentais do mesmo tratamento (teste t de Student). (B) Fotografia de microscopia de fluorescência das células 786-0 não tratadas (CN) e tratadas com o composto 8 na concentração de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 24 e 48h. As setas indicam células em processo apoptótico.



A alteração na morfologia celular também foi observada em microscopia óptica. A Figura 11 apresenta as características das células 786-0 expostas ao tratamento com o composto 8 nas concentrações próximas aos valores de GI<sub>50</sub>, TGI e LC<sub>50</sub> em dois tempos experimentais (24 e 48 h). Nas concentrações de 15 e 25 µg/mL após 24 h de incubação observou-se diminuição da confluência celular e as células apresentaram-se com a sua forma típica alterada, com perda do aspecto fibroblástico e redução do tamanho e do volume celular. Estas alterações tornaram-se mais evidentes em 48 h na concentração de 25 µg/mL, quando praticamente todas as células foram encontradas com tamanho reduzido, aspecto arredondado e com perda de contato e adesão com a superfície da placa de cultivo e com outras células adjacentes. Em associação com o teste de laranja de acridina e brometo de etídio onde foram observados encolhimento nuclear, condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos, essas alterações morfológicas sugerem que o composto **8** induz apoptose em células 786-0. As células do controle negativo e as tratadas na concentração de 2,5 µg/mL do composto não apresentaram alterações evidentes durante os dois tempos de experimentais.

Figura 11 - Fotografia de microscopia óptica das células 786-0. não tratadas (CN) e submetidas ao tratamento com composto 8 em três concentrações (2,5; 15 e 25 µg/mL) e em dois tempos experimentais (24 e 48h).

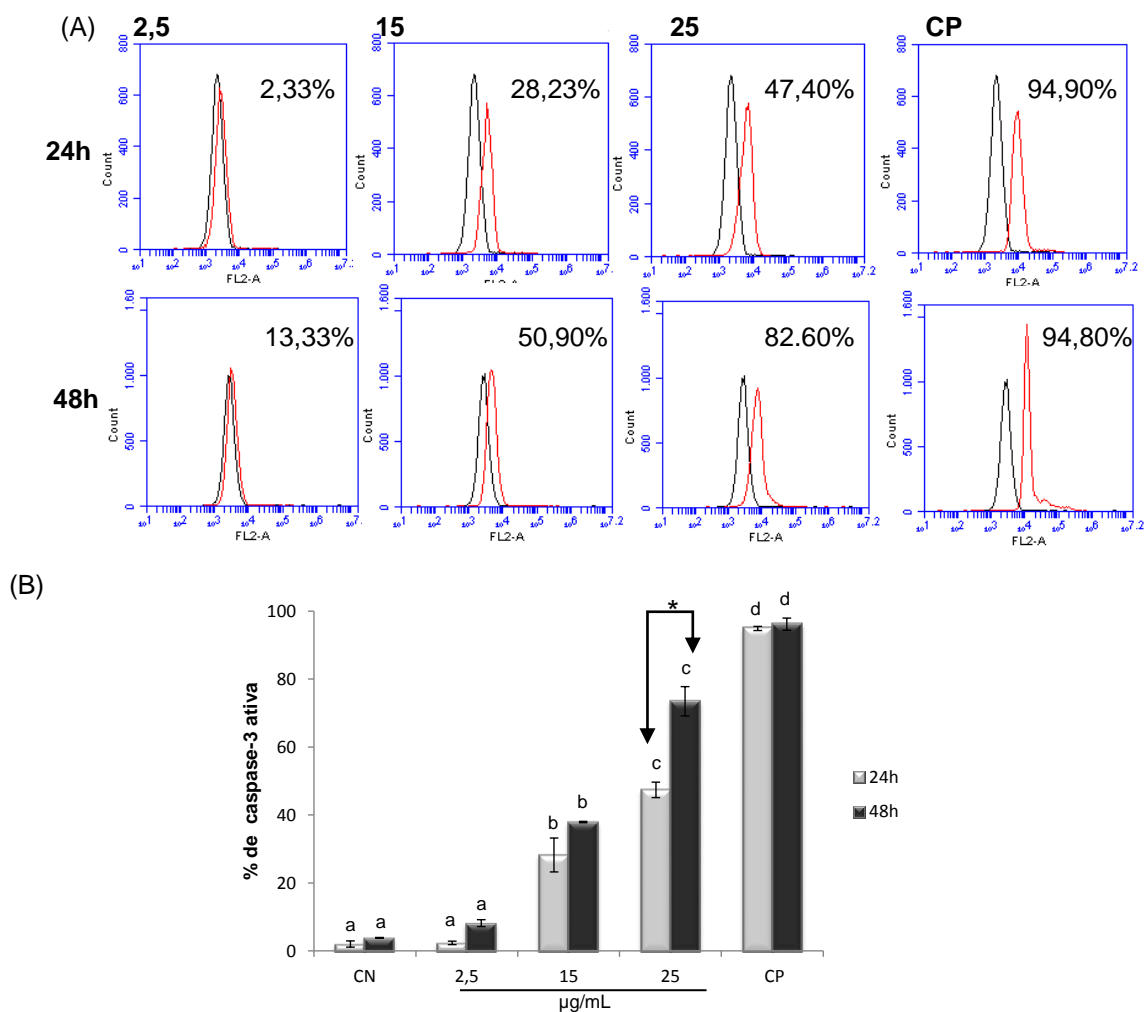


### 5.2.3 O composto 8 ativa caspase-3

A partir dos resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade e a fim de confirmar a indução de morte celular observada no teste de coloração diferencial, o composto 8 foi avaliado quanto ao seu efeito sobre a ativação de caspase-3.

Em 24 e 48 h de tratamento nas concentrações de 15 e 25  $\mu\text{g/mL}$  houve um aumento significativo de células com caspase-3 ativa (Figura 12). Em relação ao controle negativo, após 24 e 48 h de tratamento com 15  $\mu\text{g/mL}$  do composto **8**, houve um aumento respectivamente de 26,23 e 44 %. Na concentração 25  $\mu\text{g/mL}$ , o aumento observado da porcentagem de caspase-3 ativa foi de 45,4% em 24 h e de 75,7% após 48 h de tratamento.

Figura 12 - Efeito do composto **8** na ativação de caspase-3 em células 786-0. (A) Histogramas de intensidade de fluorescência de citometria de fluxo; picos pretos correspondem a fluorescência do controle negativo (células não tratadas), picos vermelhos indicam a fluorescência e a porcentagem de caspase-3 ativa nas células tratadas com o composto **8** nas concentrações de 2,5; 15 e 25  $\mu\text{g/mL}$  por 24 e 48 h. A doxorrubicina foi utilizado como controle positivo (CP) na concentração de 0,25  $\mu\text{g/mL}$ . (B) Gráfico de barras correspondente à porcentagem de caspase-3 ativa. As diferenças estatísticas entre os tratamentos do mesmo tempo experimental (barras da mesma cor) foram analisadas por (ANOVA/Tukey), sendo que letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,01$ ). Chaves com asteriscos (\*) indicam diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre os diferentes tempos experimentais do mesmo tratamento (teste t Student)

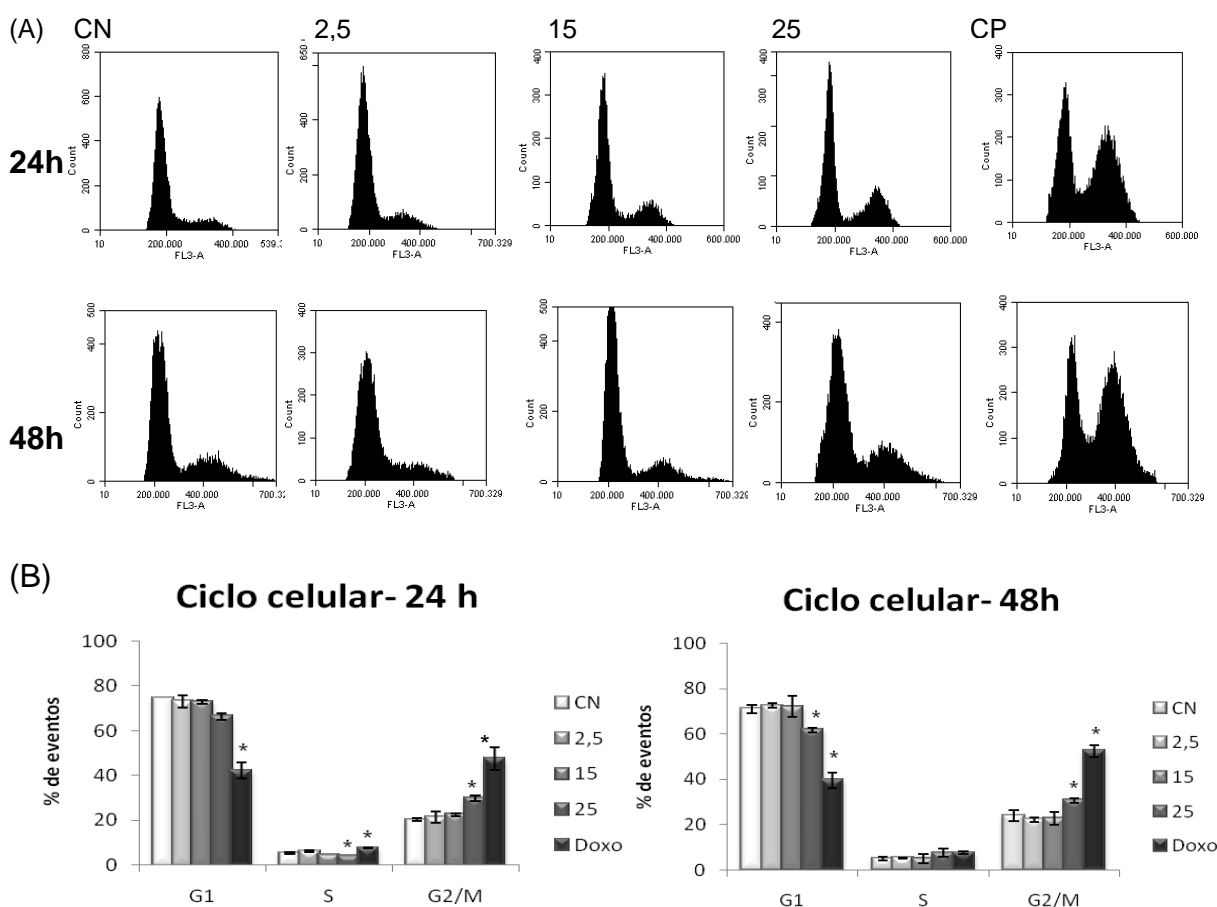


## 5.2.4 O composto 8 induz parada do ciclo celular na fase G2/M

Os histogramas da Figura 13 representam a progressão do ciclo celular das células 786-0 submetidas ou não ao tratamento com o composto 8 em três concentrações e em dois tempos experimentais.

As análises do ciclo celular demonstraram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de células em fase G2/M, quando estas foram tratadas com o composto 8 na concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$  por 24 e 48 h, com redução significativa de células na fase G1 no segundo tempo experimental.

Figura 13 - Efeito do composto 8 na progressão do ciclo celular. (A) Histogramas de intensidade de fluorescência de células 786-0 coradas com 7-AAD e análise das fases G1, S e G2/M de células não tratadas (CN) e tratadas com o composto 8 nas concentrações de 2,5; 15 e 25  $\mu\text{g/mL}$  em dois tempos experimentais (24 e 48h). A doxorubicina foi utilizado como controle positivo (CP) na concentração de 0,25  $\mu\text{g/mL}$ . (B) Gráfico de barras com os valores correspondentes às porcentagens de cada fase do ciclo celular das células 786-0 não tratadas (CN) e tratadas com o composto 8 nas concentrações de 2,5; 15 e 25  $\mu\text{g/mL}$  em dois tempo de tratamento (24 e 48 h). A diferença estatística foi realizada por ANOVA/Dunnet e os asteriscos indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o tratamento e o controle negativo de mesmo tempo experimental.



## 6 DISCUSSÃO

Neste estudo, foi possível verificar que os grupos substituintes podem afetar a efetividade e seletividade dos compostos. Isto porque, os compostos 3 e 8, ambos com o grupo  $\text{OCH}_3$ , foram os que apresentaram as menores  $\text{GI}_{50}$ , portanto, melhores atividades antiproliferativas e os maiores índices de seletividade.

Estes compostos possuem estrutura similar a combretastatina A-4 e foram identificados como potentes agentes antitubulinicos (PEREIRA, 2017). A combretastatina A-4 é um agente desestabilizador de microtúbulos que se liga no mesmo sítio da colchicina. Os grupos metoxilas desta molécula são considerados essenciais para uma boa atividade antitubulinica, pois realizam ligações de hidrogênio com  $\alpha$  e  $\beta$  tubulina e assim impedem a polimerização dos microtúbulos (ZHANG et al., 2007).

No estudo de Santos et al. (2013), o análogo da combretastatina A-4 sintetizado com a mesma quantidade de grupos metoxilas, mas contendo enxofre como grupo espaçador, apresentou potente atividade, inclusive melhor que da própria combretastatina A-4, tanto com relação a ação antitubulinica, como em relação a atividade antiproliferativa frente a linhagem 786-0.

De acordo com Pereira (2017), os compostos 3 e 8 apresentados neste estudo possuem menor quantidade de grupos metoxilas e apresentam valores de inibição da tubulina próximos da combretastatina. No entanto, a porcentagem de inibição de ligação da colchicina é menor, a combretastatina inibe praticamente 100% a ligação da colchicina, enquanto que o composto 3 é capaz de inibir apenas 29% e o composto 8 39% (PEREIRA, 2017). Podendo indicar assim, atividade antitubulínica por outro sítio de ligação, possivelmente por meio da ligação com o enxofre, já que estudos demonstram que organossulfurados são capazes de reagir com grupos tiol intracelulares presentes na tubulina (XIAO et al., 2005; CERELLA et al., 2011).

O composto 8 apresentou os menores valores de  $\text{GI}_{50}$  frente as linhagens tumorais com caráter de resistência. O mecanismo de resistência apresentado por células tumorais está relacionado principalmente com o aumento da expressão do gene MDR e a maior concentração de GSH no espaço intracelular (HARTMANN;



BOKEMEYER, 1999; HUBER, 2008). Assim, a atividade deste composto pode estar relacionada também com a capacidade de reverter esta resistência. O estudo de SMITH et al. (2016) demonstrou que compostos de enxofre, como dissulfetos e tiosulfonatos são capazes de reagir com a GSH por S-tiolação diminuindo a concentração deste antioxidante no espaço intracelular e, conseqüentemente, tornando as células mais susceptíveis a morte induzida por ROS.

Na concentração de 25 µg/mL e com 24 horas de tratamento, o composto 8 foi capaz de inibir totalmente a proliferação celular e induzir a morte das células 786-0 de modo significativo. Nessa concentração, houve um aumento de células em G2/M e maior ativação de caspase-3, indicando parada do ciclo em G2/M e morte por apoptose. Sugere-se então, que o processo apoptótico apresentado pelo composto 8 tenha ocorrido, principalmente, pela via intrínseca (ou mitocondrial), já que esta via é desencadeada por condições de estresse (danos ao DNA, aos microtúbulos, estresse oxidativo), e a via extrínseca é ativada após ligação de ligantes específicos aos seus receptores de morte correspondentes (DASGUPTA, 2016; ICHIM; TAIT, 2016).

Agentes interferentes de microtúbulos são de grande interesse na busca de novos quimioterápicos, pois são essenciais em diversas funções celulares (CHECCHI et al., 2003). Além de interromper a divisão celular, ao reagir com os microtúbulos do citoesqueleto das células endoteliais, estes agentes podem promover rompimento vascular e apresentar potencial antitumoral também por ação antiangiogênica (PILAT; LORUSSO, 2006).

Os resultados apresentados corroboram com a atividade antiproliferativa de outros organossulfurados relatados na literatura, pois a capacidade de inibir a polimerização da tubulina provoca desordens na rede de microtúbulos, induz parada do ciclo celular em G2/M e, conseqüentemente, morte por apoptose (CERELLA et al., 2011).

O composto 8, S-(4-metoxifenil) 4-metoxibenzenossulfonotioato pode ser considerado um candidato promissor para o tratamento do câncer, pois é capaz de interromper o ciclo celular e induzir apoptose em células 786-0 via ativação de caspase-3. Este composto também apresenta atividade em células quimioresistentes como a NCI/ADR e MDA-MB-231, e a ação antitubulínica pode ser investigada como uma alternativa para a terapia antiangiogênica, principalmente,

frente a tumores que apresentam resistência aos fármacos anti-angiogênicos com ação anti-VEGF, como o carcinoma de células renais.

## 7 CONCLUSÃO

Os compostos organossulfurados testados apresentaram atividade antiproliferativa frente a diferentes linhagens de células neoplásicas, o composto 8 apresentou a melhor atividade antiproliferativa com  $GI_{50}$  variando entre 2,82 e 26,81  $\mu\text{g/ml}$ .

Os compostos 3 e 8 apresentaram bons índices de seletividade, sendo que o maior valor apresentado pelo composto 3 foi de 10,2 e para o composto 8 foi de 8,39.

A análise do composto 8 em células 786-0 demonstrou a indução da morte celular por apoptose e ativação de caspase 3.

Este composto é capaz de parar o ciclo celular em G2/M.

O composto pode ser considerado um candidato promissor para o tratamento de câncer ou servir como protótipo para síntese de novas moléculas.

## 8 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, V. L. D. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

ALTONSY, M.O.; HABIB, T.N.; ANDREWS, S.C. Diallyl disulfide-induced apoptosis in a breast-cancer cell line (MCF-7) may be caused by inhibition of histone deacetylation. **Nutrition and Cancer**, v. 64, n. 8, p. 1251-1260, 2012.

AMARAL, J. B.; MACHADO-SANTELLI, G. M. A cultura de células em 3 dimensões e a sua aplicação em estudos relacionados a formação do lúmen. **Naturalia**, Rio Claro, v. 34, p. 1-20, 2011.

ANTOSIEWICZ, H. A.; SINGH, S.V. Signal transduction pathways leading to cell cycle arrest and apoptosis induction in cancer cells by Allium vegetable-derived organosulfur compounds: a review. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 555, n. 1, p. 121–131, 2004.

BUDIHARDJO, I. et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 15, n. 1, p. 269-290, 1999.

CERELLA, C. et al. Chemical properties and mechanisms determining the anti-cancer action of garlic-derived organic sulfur compounds. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v. 11, n. 3, p. 267-271, 2011.

CIRCU, M.L.; AW, T.Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, n. 6, p. 749-762, 2010.

CHAPLIN, D.J. et al. Antivascular approaches to solid tumour therapy: evaluation of tubulin binding agents. **The British journal of cancer. Supplement**, v. 27, p. S86-88, 1996.

CHECCHI, P. M. et al. Microtubule-interacting drugs for cancer treatment. **Trends in pharmacological sciences**, v. 24, n. 7, p. 361-365, 2003.

CHOW, W.H.; DONG, L.M.; DEVESA, S.S. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. **Nature Reviews Urology**, v. 7, n. 5, p. 245-257, 2010.

CHUNG, L.Y. The antioxidant properties of garlic compounds: allyl cysteine, alliin, allicin, and allyl disulfide. **Journal of medicinal food**, v. 9, n. 2, p. 205-213, 2006.

DARK, G. G. et al. Combretastatin A-4, an agent that exhibits potent and selective toxicity to tumor vasculature. **Cancer Research**, v. 57, n. 10, p. 1829-1834, 1997.

DASGUPTA, A. et al. Cancer's Achilles' Heel: Apoptosis and Necroptosis to the Rescue. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 1, p. 23, 2016.

DESAI, A.; MITCHISON, T.J. Microtubule polymerization dynamics. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 13, n. 1, p. 83-117, 1997.

DOWNING, K.H.; NOGALES, E. Tubulin structure: insights into microtubule properties and functions. **Current opinion in structural biology**, v. 8, n. 6, p. 785-791, 1998.

EVAN, G.I.; VOUSDEN, K.H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 342, 2001.

FERLAY, J. et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **International journal of cancer**, v. 127, n. 12, p. 2893-2917, 2010.

FOLKMAN, J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. In: **Seminars in oncology**. WB Saunders, p. 15-18, 2002.

FOUAD, Y.A.; AANEI, C. Revisiting the hallmarks of cancer. **American journal of cancer research**, v. 7, n. 5, p. 1016, 2017.

FRESHNEY IR. Culture of animal cells. A manual of Basic Technique. 5 ed. New York: Wiley-Liss, 2005.

GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell death and differentiation**, v. 19, n. 1, p. 107, 2012.

GANGJEE, A. et al. Discovery of antitubulin agents with antiangiogenic activity as single entities with multitarget chemotherapy potential. **ACS medicinal chemistry letters**, v. 5, n. 5, p. 480-484, 2014.

GAO, F. et al. New Synthesis of Cytotoxic Thiosulfonates and the First Synthesis of Deuterated Thiosulfonates. **Synthesis**, v. 22, n. 22, p. 3635-3638, 2011.

GRIFFITHS, R. et al. Novel disulfides with antitumour efficacy and specificity. **Australian Journal of Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 128-136, 2005.

GRISHAM, R. et al. Clinical trial experience with CA4P anticancer therapy: focus on efficacy, cardiovascular adverse events, and hypertension management. **Gynecologic oncology research and practice**, v. 5, n. 1, p. 1, 2018.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Revista Estudos Avançados**. São Paulo, v.24, n.70, p.81-98, 2010.

GUNADHARINI, D. N. et al. Antiproliferative effect of diallyl disulfide (DADS) on prostate cancer cell line LNCaP. **Cell biochemistry and function**, v. 24, n. 5, p. 407-412, 2006.

- HAJRA, K.M.; LIU, J.R. Apoptosome dysfunction in human cancer. **Apoptosis**, v. 9, n. 6, p. 691-704, 2004.
- HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3864-3874, 1991.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Review Cell**, v. 100, n. 1, p.57–70, 2000.
- HARTMANN, J.T.; BOKEMEYER, C. Chemotherapy for renal cell carcinoma. **Anticancer research**, v. 19, n. 2, p. 1541-1543, 1999.
- HOUGHTON, P. et al. The sulphorhodamide (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anti cancer activity. **Methods**, v. 42, p. 377-387, 2007.
- HUBER, P.C; WANDA, P.A.; FATIMA A.D. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, 2008.
- World Health Organization. **Cancer: Fact Sheet 297**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 10.mar.2018.
- ICHIM, G.; TAIT, S.W.G. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, p. 539-548, 2016.
- INCA- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa 2018/2019. Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2015. Disponível <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018>>. Acesso em: março.2018
- JACOB, C. et al. Sulfur and selenium: the role of oxidation state in protein structure and function. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 42, n. 39, p. 4742-4758, 2003.
- JAROCH, K. et al. Combretastatins: in vitro structure-activity relationship, mode of action and current clinical status. **Pharmacological Reports**, v. 68, n. 6, p. 1266-1275, 2016.
- JORDAN, M.A.; WILSON, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 4, p. 253, 2004.
- KAMB, A. What's wrong with our cancer models? **Nature reviews Drug discovery**, v. 4, n. 2, p. 161-165, 2005.
- KAMINSKA, K. et al. Immunotherapy Resistance Mechanisms in Renal Cell Cancer. **Current Signal Transduction Therapy**, v. 8, n. 3, p. 247-255, 2013.
- KERR, J.F.R; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British journal of cancer**, v. 26, n. 4, p. 239, 1972.

KIM, W.Y.; KAELIN, W.G. Role of VHL gene mutation in human cancer. **Journal of clinical oncology**, v. 22, n. 24, p. 4991-5004, 2004.

KRISHNA, R.; MAYER L.D. Multidrug resistance (MDR) in cancer - Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n.4, p. 265-283, 2000.

Lawson LD. Garlic: a review of its medicinal effects and indicated active compounds. In: Lawson LD, Bauer R, eds. *Phytomedicines of Europe: Chemistry and Biological Activity*. Washington, D. C.: American Chemical Society; 1998:177-209.

LEHNERT, M. Clinical multidrug resistance in cancer: a multifactorial problem. **European Journal of Cancer**, v. 32, n. 6, p. 912-920, 1996.

LJUNGBERG, B. et al. EAU guidelines on renal cell carcinoma: the 2010 update. **European urology**, v. 58, n. 3, p. 398-406, 2010.

LONGLEY, D. B.; JOHNSTON, P. G. Molecular mechanisms of drug resistance. **The Journal of pathology**, v. 205, n. 2, p. 275-292, 2005.

LU, H.F. et al. Diallyl disulfide (DADS) induced apoptosis undergo caspase-3 activity in human bladder cancer T24 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v.42, n. 10, p. 1543-1552, 2004.

LUKAS, J.; LUKAS, C.; BARTEK, J. Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. **DNA Repair (Amst)**, v. 3, n. 8-9, p. 997-1007, 2004.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 3, p. 153, 2009.

MCGAHON, A. J. et al. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. **Methods in cell biology**, v. 46, p. 153-85, 1995.

MCGOWN, A.T.; FOX, B. W. Differential cytotoxicity of combretastatins A1 and A4 in two daunorubicin-resistant P388 cell lines. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 26, n. 1, p. 79-81, 1990.

MILELLA, M.; FELICI, A. Biology of metastatic renal cell carcinoma. **Journal of Cancer**, v. 2, p. 369, 2011.

MONKS, A. et al. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. **JNCI: Journal of National Cancer Institute**. v. 83, n. 11, 1991.

MORAIS, C. Sunitinib resistance in renal cell carcinoma. **Journal of Kidney Cancer and VHL**, v. 1, n. 1, p. 1, 2014.

MUGLIA, V.F.; PRANDO, A. Carcinoma de células renais: classificação histológica e correlação com métodos de imagem. **Radiologia Brasileira**, v. 48, n. 3, p. 166-174, 2015.

NIU, N.; WANG, L. In vitro human cell line models to predict clinical response to anticancer drugs. **Pharmacogenomics**, v. 16, n. 3, p. 273-285, 2015.

NORBURY, C.; NURSE, P. Animal cell cycles and their control. **Annual review of biochemistry**, v. 61, n. 1, p. 441-468, 1992.

OKADA H.; MAK T.W. Pathways of apoptotic and nonapoptotic death in tumour cells. **Nature reviews. Cancer**, v. 4, p. 592-603, 2004.

OREGON STATE UNIVERSITY. Garlic and Organosulfur Compounds. Disponível em <http://lpi.oregonstate.edu/mic/food-beverages/garlic> . Acesso em 22.fev.2018.

ORTEGA, A.L.; MENA, S. ; ESTRELA, J.M. Glutathione in cancer cell death. **Cancers**, v. 3, n. 1, p. 1285-1310, 2011.

OTTO, T.; SICINSKI, P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. **Nature reviews. Cancer**, v. 17, n. 2, p. 93, 2017.

PENTICUFF, J.C.; KYPRIANOU, N. Therapeutic challenges in renal cell carcinoma. **American Journal of Clinical and Experimental Urology**, v. 3, n. 2, p. 77, 2015.

PEREIRA, I.D. Síntese e avaliação de compostos diarílicos contendo átomos de selênio ou enxofre, 2017, 95f. Dissertação (Mestrado) -Universidade Federal de Mato grosso do Sul.

PILAT, M. J.; LORUSSO, P. M. Vascular disrupting agents. **Journal of cellular biochemistry**, v. 99, n. 4, p. 1021-1039, 2006.

PLJESA-ERCEGOVAC, M. et al. Altered antioxidant capacity in human renal cell carcinoma: role of glutathione associated enzymes. In: **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v.26, n. 2, p. 175-181, 2008.

RINI, B.I.; ATKINS, M.B. Resistance to targeted therapy in renal-cell carcinoma. **The lancet oncology**, v. 10, n. 10, p. 992-1000, 2009.

RUSTIN, G.J.S et al. Phase I clinical trial of weekly combretastatin A4 phosphate: clinical and pharmacokinetic results. **Journal of clinical oncology**, v. 21, n. 15, p. 2815-2822, 2003

SAINI, V. et al. Novel synthetic analogs of diallyl disulfide triggers cell cycle arrest and apoptosis via ROS generation in MIA PaCa-2 cells. **Pharmacological Reports**, v. 69, n. 4, p. 813-821, 2017.



SANTOS, E.A. et al. Synthesis and evaluation of diaryl sulfides and diaryl selenide compounds for antitubulin and cytotoxic activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n.16, p. 4669–4673, 2013.

SCHMID, Tobias et al. Diaryl disulfides as novel stabilizers of tumor suppressor Pcd4. **PloS one**, v. 11, n. 3, p. e0151643, 2016.

SHOEMAKER, R. H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. **Nature Reviews: Cancer**, v. 6, n. 10, p. 813-823, 2006.

SHULKA. Y.; KALRA. N. Cancer chemoprevention with garlic and its constituents. **Cancer Letters**, v. 247, n. 2, p.167-181, 2007.

SILVA, M.M. et al. Synthesis, Antiproliferative Activity and Molecular Properties Predictions of Galloyl Derivatives. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 5360-5373, 2015.

SKEHAN, Philip et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

SMITH, M. et al. The cytotoxicity of garlic-related disulphides and thiosulfonates in WHCO1 oesophageal cancer cells is dependent on S-thiolation and not production of ROS. **Biochimica et Biophysica Acta- General Subjects**, v. 186, n. 7, p. 1439-1449, 2016.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J.M. Assays for bioactivity. In *Methods in Plant Biochemistry*. K. Hostettmann, 1991.

SUSIN, S.A. et al. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 4, p. 571-580, 2000.

TANAKA, T.U. Kinetochores–microtubule interactions: steps towards bi-orientation. **The EMBO journal**, v. 29, n. 24, p. 4070-4082, 2010.

THOMPSON, C.B. et al. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science**, v. 267, n. 5203, p. 1456-1462, 1995.

TOZER, G.M. et al. Combretastatin A-4 phosphate as a tumor vascular-targeting agent: early effects in tumors and normal tissues. **Cancer Research**, v. 59, n. 7, p. 1626-1634, 1999.

TRACHOOTHAM, D.; ALEXANDRE, J.; HUANG, P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? **Nature reviews Drug discovery**, v. 8, n. 7, p. 579, 2009.

VERHEY, K.J.; GAERTIG, J. The tubulin code. **Cell cycle**, v. 6, n. 17, p. 2152-2160, 2007.

- VERMEULEN, K. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell proliferation**, v. 36, n. 3, p. 131-149, 2003.
- WALSH, N. et al. Expression of multidrug resistance markers ABCB1 (MDR-1/P-gp) and ABCC1 (MRP-1) in renal cell carcinoma. **BMC urology**, v. 9, n. 1, p. 6, 2009.
- WANG, H. et al. Stimulation of topoisomerase II-mediated DNA damage via a mechanism involving protein thiolation. **Biochemistry**, v. 40, n. 11, p. 3316-3323, 2001.
- WILLIAMS G.H; STOEBER K. The cell cycle and cancer. The Journal of **Pathology**, v. 226, n. 2, p. 352-364, 2012.
- WONG, R. S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 30, n. 1, p. 87, 2011.
- WYLLIE, A.H.; KERR, J.F.R; CURRIE, A. R. Cell death: the significance of apoptosis. **International review of cytology**, v. 68, p. 251-306, 1980.
- XIAO, D. et al. Effects of a series of organosulfur compounds on mitotic arrest and induction of apoptosis in colon cancer cells. **Molecular cancer therapeutics**, v. 4, n. 9, p. 1388-1398, 2005.
- ZHANG, Q. et al. Highly potent triazole-based tubulin polymerization inhibitors. **Journal of medicinal chemistry**, v. 50, n. 4, p. 749-754, 2007.
- ZHOU, J.; GIANNAKAKOU, P. Targeting microtubules for cancer chemotherapy. **Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents**, v. 5, n. 1, p. 65-71, 2005.
- ZUO, D. et al. 3-(3-Hydroxy-4-methoxyphenyl)-4-(3, 4, 5-trimethoxyphenyl)-1, 2, 5-selenadiazole (G-1103), a novel combretastatin A-4 analog, induces G2/M arrest and apoptosis by disrupting tubulin polymerization in human cervical HeLa cells and fibrosarcoma HT-1080 cells. **Chemico-biological interactions**, v. 227, p. 7-17, 2015.